

Культивирование видов *Cypripedium* L. *in vitro* и доращивание их в условиях *ex vitro*

Cultivation of *Cypripedium* L. species *in vitro* and growing them *ex vitro*

Коновалова Т. Ю., Молканова О. И.

Konovalova T. Yu, Molkanova O. I.

Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, г. Москва, Россия. E-mails: konovtat@mail.ru, molkanova@mail.ru
Tsitsin Main Botanical Garden of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Реферат. Описано асимбиотическое проращивание семян 10 видов рода *Cypripedium* L. Были опробованы несколько методов стерилизации семян и различные модификации питательных сред Harvais, Chu and Mudge, Norstog, Malmgren. Изучалась способность сеянцев, полученных *in vitro*, к адаптации при высадке в открытый грунт. Описаны результаты интродукции 17 видов венерина башмачка в Подмосковье.

Ключевые слова. Асимбиотическое семенное размножение, венерин башмачок, интродукция, проращивание *in vitro*.

Summary. Asymbiotic seed germination *in vitro* of 10 species of the genus *Cypripedium* L. is described. Several methods of seed sterilization and some modifications of Harvais, Chu and Mudge, Norstog, Malmgren growth media were tested. Adaptation ability in the open ground of the seedlings obtained *in vitro* was investigated. In addition, the results of introduction of 17 cypripedium species in Moscow region are listed.

Key words. Asymbiotic seed propagation, *Cypripedium* species, *in vitro* germination, introduction of cypripediums.

Введение природных орхидей в культуру позволяет не только расширить ассортимент декоративных растений, но и способствует сохранению естественных популяций редких видов. Особое значение имеет разработка эффективных методов размножения для получения посадочного материала, который в дальнейшем можно высаживать в садах или использовать для реинтродукции в природу.

В Главном ботаническом саду РАН (г. Москва) работа по размножению орхидей открытого грунта методом асимбиотических посевов *in vitro* начата в 2000 г. Одним из объектов исследований являются представители рода венерин башмачок (*Cypripedium* L.). Работа включает испытание способов и режимов предпосевной обработки семян, выявление оптимальных сред для их прорастания и дальнейшего развития сеянцев, изучение температурного режима содержания посевов, а также возможностей адаптации сеянцев к нестерильным условиям и пересадки их в грунт.

Неоднократно высевались семена 10 видов: *Cypripedium calceolus* L., *C. flavum* P. F. Hunt et Summerh., *C. guttatum* Sw., *C. macranthon* Sw., *C. montanum* Douglas ex Lindl., *C. parviflorum* Salish., *C. reginae* Walt., *C. tibeticum* King ex Rolfe, *C. ventricosum* Sw., *C. yatabeanum* Mak. Все венерины башмачки являются охраняемыми растениями, а ряд видов – *Cypripedium calceolus*, *C. macranthon*, *C. ventricosum* и *C. yatabeanum*, – включены в Красную книгу РФ (Варлыгина, Вахрамеева, 2008). *Cypripedium calceolus*, *C. guttatum*, *C. macranthon* и *C. ventricosum* имеют обширные ареалы в лесной зоне России, в том числе распространены и в Южной Сибири.

Изначально для посевов брали зрелые семена, полученные по большей части с интродуцированных растений, а для *Cypripedium calceolus* из природных популяций Подмосковья, и, в меньшей степени, использовали материал, полученный по обмену из других ботанических садов. Для стерилизации и химической скарификации семян применяли обработку 1,5%-м и 2%-м растворами серной кислоты в течение 10 мин с последующей стерилизацией от 15 до 90 мин 25%-м раствором бытового отбеливателя «Белизна», действующим веществом которого является гипохлорит натрия, или только обработ-

ку «Белизной» с последующей промывкой стерильной дистиллированной водой. Семена высевали на стерильные питательные среды согласно принятым методикам (Chu, Mudge, 1996; Steele, 1996). Опробовали питательные среды: Harvais с картофелем (56 г сырого картофеля на 1 л среды); среда Chu and Mudge (1/3 MS с добавкой кокосовой воды 100 мл/л и 15 г/л сахарозы), Malmgren с заменой вамина на аналогичный препарат аминостерил (все макросоли по 80 мг, сахароза 15 г, аминостерил 3 мл, витамины по MS 1мл на 1 л среды) с ананасовым соком 15 мл/л; Malmgren с заменой ананасового сока на картофель – 56 г/л; S Norstog (Chu et al., 1996; Malmgren 1996; Steele, 1996). Использовали варианты сред без гормонов, с кинетином и с кинетином 1,2 и 2,4 мг/л, НУК, 2,4 Д в различных пропорциях и сочетаниях. рН перед автоклавированием доводили до 6,0–6,5.

