

УДК 581.143.6+581.165.1

ИЗУЧЕНИЕ СЕМЯН ПАЛЬЧАТОКОРЕННИКОВ *Dactylorhiza baltica*, *D. maculata* ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ОРХИДЕЙ КРИБАНКА ИНСТИТУТА ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ РАН

© 2019 г. Т. В. Никишина*, О. Н. Козлова**, Г. Е. Левицкая***, О. Н. Высоцкая*.[@]

*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Россия, 127276 Москва, ул. Ботаническая, 35

**Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Беларусь, 220012 Минск, ул. Сурганова, 2в

***Институт биофизики клетки РАН, Россия, 142290 Московская обл., Пущино, ул. Институтская, 3

[@]E-mail: cryo@ippras.ru

Поступила в редакцию 07.12.2017 г.

После доработки 21.05.2018 г.

Принята к публикации 08.06.2018 г.

Изучены образцы семян двух видов орхидей из рода пальчатокоренников *Dactylorhiza baltica* и *D. maculata*, собранные в Беларуси и в России и помещенные в криобанк Института физиологии растений РАН на длительное сохранение в жидком азоте. Для комплексной оценки качества коллекционных образцов использованы показатели жизнеспособности семян, а также их морфометрические и физиологические характеристики. Показано, что всестороннее изучение образцов семян, собранных в различных местах произрастания в разное время, можно синхронизировать с помощью применения методов криосохранения и культивирования растительного материала *in vitro*.

DOI: 10.1134/S0002332919030068

Криобанк Института физиологии растений РАН им. К.А. Тимирязева (ИФР РАН) был основан более 30 лет назад по инициативе Р.Г. Бутенко и А.С. Попова. В настоящее время в шести коллекциях криобанка сохраняют разнообразный растительный материал, в том числе семена редких и исчезающих видов орхидей. Первые образцы криоколлекции орхидей ИФР РАН, замороженные в 2001 г., сохраняют в жидком азоте уже более 16 лет (Никишина и др., 2001). Тропические и субтропические орхидеи из различных климатических зон и континентов представлены в криобанке 111 видами, причем 21 вид этой коллекции включен в первое приложение СИТЕС (список находящихся под угрозой исчезновения видов растений и животных, оборот образцов которых регулируют правила Конвенции о международной торговле видами дикой фауны и флоры). Все семенные образцы тропических орхидей были собраны с сертифицированных растений Главного ботанического сада РАН.

Семена орхидей, которые произрастают в зоне умеренного климата, занимают в криобанке ИФР РАН особое место (Никишина и др., 2006, 2007). В этой группе криоколлекции зарегистрированы 27 видов орхидей, в том числе 14 видов из Красной книги РФ и 23 вида из Красных книг регионов РФ и некоторых европейских государств.

Образцы семян редких и исчезающих видов орхидей из природных мест обитания особо ценны для научных коллекций (Vakhrameeva *et al.*, 2008). Сбор таких образцов связан со сложнейшей работой в полевых экспедициях, лабораторным тестированием жизнеспособности собранного семенного материала и обязательной идентификацией растений, которые были выбраны для пополнения научных коллекций (Li, Pritchard, 2009; Pritchard *et al.*, 2010; Seaton *et al.*, 2013).

В семействе Orchidaceae определение систематического положения дикорастущих растений существенно осложняется тем, что многие виды орхидей, в том числе и пальчатокоренники, склонны к межвидовой гибридизации и полиплоидизации (Paun *et al.*, 2010). Эти обстоятельства серьезно осложняют определение видовой принадлежности растений орхидей в полевых условиях (Pritchard, 1984, 2007; Филиппов, Андропова, 2010, 2011, 2017). Кроме того, коллекционные образцы, собранные в естественных местах обитания, могут содержать семена, сформированные в результате опыления цветков пыльцой не только классических представителей вида, но и других видов или разновидностей орхидей (De Hert *et al.*, 2011, 2012). Именно поэтому такой семенной материал необходимо дополнительно исследовать в лабораторных условиях, в том числе с помощью

самых современных методов (Ефимов, 2012; Филиппов и др., 2015).

Таксономическую структуру рода пальчатокоренников анализировали разные исследователи с помощью различных методов (Аверьянов, 1982, 1983а, б; Hedrén, 1996, 2001). Как правило, для определения видовой принадлежности растений, в том числе и орхидей, используют конкретные морфологические и фенологические признаки, такие как интенсивность пигментации листьев, цветков и семян, размерные и структурные особенности растений и отдельных их органов. У пальчатокоренников эти признаки очень изменчивы и пластичны, что существенно осложняет процедуру идентификации этих растений в полевых условиях (Куликов, Филиппов, 1999; Devos *et al.*, 2005, 2006). В связи с этим для определения вида у пальчатокоренников наряду с классическим анализом морфологических и филогенетических признаков необходимо проводить дополнительные комплексные исследования с помощью методов биотехнологии, криобиологии и генетики (Obara-Okeyo, Kako, 1997; Wood *et al.*, 2000; Ponert *et al.*, 2011; Yu-Yun Hsiao *et al.*, 2011).

Орхидеи, обычно идентифицируемые в России и соседних государствах как пальчатокоренник балтийский *Dactylorhiza baltica* (Klinge) Orlova или длиннолистный *D. longifolia* (L. Neum.) Aver. (Аверьянов, 2000; Jakobson *et al.*, 2012; Вахрамеева и др., 2014), некоторые европейские исследователи предпочитают относить к балтийской разновидности пальчатокоренника майского *D. majalis*, subsp. *baltica* (Klinge) H. Sund. (Hedrén *et al.*, 2012). Не вызывает сомнений тот факт, что данный вид представляет особый интерес для научного сообщества как модельный объект при изучении эволюционных процессов в семействе Orchidaceae. Молекулярно-генетические исследования образцов растительного материала пальчатокоренников из различных природных мест обитания продемонстрировали сложность филогенетических связей и эволюционных процессов внутри этого рода (Shipunov *et al.*, 2004, 2005; Pillon *et al.*, 2006, 2007; Andronova *et al.*, 2009; Ståhlberg, Hedrén, 2010). Более того, с помощью специализированного метода генетического анализа (ISSR, Inter Simple Sequence Repeat) были получены данные о возможном гибридном происхождении растений, идентифицированных по морфологическим признакам как пальчатокоренник балтийский (Ефимов, 2012).