Посевы держали в темноте при температуре +3... +4 °С в течение 3 месяцев, а затем переносили в помещение с температурой +20... +23 °С. Прорастание начиналось через 5–7 месяцев после посева. Так как ежегодно высевалось несколько десятков образцов многочисленных и крайне мелких семян, всхожесть оценивалась визуально: отсутствие всходов, единичные, редкие, многочисленные и сплошные всходы. Проращивание видов рода *Cypripedium* зрелыми семенами оказалось затруднительным. Лучшие результаты получены при обработке семян *Cypripedium* 10 мин 1,5%-й серной кислотой 15–25 мин 25%-й «Белизной»; при стерилизации «Белизной» свыше 30 мин всхожесть снижалась. Прорастание *C. calceolus* начиналось через 7 месяцев после посева и только на питательных средах с кинетином: Harvais kin 1,2 и 2,4 мг/л и особенно Norstog kin 2,4 мг/л. Всхожесть варьировала от единичных до многочисленных всходов. *C. guttatum* прорастал на питательных средах Chu and Mudge и Harvais без гормонов и с кинетином 1,2 мг/л. Самым удачным был безгормональный вариант на среде Chu and Mudge. Семян *C. reginae* было получено крайне мало, прорастание наблюдалось на питательной среде Harvais kin 1,2 мг/л. *C. macranthon* давал единичные всходы при самой жесткой стерилизации (10 мин 4%-й серной кислотой и 15 минут «Белизной») на среде Harvais с кинетином 1,2 мг/л и без.

Так как посевы зрелыми семенами давали нестабильные и непредсказуемые результаты, с 2005 г. перешли на незрелые семена. Зелеными семенами (из недозрелых коробочек) высевали: *Cypripedium calceolus*, *C. flavum*, *C. guttatum*, *C. macranthon*, *C. montanum*, *C. parviflorum*, *Cypripedium reginae*, *C. tibeticum*, *C. ventricosum*, *C. yatabeanum*. При посеве семян из зеленых коробочек важно правильно определить стадию развития семени, так как на слишком ранней зародыши недоразвиты, а на поздней уже накапливаются ингибиторы прорастания. Практически это достижимо при наличии коллекции башмачков, с которой можно брать коробочки через 2–3 дня. Ряд авторов считает, что достаточно от 30 до 45 дней после опыления (Мамаев и др., 2004). Но более поздние сроки посева (45–60 дней) предпочтительны, так как впавшие в покой семена можно поместить на стратификацию в холодильник, как при посевах зрелыми. Таким образом, теряется время, но не пропадает растительный материал. Для улучшения завязывания коробочек и для того, чтобы иметь более точную дату опыления, башмачки массово опыляли вручную. Последние два сезона проводили также межвидовую гибридизацию, и было высеяно большое количество гибридных семян, полученных при опылении *Cypripedium ventricosum*, который считается самостерильным, родительскими видами – *Cypripedium calceolus*, *C. macranthon*, а также гибридов *C. flavum* и *C. macranthon*, *C. flavum* и *C. reginae*. В некоторых случаях семена завязывались и при взаимном опылении различных клонов *Cypripedium ventricosum*, дальневосточного происхождения, которые отличаются большим разнообразием окрасок и, вероятно, генетически очень неоднородны.

Зеленые коробочки легко поверхностно стерилизуются неразбавленной «Белизной» и обжигом со спиртом и вскрываются в ламинаре. Всходы появляются в течение недели, начиная со второго – третьего дня после посева. Для посевов использовались те же среды и их модифицированные версии с применением этилендиаминтетраацетата железа 30 мг/л, а также последние 2 года модифицированная питательная среда Malmgren с органическим азотом (Orchid propagation, <http://www.lidafortsgarden.com/Orchids/engelsk.htm>), где гидролизат казеина заменялся на мицеллярный казеин спортивного питания. Были получены массовые всходы *Cypripedium calceolus*, *C. guttatum*, *C. macranthon*, *C. ventricosum*, *C. flavum*, *C. reginae*, а также гибридов на всех выше упомянутых средах.

Питательные среды Harvais с картофелем и Chu and Mudge по многолетним данным оказались лучшими для прорастания башмачков и развития их всходов, а кинетин более эффективным стимуля-

тором прорастания, чем НУК и 2,4D. Но и последние опыты с посевами на среду Malmgren с казеином оказались удачными.