Мы полагаем, что для наблюдения за изменениями, происходящими в этой таксономической группе орхидей, необходимо использовать метод криосохранения семенного материала, собранного в разное время в разных популяциях пальчатокоренников. В криобанке можно сформировать обширную коллекцию растительного мате-

риала этой группы орхидей, затем использовать ее образцы для планового изучения динамических изменений в конкретных местообитаниях пальчатокоренников. Это тем более важно, что на территории РФ существует множество популяций похожих на пальчатокоренники растений, таксономический статус которых пока не изучен (Куликов, Филиппов, 1999).

В итоге накопленный экспериментальный материал может стать полезным для исследования эволюционных процессов, протекающих внутри рода *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski.

Цель исследования – определить на примере двух близкородственных видов пальчатокоренников наиболее информативные характеристики коллекционных образцов, которые можно использовать при комплексном изучении семенного материала орхидей, длительное время сохраняемого в криобанке ИФР РАН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В настоящее время систематики относят к роду *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski от 14 до 75 видов орхидей (Shipunov *et al.*, 2004, 2005), причем в РФ обитают 14–20 видов пальчатокоренников (Вахрамеева и др., 2014).

На территории Московской обл. (54°50'11.4" с.ш., 37°33'33.9" в.д.) и в Республике Беларусь (54°02'26.9" с.ш., 27°26'33.9" в.д.) нами было обнаружено несколько мест обитания пальчатокоренников. На основании литературных данных (Аверьянов 1983а, б, 2000) орхидеи из этих мест обитания были идентифицированы как принадлежащие к видам *D. baltica* (Klinge) Orlova и *D. maculata* (L.) Sob (табл. 1). Отдельные цветущие растения этих двух видов имели классические видовые признаки и поэтому были выбраны нами в качестве модельных для сбора образцов семян в коллекцию криобанка ИФР РАН. В августе 2011 г. с маркированных растений собирали закрытые коробочки, которые в бумажных пакетах были затем переданы в ИФР РАН. Семена пальчатокоренников из разных мест обитания были охарактеризованы и помещены в криобанк ИФР РАН для долговременного сохранения в жидком азоте. Семенные образцы до замораживания сохраняли в холодильнике при $5 \pm 2^\circ\text{C}$ в герметичных сосудах с силикагелем.

В процессе составления описаний собранного материала фотоаппаратом Sony SLT-A57 (Япония) были сделаны фотографии образцов, а с помощью бинокулярного микроскопа МБС-10 (ОАО ЛЗЭС, РФ) были измерены размеры семян и зародышей. Кроме того, для каждого из образцов определяли жизнеспособность и влажность семян. Долю свободной воды в семенах определяли весовым методом: пробы из образцов собран-

Таблица 1. Видовые особенности пальчатокоренников *Dactylorhiza* spp.

Показатель	Виды	
	<i>D. baltica</i> (Klinge) Nevski, пальчатокоренник балтийский	<i>D. maculata</i> (L.) Soó, пальчатокоренник пятнистый или крапчатый
Синонимы	<i>D. baltica</i> (Klinge) N.I. Orlova <i>D. majalis</i> subsp. <i>baltica</i> (Klinge) H.Sund. <i>D. longifolia</i> (Neumann) Aver. <i>Orchis longifolia</i> Neuman	<i>Orchis maculata</i> L. <i>Dactylorhiza maculata</i> (L.) Verm.
Высота растения, см	15–60	15–50
Побеги	Толстые, полые	Тонкие, плотные
Листья	3–6 шт., с пятнами или без пятен, линейно-ланцетные, нередко вдоль сложенные	2–8 шт., с пятнами или без пятен, линейные или продолговато-ланцетные
Клубни	Пальчатые, сплюснутые и утонченные на концах	Пальчатые, сплюснутые
Соцветие	Колос короткий, цилиндрический	Колос цилиндрический
Цветки	Многочисленные, окраска варьирует от фиолетово-пурпурной до светло-розовой	Многочисленные, окраска изменяется от лиловой до красной, белесых оттенков
Прицветники	Окрашенные, крупные, заметные	Зеленые, как правило, незаметные
Губа	Трехлопастная, длина обычно равна ширине, средняя доля губы округлая, ее длина не превышает длину боковых лопастей	Трехлопастная, средняя доля губы обычно хорошо выражена, иногда длиннее боковых долей
Цветение	Июнь–июль	Июнь–июль
Плодоношение	Июль–август	Июль–август
Места обитания	Низинные зеленомошные болота, сырые луга и леса, щелочные почвы с выходами грунтовых вод	Верховые и переходные торфяные болота, влажные луга и леса, кислые почвы
Ареал	От Финляндии до Центральной Азии	От Европы и Северо-Запада Африки до Центра Сибири

ного материала высушивали при $95 \pm 2^\circ\text{C}$ до постоянной массы (Никишина и др., 2001). Уровень жизнеспособности семян в образцах оценивали по числу семян с зародышами, числу семян с окрашенными формазаном зародышами (реакция восстановления трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) до красного формазана за счет активности ферментов дегидрогеназ в живых клетках (метод ТТХ) и по всхожести (доле) семян, сформировавших *in vitro* протокормы).