При использовании сред с цитокининами и ауксинами образовавшиеся протокормы пересаживаются на аналогичные безгормональные среды. После 3–4 месяцев доращивания при комнатной температуре в верхних частях протокормов закладываются апексы будущих побегов, а в базальных – внедряются в субстрат корневища с придаточными корнями. Есть трудности с доращиванием всходов башмачков *in vitro*. Проростки *Cypripedium* могут выделять фенольные соединения, вызывающие потемнение среды, и нуждаются в регулярной пересадке. Но даже при частом пассировании может наблюдаться гибель семян на разных стадиях развития – от мелких протокормов до проростков со сформированным корневищем с корнями и хорошо заметным побегом. Причем в одном сосуде могут находиться как здоровые, так и гибнущие семена. Выпад при доращивании *in vitro* для *Cypripedium* составлял от 0 до 90 %, что свидетельствует как о недостаточной изученности их потребностей, так и о генетическом разнообразии семян. Использование сред с активированным углем отчасти помогает справиться с этой проблемой. Выделение фенолов обычно усиливается при помещении семян в холодильник, после нескольких месяцев доращивания их при комнатной температуре, что необходимо для нормального развития растений. Ряд авторов предлагает снимать семена со среды и держать их в стерильных пластиковых контейнерах (Chu et al., 1996; Seaton et al., 2011). Мы помещали всходы для вернализации в стерильный, слегка увлажненный перлит в холодильник с температурой 4 °C на 3 месяца для прохождения периода покоя. К концу этого периода у семян наблюдали активацию ростовых процессов и появление первого листа. После вернализации семена *Cypripedium calceolus*, *C. flavum*, *C. macranthon*, *C. reginae*, *C. ventricosum* высаживались в первой половине лета в ящики с нестерильным субстратом для дальнейшего подращивания. В качестве субстрата использовали смесь суглинка, нейтрализованного верхового торфа, перлита и песка, а также сосновой коры, перлита и песка в равных пропорциях. Ящики помещали в тень и накрывали нетканым материалом для уменьшения испарения влаги. Из-за несинхронного развития семян в ряде случаев вместе с крупными попадались семена с недифференцированным побегом. При посадке в грунт легче приживаются семена в возрасте 1,5–2 лет с зеленым листом. Однако 40–60 % из них выпадают в первую зиму. Растения, пережившие первую зиму в грунте, в дальнейшем успешно развивались.

Некоторые авторы считают устойчивыми в культуре *Cypripedium calceolus*, *C. guttatum*, *C. macranthon*, *C. ventricosum* (Мамаев и др., 2004; Широков и др., 2005; Ключикова, 2007). В странах с умеренным климатом выращивается около 20 видов и большое количество гибридов венериных башмачков (Tullock, 2005; Seaton et al., 2011).

Для содержания взрослых растений используется участок в Подмосковье. Почва – бедный органикой (гумус по Тюрину 4,65 %, подвижный азот 1,47 мг на 100 г) тяжелый суглинок, разрыхленный добавкой крупного песка и некислого торфа и известкованный (рН солевой вытяжки 6,7). Участок окружен крупными лесными деревьями так, что каждая его часть попадает примерно на 1/3 дня в неплотную тень. Башмачки посажены на плоских участках под пологом яблонь, а также на невысоких горках с дренажным слоем из битого кирпича и известняковой щебенки, одна из горок расположена в светлой тени в яблоневом саду, другая полдня освещается солнцем. Из агротехнических мероприятий регулярно выполняется прополка, так как орхидеи не способны конкурировать с мощными сорняками, а в засушливые периоды полив.

Из видов флоры России интродукционное испытание прошли *Cypripedium calceolus* L., *C. guttatum* Sw., *C. macranthon* Sw., *C. shanxiense* S. C. Chen, *C. ventricosum* Sw., *C. yatabeanum* Makino. *C. calceolus* давно в культуре, его куртины при удачно подобранном субстрате способны жить до 100 лет (Rasmussen, 1995). У нас самая старая куртина, происхождением из Владимирской обл., растет на солнечной горке с 1987 г. и значительно разрослась. Самые неприхотливые виды – *C. macranthon* и *C. ventricosum* (образцы и того, и другого из Забайкалья 1993 г. и с Сахалина 2000 г.) стойко держится в тени и полутени и разрастаются, практически без специальных субстратов, даже на тяжелом суглинке. *C. guttatum* (Приморье, 2005 г.) и *C. yatabeanum* (Камчатка, 2004) хорошо живут на рыхлом субстрате в полутени и регулярно цветут. *C. shanxiense* (Сахалин, 2008) выпал.