Растения орхидей in vitro. Всхожесть семян определяли с помощью прорастивания в асептических условиях на искусственной питательной среде. Стерилизацию поверхности семян из разных образцов проводили с использованием раствора гипохлорита натрия. После отмывания от стерилизующих агентов семена помещали на поверхность специализированной питательной среды (mBM, табл. 2) и прорастивали в темноте при $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Показатели всхожести семян в каждом образце (доля протокормов, сформированных у 100–300 семян) регистрировали в случайно вы-

бранных зонах агаровой среды в течение 100 сут после посева.

Полученные из протокормов сеянцы культивировали *in vitro* на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга (mMS, табл. 2) при $20 \pm 2^\circ\text{C}$, освещенности 4–5 клк и 16-часовом дне. Пересадку растительного материала на свежую питательную среду проводили каждые 3–4 мес. Сеянцы, сформировавшие корни, высаживали в полевые условия или использовали для проведения дальнейших исследований.

Криосохранение семян орхидей. Влажность и жизнеспособность семян из подготовленных для криосохранения образцов определяли перед погружением в жидкий азот. Семена из каждого коллекционного образца помещали в отдельные криопробирки, которые маркировали индивидуальными номерами. Нумерацию пробирок и их размещение (номера ячейки, штатива и этажерки) регистрировали в документах криобанка. Затем этажерку с коллекционным материалом погружали в жидкий азот внутри криогенного био-

Таблица 2. Состав питательных сред, использованных в эксперименте

Компонент среды	Содержание компонента в питательной среде, мг/л		Компонент среды	Содержание компонента в питательной среде, мг/л	
	mBM	mMS		mBM	mMS
NH ₄ NO ₃	–	1650	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.025
KNO ₃	–	1900	L-глутамин	100	–
MgSO ₄ · 7H ₂ O	100	370	Гидрохлорид тиамин	0.5	0.5
KH ₂ PO ₄	300	170	Гидрохлорид пиридоксин	0.5	0.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	–	440	Никотиновая кислота	5	0.5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.85	55.6	Глицин	2	2
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37.25	74.6	Фолиевая кислота	0.5	–
MnSO ₄ · 5H ₂ O	35	370	Мезоинозитол	100	100
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.25	Гидролизат казеина	500	–
H ₃ BO ₃	10	6.2	Сахароза	20000	30000
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10	8.6	Пептон	500	–
KI	–	0.83	6-бензиламинопурин	–	0.5
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.025	Агар-агар, Испания	10	10

Примечание. mBM – модификация питательной среды BM (Van Waes, Debergh, 1986), mMS – модификация питательной среды Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962).

логического хранилища (ХБ-0.5; Уральский компрессорный завод, РФ) для долговременного сохранения в криобанке ИФР РАН.

Анализ экспериментальных данных. Сравнение растительного материала из собранных образцов выполняли с помощью комплексного анализа всех доступных нам характеристик. Статистический анализ полученных данных проводили методами сравнения средних арифметических и оценки разности выборочных долей с использованием критерия Фишера и программы Microsoft Excel. В качестве показателя достоверности различий использовали коэффициент $\beta = 1 - \alpha$, отражающий вероятность безошибочного прогноза (Плохинский, 1980).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические характеристики растений орхидей в полевых условиях. Растения орхидей *D. baltica* и *D. maculata*, с которых были собраны семена для криобанка ИФР РАН, различались по шести основным признакам (табл. 1), отмеченным в использованных нами определителях растений (Аверьянов, 1983а, б, 2000). В результате мы зарегистрировали семенные образцы 1 и 2 как принадлежащие к виду *D. baltica*, а образец 3 – к виду *D. maculata*. Однако мы полагаем, что реально существует вероятность ошибки при определении таксономического статуса отобранных растений, в связи с чем необходимы дополнительные лабораторные исследования собранных образцов се-

менного материала для составления паспорта криобанка.

Морфометрические особенности семян. Коллекционные образцы 1, 2 и 3 сравнивали по средним значениям длин семени и зародыша (рис. 1, табл. 3). Для морфометрических измерений отбирали семена из каждого коллекционного образца случайным образом.

Образцы 1 и 2, принадлежащие к *D. baltica*, по изученным морфометрическим показателям не имели существенных различий. В то же время семена *D. maculata* из образца 3 были значительно короче семян из образцов 1 и 2 (табл. 3). Интересно, что зародыши пальчатокоренника пятнистого из образца 3 оказались несколько крупнее, чем зародыши в семенах из образцов 1 и 2. Однако существенных различий длин зародышей семян из изученных образцов обнаружено не было (рис. 1).

Для дополнительной оценки морфологических особенностей семян анализируемых образцов мы использовали отношение длины зародыша к длине семени (в процентах). С помощью метода оценки достоверности разностей долей (Плохинский, 1980) было показано, что в более мелких семенах пальчатокоренника пятнистого этот показатель существенно превышает значения аналогичных показателей для образцов пальчатокоренника балтийского (табл. 3). Во всех анализируемых образцах доля семян без зародыша не превышала 13% (табл. 4).

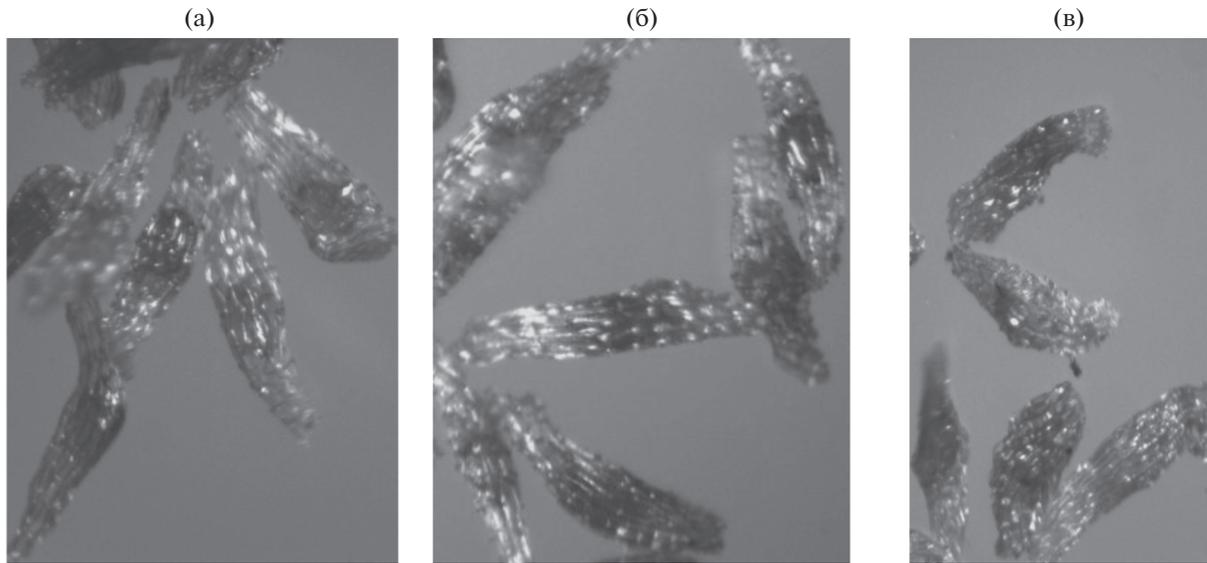


Рис. 1. Семена пальчатокоренников *Dactylorhiza* spp. из криобанка ИФР РАН. а–в – образцы 1–3 соответственно.

Мы полагаем, что использование наиболее простых морфометрических показателей в комплексном сравнительном анализе семенных образцов близкородственных видов орхидей достаточно информативно для составления первичных коллекционных описаний. Подобные подходы к описанию коллекционного материала орхидей и других растений всегда были и остаются актуальными (Arditti, Ghani, 2000; Tsutsumi *et al.*, 2007; Yam *et al.*, 2009; Calevo *et al.*, 2017).

Физиологические особенности семян. Множество внешних и внутренних факторов влияет на качество семян и их всхожесть (Ророва *et al.*, 2016; Kameswara *et al.*, 2017). Однако именно условия хранения в существенной степени определяют продолжительность сохранения семенами исходной жизнеспособности (Roberts, 1973, 1992; Pritchard, 1984; Pritchard *et al.*, 2010). Криогенное хранение может существенно продлевать жизнь короткоживущим семенам орхидей, устойчивым к замораживанию в жидком азоте (Vendrame *et al.*,

2014). Однако планирование долговременного сохранения конкретных семенных образцов связано не только с анализом их всхожести до и после замораживания в жидком азоте, но и с изучением их морфологических и физиологических особенностей (Левицкая, 2014, 2015, 2017). Мы определяли долю семян без зародышей, влажность, долю семян, окрашенных формазаном (ТТХ-тест), а также всхожесть *in vitro* до и после замораживания в жидком азоте у семян пальчатокоренников трех экспериментальных образцов.

На первом этапе семенные образцы исследовали с помощью оптических приборов и цифровой техники, подсчитывали число семян без зародышей в фиксированных выборках из каждого коллекционного образца. Интересно, что для большинства видов орхидей процедуру отделения семян с зародышами от семян без зародышей методом флотации часто невозможно выполнить из-за их строения, минимальной массы и высокой плавучести (Arditti, Ghani, 2000). В связи с

Таблица 3. Морфометрические особенности семян (300 шт. в каждом образце 1–3) пальчатокоренников *Dactylorhiza* spp.

Характеристика образца	<i>D. baltica</i>		<i>D. maculata</i>
	1	2	3
Средняя длина семени ± доверительный интервал, 10 ⁻⁶ м	1000* ± 120	990* ± 24	841* ± 26
Средняя длина зародыша ± доверительный интервал, 10 ⁻⁶ м	150* ± 110	170* ± 66	213* ± 14
Доля длины зародыша, % длины семени	15**	17**	25**

Примечание. * – критерий Стьюдента 2 при β > 0.95; ** – критерий Фишера 3.9 для оценки разности долей при β > 0.95.

Таблица 4. Характеристики семян (100 шт. из разных коллекционных образцов), %

Характеристика	Образцы семян		
	1	2	3
Доля семян с зародышем	88	92	90
Влажность	9	10	12
Доля зародышей, окрашенных формазаном (ТТХ-тест до замораживания)	60	62	51
Всхожесть <i>in vitro</i> до замораживания	80	90	61
Всхожесть <i>in vitro</i> после воздействия жидкого азота	74	79	60

Примечание. Для оценки разности выборочных долей использован критерий Фишера при $\beta > 0.95$. ТТХ – трифенилтетразольный хлорид.

Таблица 5. Сравнение характеристик семенных образцов

Характеристика	Сравниваемые пары образцов					
	1–2		2–3		1–3	
Различия	+	–	+	–	+	–
Морфология семян (табл. 4)	0	2	2	0	2	0
Физиология семян (табл. 5)	1	4	2	3	2	3
Сумма оценок	1	6	4	3	4	3

Примечание. “+” – наличие различий, “–” – отсутствие различий.

этим при оценке всхожести и криоустойчивости семян из анализируемых образцов доля фракции семян без зародышей не была учтена, тем более, что по этому показателю не было обнаружено достоверных различий между образцами (табл. 4).

Второй этап анализа связан с определением влажности семян, подготовленных к криогенному замораживанию. Количество свободной воды во всех семенных образцах не превышало 12%, причем достоверных различий по влажности между образцами выявлено не было (табл. 4). Однако необходимо отметить, что применение стандартного весового метода для оценки содержания воды в семенах, собранных от дикорастущих орхидей, как правило, невозможно из-за очень малой массы образцов.