Кроме отечественных, высаживались виды, происходящие из горных областей Юньнани и Сычуани. *Cypripedium flavum* в нашей коллекции он с 2003 г. Это – один из самых неприхотливых видов,

сравнимых по неприязательности с *C. macranthon*. В природе он распространён в горах Юго-Восточного Тибета, Юньнани и Сычуани на высотах от 2700 до 3700 м над ур. м. Растёт часто большими группами на открытых местах по берегам горных речек, по опушкам хвойных и смешанных лесов, в негустых кустарниках. Встречается на почвах как нейтральных, так и довольно кислых, часто, несмотря на подстилающие их известняковые породы, при этом они рыхлые, богатые листовым перегноем и хорошо увлажненные, но без застоя воды. Нередко растёт в компании с рододендронами, а также другими видами башмачков. (Cribb, 1997) Он вполне зимостоек, регулярно цветёт в конце мая – начале июня и даёт семена. Зимостойкие высокогорные гималайские башмачки: *C. tibeticum* King ex Rolfe, *C. himalaicum* Rolfe, *C. smithii* Schltr., – близкие виды, которые живут у нас более 5 лет, но почти не разрастаются, цветут не так охотно, как *Cypripedium flavum*, возможно, они нуждаются в лучшем освещении. С 2005 г. держится, цветет и медленно разрастается миниатюрный, с ползучими, длинными корневищами, *C. micranthum* Franch., который происходит из горных лесов Сычуани. *C. margaritaceum* Franch. выпал после 5 лет вегетирования в зиму 2009–2010 г., которая началась месяцем бесснежных морозов. Неудачными оказались попытки содержать *C. debile* Rchb., *C. henryi* Rolfe, *C. plectrochilum* Franch.

Из североамериканской флоры в настоящее время имеется только один вид – *C. reginae*, – с 2005 г. Это устойчивый башмачок, зацветающий позже других видов. *C. montanum* Douglas ex Lindl. выпал после двух лет выращивания.

Наш опыт подтверждает мнение других авторов по поводу субстрата башмачков открытого грунта. Большинство видов предпочитает рыхлые, хорошо аэрируемые, хорошо дренированные и довольно бедные органическими веществами почвенные смеси. (Cribb, 1997; Широков и др., 2005; Tullock, 2005; Seaton et al., 2011). Лучше растут в светлой тени, по сравнению с посадками на полном солнце, а в густой тени они хуже цветут. Полезно мульчировать посадки весной листовым перегноем, так как корневища с корнями находятся в верхнем слое почвы и не должны пересыхать. Удачно посаженные образцы обычно самостоятельно завязывают коробочки, а также размножаются вегетативно, в конце августа – начале сентября разросшиеся куртины можно аккуратно делить.

Таким образом, наиболее устойчивыми в культуре в Подмоскowie оказались *Cypripedium calceolus*, *C. flavum*, *C. guttatum*, *C. macranthon*, *C. reginae*, *C. ventricosum* и *C. yatabeanum*.

Благодарности. Работа выполнена в рамках Государственного задания ГБС РАН (№118021490111-5).

ЛИТЕРАТУРА

- Варлыгина Т. И., Вахрамеева М. Г.** *Cypripedium* // Красная книга РФ / отв. ред. Бардунов Л. В., Новиков В. С. – Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – С. 363–367.
- Клюйкова И. С.** Орхидные природной флоры в коллекции ботанического сада Тверского государственного университета. // Вестник Тверского государственного университета. 2007. – Вып. 3, № 7. – С. 183–186.
- Мамаев С. А., Князев М. С., Куликов П. В., Филиппов Е. Г.** Орхидные Урала. – Екатеринбург: УрО РАН, 2004. – 124 с.
- Широков А. И., Коломейцева Г. Л., Буров А. В., Каменева Е. В.** Культивирование орхидей европейской России. – Нижний Новгород, 2005. – 64 с.
- Chu C. C., Mudge K. W.** Propagation and conservation of native Lady's Slipper Orchids (*Cypripedium acaule*, *C. calceolus*, *C. reginae*). // North American terrestrial orchids. Propagation and production. Conference proceedings. – Germantown, Maryland, 1996. –P. 107–112.
- Cribb P.** The Genus *Cypripedium*. – Portland, 1997. – 301 p.
- Malmgren S.** Orchid propagation: Theory and practice. // North American terrestrial orchids. Propagation and production. Conference proceedings. – Germantown, Maryland, 1996. – P. 63–72.
- Malmgren S., Nyström H.** Orchid propagation. [Electronic resource]. URL: <http://www.lidaforsgarden.com/Orchids/engelsk.htm> (Assessed 12 February 2020)
- Rasmussen H. N.** Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant. – Cambridge University Press, 1995. – 444 p.
- Seaton P., Cribb P., Ramsay M., Haggard J.** Growing hardy orchids. – Royal Botanical Gardens, Kew, 2011. – 128 p.
- Steele K. W.** Large scale seedling production of North American *Cypripedium* species. // North American terrestrial orchids. Propagation and production. Conference proceedings. – Germantown, Maryland, 1996. – P. 11–26.
- Tullock J.** Growing hardy orchids. – Portland, 2005. – 244 p.