ТТХ-тест (Cottrell, 1947; Lakon, 1949; Bulat, 1961) как одну из разновидностей витального окрашивания биологического материала мы использовали для дополнительной оценки жизнеспособности семян перед криогенным замораживанием (третий этап). В случайном отобранном пробах было обнаружено 51–62% семян, у которых зародыши восстанавливали ТТХ до красного формазана. Однако достоверных различий по этому показателю в анализируемых образцах обнаружено не было (табл. 4).

На четвертом этапе исследований определяли всхожесть, или долю семян, сформировавших *in vitro* протокормы на агаризованной питатель-

ной среде до замораживания в жидком азоте. В результате было обнаружено, что доля проросших семян пальчатокоренника пятнистого (образец 3) была достоверно меньше, чем в первом ($\beta > 0.99$) и втором ($\beta > 0.999$) образцах, принадлежащих к пальчатокореннику балтийскому. В то же время семена *D. baltica* из второго образца формировали существенно больше протокормов, чем семена этого же вида из первого образца ($\beta > 0.95$). Таким образом, показано, что все исследованные образцы семян до замораживания различались по всхожести *in vitro* с вероятностью 95% (табл. 4).

На пятом этапе мы оценивали криоустойчивость семян. Основным критерием пригодности коллекционных образцов для криосохранения мы считаем показатель их посткриогенной всхожести, получаемый экспериментальным путем. Однако при оценке криоустойчивости образцов необходимо учитывать и те изменения всхожести, которые вызывает замораживание растительного материала в жидком азоте. Было обнаружено, что после замораживания в жидком азоте в образце 2 семена снизили всхожесть на 11% ($\beta > 0.95$). В образцах 1 и 3 после криогенного воздействия параметры всхожести были снижены незначительно. Значения посткриогенной всхожести семян *D. baltica* из образцов 1 и 2 существенно не различались (табл. 4), но для семян образца 3 они были достоверно ниже ($\beta > 0.95$), как и значения до замораживания. Таким образом, показано, что в образце 2 доля семян, содержащих зародыши, была

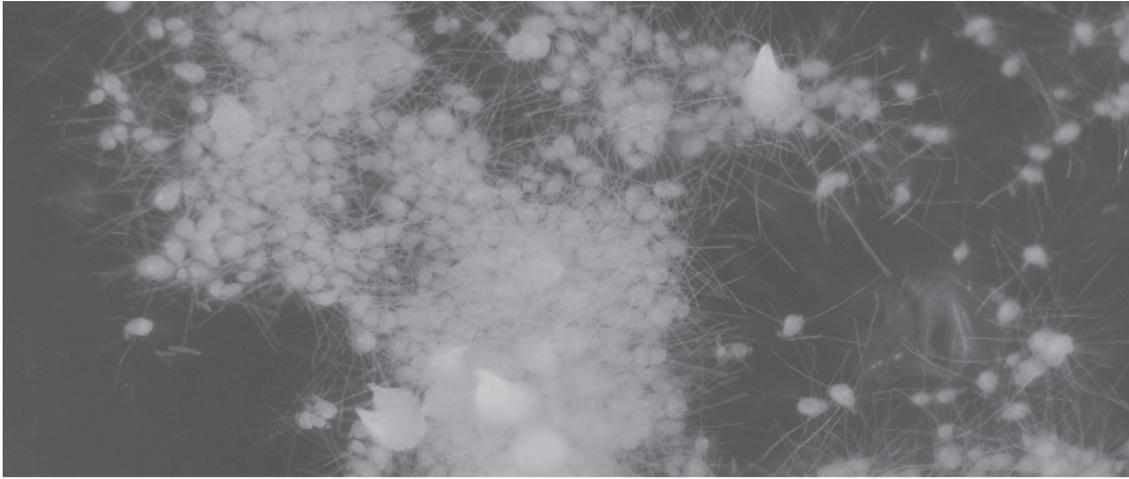


Рис. 2. Протокормы *Dactylorhiza baltica* на mVM-среде, сформированные *in vitro* из семян образца 2 после замораживания в жидком азоте.

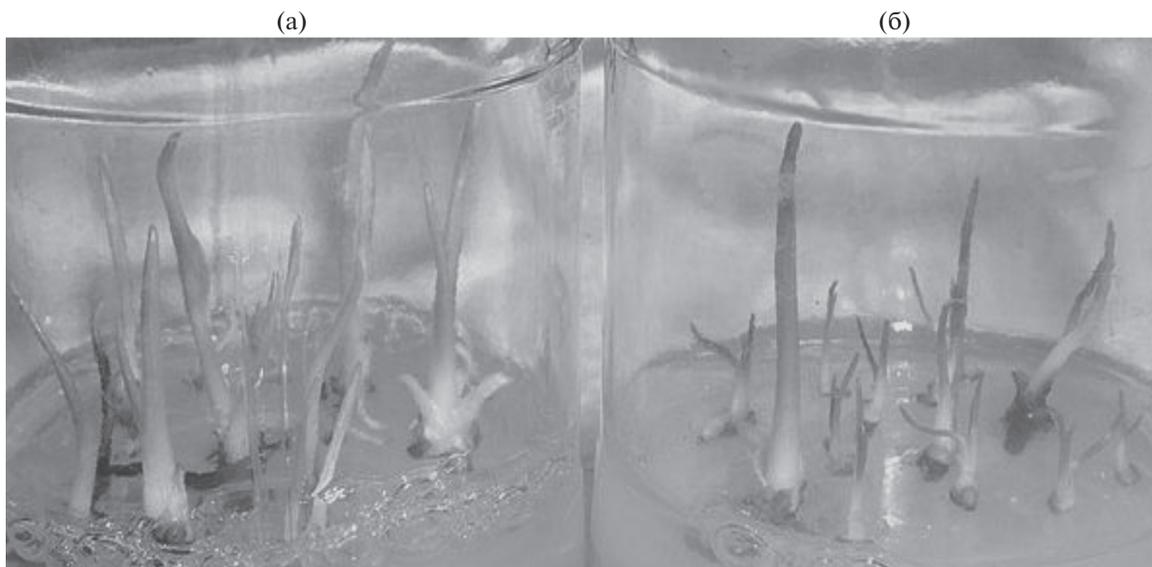


Рис. 3. Однолетние сеянцы *Dactylorhiza baltica* на mMS-среде, сформированные *in vitro* из семян образца 2. а – без замораживания, б – после замораживания в жидком азоте.

самой высокой, как и показатель окрашивания зародышей формазаном. Более того, при средних значениях влажности семена образца 2 демонстрировали самую высокую всхожесть как до, так и после криогенного замораживания (табл. 4, рис. 2, 3). Однако и уменьшение всхожести после замораживания у семян этого образца наблюдали также достоверно высокое. Следовательно, на фоне высокого качества семян образца 2 доказана отрицательная их реакция на замораживание в жидком азоте. В связи с этим исследования влияния длительного криосохранения на семена именно этого образца могут дать интересные результаты.

Комплексная оценка семенных образцов. Данные использованных нами лабораторных методов анализа семенных образцов, обобщенные в табл. 5, свидетельствуют о том, что семена пальчатокоренника балтийского из России (образец 1) и из Беларуси (образец 2) различаются только по одному из исследованных признаков. В то же время семена образца 3 *D. maculata* отличаются от них по четырем из семи признаков. Таким образом, мы полагаем, что растения, с которых были собраны семена на юге Московской обл., могут быть отнесены к виду пальчатокоренника балтийского *D. baltica*, тем более, что эти растения были выбраны для эксперимента по классиче-

ским ботаническим признакам принадлежности к виду в соответствии с ранее опубликованными данными (табл. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимость дополнительного изучения образцов растительного материала, сохраняемого в специализированных коллекциях или криобанках, часто возникает потому, что в полевых условиях не всегда возможно строго определить видовую принадлежность и происхождение семян многих орхидей. В связи с этим мы составили и экспериментально проверили наиболее простую схему изучения семенных образцов двух близких видов пальчатокоренников из криобанка ИФР РАН. В результате было показано, что образцы пальчатокоренника балтийского, собранные в разных местах произрастания, имеют в основном сходные характеристики, а семена *D. baltica* существенно отличаются от семян *D. maculata*. Кроме того, в ходе эксперимента были получены многочисленные сеянцы этих двух видов орхидей, которые можно использовать для проведения генетических и физиологических исследований, селекции, размножения растительного материала *in vitro* и последующей реинтродукции его в места естественного произрастания.

Чрезвычайно важно, что именно использование технологии криосохранения в сочетании с культивированием растительного материала *in vitro* помогает оптимизировать и синхронизировать процесс анализа разнообразных образцов и создает условия для проведения широкомасштабных генетических исследований растительного материала, собранного в разных местах произрастания в разное время. Таким образом, основу для будущих филогенетических и таксономических исследований редких видов орхидей может обеспечить коллекционирование растительного материала в криобанках. В настоящий момент в криобанке ИФР РАН сохраняют семенные образцы восьми видов пальчатокоренников, идентифицированных при сборе материала как *D. baltica*, *D. maculata*, *D. incarnata*, *D. fuchsii*, *D. majalis*, *D. praetermissa*, *D. triphylla* и *D. ochroleuca*. Мы планируем регулярно пополнять эту коллекцию новыми образцами различного происхождения в целях сохранения в жидком азоте семенного материала редких и исчезающих видов орхидей, в том числе занесенных в Красную книгу РФ и другие Красные книги.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы президиума РАН “Живая природа”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Аверьянов Л.В. *Dactylorhiza maculata* (Orchidaceae) на территории СССР // Ботан. журн. 1982. Т. 67. № 3. С. 303–312.

- Аверьянов Л.В. Род *Dactylorhiza* (Orchidaceae) в СССР // Ботан. журн. 1983а. Т. 68. № 7. С. 889–895.
- Аверьянов Л.В. Род *Dactylorhiza* (Orchidaceae) в СССР // Ботан. журн. 1983б. Т. 68. № 9. С. 1160–1167.
- Аверьянов Л.В. Орхидные (Orchidaceae) средней России // Turczaninowia. 2000. Т. 3. № 1. С. 30–53.
- Вахрамеева М.Г., Варлыгина Т.И., Татаренко И.В. Орхидные России (биология, экология, охрана). М.: КМК, 2014. 437 с.
- Ефимов П.Г. Исследования генетического полиморфизма *Dactylorhiza baltica*, *D. fuchsia* и *D. incarnata* (Orchidaceae) из северо-запада Европейской части России методом ISSR // Ботан. журн. 2012. Т. 97. № 6. С. 751–761.
- Куликов П.В., Филиппов Е.Г. О наличии *Dactylorhiza baltica* (Klinge) Orlova во флорах Урала и Западной Сибири // Бюл. Моск. об-ва испытателей природы. Отд. биол. 1999. Т. 104. Вып. 2. С. 29–33.
- Левицкая Г.Е. Влияние температуры хранения на семена дикорастущих видов. 1. Семена с вынужденным покоем и неглубоким физиологическим покоем // Растит. ресурсы. 2014. Т. 50. № 4. С. 534–548.
- Левицкая Г.Е. Влияние температуры хранения на семена дикорастущих видов. 2. Семена с физиологическим покоем на примере рода *Campanula* (Campanulaceae) // Растит. ресурсы. 2015. Т. 51. № 1. С. 38–51.
- Левицкая Г.Е. Влияние температуры хранения на семена дикорастущих видов. 3. Семена с морфологическим и морфофизиологическим покоем // Растит. ресурсы. 2017. Т. 53. № 1. С. 39–50.
- Никишина Т.В., Попов А.С., Коломейцева Г.Л., Головкин Б.Г. Влияние криоконсервации на прорастание семян редких тропических орхидей // Физиология растений. 2001. Т. 48. № 6. С. 930–936.
- Никишина Т.В., Вахрамеева М.Г., Варлыгина Т.И., Павлов В.Н., Широков А.И., Буров А.В., Попович Е.А., Попов А.С. Криосохранение семян редких российских орхидей // Докл. РАН. 2006. Т. 408. № 1. С. 136–138.
- Никишина Т.В., Попова Е.В., Вахрамеева М.Г., Варлыгина Т.И., Коломейцева Г.Л., Буров А.В., Попович Е.А., Широков А.И., Шумилов В.Ю., Попов А.С. Криосохранение семян и протокормов редких растений умеренного климата // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 1. С. 137–143.
- Плохинский Н.А. Математические методы в биологии. М.: Изд-во МГУ, 1980. 150 с.
- Филиппов Е.Г., Андропова Е.В. Особенности генетической структуры некоторых видов рода *Dactylorhiza* в России // Матер. III Всерос. науч.-практ. конф. “Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира”. Волгоград: AVATARS, 2010. С. 356–360.
- Филиппов Е.Г., Андропова Е.В. Особенности генетической дифференциации представителей родов *Dactylorhiza*, *Cypripedium* и *Orchis* по данным изоферментного анализа // Матер. IX Междунар. науч. конф. “Охрана и культивирование орхидей”. М.: КМК, 2011. С. 451–461.
- Филиппов Е.Г., Андропова Е.В. Генетическая структура популяций и естественная гибридизация *Dactylorhiza sa-*

- lina* и *D. incarnata* (Orchidaceae) // Генетика. 2017. Т. 53. № 3. С. 310–323.
- Филиппов Е.Г., Андронова Е.В., Козлова О.Н., Фоменко Т.И. Особенности генетической структуры популяций представителей рода *Dactylorhiza* на территории Республики Беларусь по данным изоферментного анализа // Матер. X Междунар. науч. конф. “Охрана и культивирование орхидей”. Минск: Рэйплац, 2015. С. 250–255.
- Andronova E.V., Kulikov P.V., Philippov E.V., Vasilyeva V.E., Batygina T.B. Problems and perspectives of *in vitro* seed propagation in orchids of temperate zone // Embryology of Flowering Plants. Terminology and Concepts. Reproductive Systems / Ed. Batygina T.B. USA, Enfield: Sci. Publ., 2009. V. 3. P. 367–375.
- Arditti J., Ghani A.K.A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications: Tansley Rev. № 110 // New Phytologist. 2000. V. 145. P. 367–421.
- Bulat H. Reduktionsvorgänge in lebendem Gewebe, Formazane, Tetrazoliumsalze and ihre Bedeutung als Redoxindikatoren im ruhenden Samen // Proc. Int. Seed Test. Ass. 1961. V. 26. P. 686–696.
- Calevo J., Giovannini A., Cornara L., Peccenini S., Monroy F. *Orchis patens* Desf.: seed morphology of an endangered Mediterranean orchid // Plant Biosyst. 2017. V. 151. P. 770–774.
- Cottrell H.J. Tetrazolium salt as a seed germination indicator // Nature, Lond. 1947. V. 159. P. 748.
- De Hert K., Jacquemyn H., Van Glabeke S., Roldán-Ruiz I., Vandepitte K., Leus L., Honnay O. Patterns of hybridization between diploid and derived allotetraploid species of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) co-occurring in Belgium // Am. J. Bot. 2011. V. 98. P. 946–955.
- De Hert K., Jacquemyn H., Van Glabeke S., Roldán-Ruiz I., Vandepitte K., Leus L., Honnay O. Reproductive isolation and hybridization in sympatric populations of three *Dactylorhiza* species (Orchidaceae) with different ploidy levels // Ann. Bot. 2012. V. 109(4). P. 709–720.
- Devos N., Oh S.H., Raspé O., Jacquemart A.L., Manos P.S. Nuclear ribosomal DNA sequence variation and evolution of spotted marsh-orchids (*Dactylorhiza maculata* group) // Mol. Phylogenet. Evol. 2005. V. 36(3). P. 568–580.
- Devos N., Raspé O., Oh S.H., Tyteca D., Jacquemart A.L. The evolution of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) allotetraploid complex: insights from nrDNA sequences and cpDNA PCR-RFLP data // Mol. Phylogenet. Evol. 2006. V. 38(3). P. 767–778.
- Hedrén M. Genetic differentiation, polyploidization and hybridization in Northern European *Dactylorhiza* (Orchidaceae) // Plant Systemat. Evol. 1996. V. 201. P. 31–55.
- Hedrén M. Systematics of the *Dactylorhiza* euxina/incarnate/maculate polyploidy complex (Orchidaceae) in Turkey: evidence from allozyme data // Plant Systemat. Evol. 2001. V. 229. P. 23–44.
- Hedrén M., Nordstr S., Pedersen H.A., Ståhlberg D. Systematics and conservation genetics of *Dactylorhiza majalis* ssp. *elatior* (Orchidaceae) on Gotland // Nordic J. Bot. 2012. V. 30. P. 257–272.
- Jakobsone G., Belogradova I.R., Daina M.D. *Dactylorhiza baltica* *in vitro* and *in vivo* // Acta Biol. Univ. Daugavp. 2012. V. 12(2). P. 151–165.
- Kameswara R.N., Dulloo M.E., Engels J.M.M. A review of factors that influence the production of quality seed for long-term conservation in genebanks // Genet. Res. Crop Evol. 2017. V. 64. P. 1061–1074.
- Lakon G. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds // Plant Physiol. Landcaster. 1949. V. 24. P. 389–394.
- Li D.Z., Pritchard H.W. The science and economics of *ex situ* plant conservation // Trends Plant Sci. 2009. V. 14. P. 614–621.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15(4). P. 473–497.
- Obara-Okeyo P., Kako S. *In vitro* and *in vivo* characterization of *Cymbidium* cultivars by isozyme analysis // J. Horticult. Sci. 1997. V. 72(2). P. 263–270.
- Paun O., Bateman R.M., Fay M.F., Hedrén M., Civeyrel L. Stable epigenetic effect impact adaptation in allopolyploid orchids (*Dactylorhiza*, Orchidaceae) // Mol. Biol. Evol. 2010. V. 27(11). P. 2465–2473.
- Pillon Y., Fay M.F., Shipunov A.B., Chase M.W. Species diversity versus phylogenetic diversity: A practical study in the taxonomically difficult genus *Dactylorhiza* (Orchidaceae) // Biol. Conserv. 2007. V. 129. P. 4–13.
- Pillon Y., Fay M.F., Hedrén M., Bateman R.M., Devay D.S., Shipunov A.B., van der Bank M., Chase M.W. Evolution and temporal diversification of western European polyploidy species complexes in *Dactylorhiza* (Orchidaceae) // Taxon. 2006. V. 56(4). P. 1185–1208.
- Ponert J., Vosolsobě S., Kmecová K., Lipavská H. European orchid cultivation – from seed to mature plant // Eur. J. Environ. Sci. 2011. V. 1(2). P. 95–107.
- Popova E.V., Kim H.H., Saxena P.K., Engelmann F., Pritchard H.W. Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity // Biotech. Adv. 2016. V. 34. P. 380–403.
- Pritchard H.W. Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seeds // CryoLett. 1984. V. 5. P. 295–300.
- Pritchard H.W. The latent life of seeds: from fundamental principles to risk management // Cryobiology. 2007. V. 55(3). P. 353.
- Pritchard H.W., Kranner I., Nadarajan J. FROZEN PLANET – The biobanking of plants // Cryobiology. 2010. V. 61(3). P. 366–367.
- Roberts E.H. Predicting the storage life of seed // Seed Sci. Technol. 1973. V. 1. P. 499–514.
- Roberts E.H. Physiological aspects of *ex situ* seed conservation // Eds. Vijay P.K., White J. A training manual for biological diversity and genetic resources. London: Comm. Secretariat, 1992. P. 171–177.
- Seaton P.T., Kendon J.P., Pritchard H.W., Puspitaningtyas D.M., Marks T.R. Orchid conservation: the next ten years // Lankesteriana. 2013. V. 13(1–2). P. 93–101.
- Shipunov A.B., Fay M.F., Chase M.W. Evolution of *Dactylorhiza baltica* (Orchidaceae) in European Russia: evidence from molecular markers and morphology // Bot. J. Linn. Soc. 2005. V. 147(3). P. 257–274.

- Shipunov A.B., Fay M.F., Pillon Y., Bateman R.M., Chase M.W. *Dactylorhiza* (Orchidaceae) in European Russia: combined molecular and morphological analysis // *Am. J. Bot.* 2004. V. 91(9). P. 1419–1426.
- Ståhlberg D., Hedrén M. Evolutionary history of the *Dactylorhiza maculata* polyploid complex (Orchidaceae) // *Biol. J. Linn. Soc.* 2010. V. 101. P. 503–525.
- Tsutsumi C., Yukawa T., Lee N.S., Lee C.S., Kato M. Phylogeny and comparative seed morphology of epiphytic and terrestrial species of *Liparis* (Orchidaceae) in Japan // *J. Plant Res.* 2007. V. 120. P. 405–412.
- Vakhrameeva M.G., Tatarenko I.V., Varlygina T.I., Torosyan G.K., Zagulski M.N. Orchids of Russia and adjacent countries (within the borders of the former USSR). Koenigstein: A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2008. 690 p.
- Van Waes J.M., Debergh P.C. *In vitro* germination of some Western European orchids // *Physiol. Plant.* 1986. V. 67(2). P. 253–261.
- Vendrame W., de Faria R.T., Sorace M., Sahyun S.A. Orchid cryopreservation // *Ciênc. Agrotecnol. Lavras.* 2014. V. 38. P. 213–229.
- Wood C.B., Pritchard H.W., Miller A.P. Simultaneous preservation of orchid seed and its fungal symbiont using encapsulation–dehydration is dependent on moisture content and storage temperature // *CryoLett.* 2000. V. 21. P. 125–136.
- Yam T.W., Arditti J., Cameron K.M. “The orchids have been a splendid sport” – An alternative look at Charles Darwin’s contribution to orchid biology // *Am. J. Bot.* 2009. V. 96(12). P. 2128–2154.
- Yu-Yun Hsiao, Zhao-Jun Pan, Chia-Chi Hsu, Ya-Ping Yang, Yi-Chin Hsu, Yu-Chen Chuang, Hsing-Hui Shih, Wen-Huei Chen, Wen-Chieh Tsai, Hong-Hwa Chen. Research on orchid biology and biotechnology // *Cell Physiol.* 2011. V. 52(9). P. 1467–1486.

The Study of *Dactylorhiza* Seeds (*D. baltica*, *D. maculata*) from Orchid Collection of the Cryobank at the Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences

T. V. Nikishina¹, O. N. Kozlova², G. E. Levitskaya³, and O. N. Vysotskaya^{1, #}

¹Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, ul. Botanicheskaya 35, Moscow, 127276 Russia

²State Scientific Institution of Central Botanical Garden, NASB, ul. Surganova 26, Minsk, 220012 Republic of Belarus

³Institute of Cell Biophysics RAS, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

#e-mail: cryo@ippras.ru

Seed specimens of two orchid species from the *Dactylorhiza* genus *D. baltica* and *D. maculata* collected in Belarus and in Russia and placed in the cryobank at the Timiryazev Institute of Plant Physiology for long-term preservation into liquid nitrogen were studied. The complex quality evaluation of collection specimens was carry out by using of viability rating of seeds and also their morphometric and physiology characteristics. It is shown that comprehensive study of seed specimens collected from different habitats at different times may be synchronized by applying of cryopreservation technique and *in vitro* method for plant material cultivation.