

ИЗУЧЕНИЕ ЭНДОФИТНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ ОРХИДНЫХ РАСТЕНИЙ

Упоров Роман Александрович, Саранчин Евгений Павлович
Тюменская область, г. Тюмень, ФГКОУ
«Тюменское президентское кадетское училище»

Аннотация. Предлагаемое исследование посвящено изучению микромицетов содержащихся и, вероятно выполняющих неоднозначную роль в корневой системе растений семейства Орхидные. Изучены шесть видов этого семейства из 30 обитающих в Тюменской области. Это Дремлик лесной (*Epipactis helleborine*), Дремлик темно-красный (*Epipactis atrorubens*), Дремлик болотный (*Epipactis palustris*), Гнездоцветка клобучковая (*Hemipilia cucullata*), Любка двулистная (*Platanthera bifolia*) и Скрученник китайский (*Spiranthes sinensis*). Автор изучил возможные места обитания этих растений и самостоятельно зарегистрировал находки в международной системе iNaturalist. Микромицеты выращивались на селективной среде Сабуро на основе подземных частей растений. Удалось выделить чистые культуры микромицетов и зафиксировать их морфологические и мицелиальные характеристики. В перспективе, возможно выделение изолятов эндофитных микромицетов и получение из них биологически активных вторичных метаболитов.

Ключевые слова: Орхидные, Тюменская область, эндофитные микромицеты, консорциативные взаимодействия.

Введение

Орхидные или Ятрышниковые (Orchidaceae) – крупнейшее семейство однодольных растений насчитывающие, по разным источникам, от 25 до 28 тыс. видов. В России, согласно последним исследованиям [1], обитает около 125 видов этого семейства. В определителе растений Тюменской области В.А. Глазунова с соавт. [2] описано 30 видов ятрышниковых. История и направление изучения орхидных подробно описаны в вышеуказанной монографии [1]. Одно из направлений их изучения, а именно, способность к созданию консорциумных связей с микоризообразующими грибами, также изучались различными учёными [3,4]. Эти исследования несут в себе два перспективных направления. Знания о симбиотических или иных связях редких орхидных растений с различными микроорганизмами позволяет решить проблему выращивания краснокнижных видов *in vitro* и возможного восстановления их популяций. С другой стороны, эндофитные микромицеты растений семейства Orchidaceae обладают биотехнологическим потенциалом, в частности, как источник новых биологически активных соединений.

Цель нашей работы: исследовать состав эндофитных микромицетов корневой системы орхидных растений Тюменской области.

Задачи:

- 1) Найти достаточное для изъятия из природы и дальнейших исследований количество орхидных растений.
- 2) Составить краткую биологическую характеристику найденных растений.
- 3) Выделить и охарактеризовать изоляты микромицетов эндофитных орхидных растений.

Гипотеза исследования: мы предполагаем, что на численность и редкость орхидных может влиять не только антропогенный или абиотический факторы, но и количество и качество консорциумных микромицетов.

Актуальность:

Из 30 видов орхидных растений описываемых во флоре Тюменской области, 25 находится в Красной Книге [5]. Некоторые из них крайне редкие. Поэтому изучение биологических особенностей таких растений может заложить основу для восстановления или сохранения их численности.

Новизна: Ранее, подобное исследование на территории Тюменской области не проводилось. Особенности почв регионов Тюменской области могут влиять на консорциативные взаимодействия орхидных с микоризообразователями и это требует дополнительных исследований. В перспективе, возможно выделение изолятов эндофитных микромицетов и получение из них биологически активных вторичных метаболитов.

Объект исследования: 6 видов орхидных растений Тюменской области.

Предмет исследования: эндофитные микромицеты корневой системы указанных видов.

1. Литературный обзор

Изучение растений семейства Орхидные посвящено огромное множество работ. Значительная доля из них подробно проанализирована в вышеуказанной монографии [1]. В ней М.Г. Вахрамеева с соавт. выделяет несколько направлений изучения растений этого семейства: морфологию, онтогенез, экологию, хорологию, возрастную структуру, динамику популяций и др. Особенно важным для нашего исследования является анализ работ посвященных микоризообразованию орхидных. Эта группа исследований разделяется на несколько направлений. Это касается и непосредственного изучения консорциумных связей с грибами, бактериями или актиномицетами, так и возможности искусственного выращивания орхидей посредством выделенных из этих организмов метаболитов.

Важнейшей особенностью растений семейства орхидные являются крайне мелкие размеры семян: от 0,38мм у *Orchis purpurea*, до 1,38 мм у *Epipactis palustris* [1] (указаны

орхидные России). Отсутствие эндосперма с запасными веществами требует при прорастании присутствие каких-либо эндомикоризных (то есть поселяющихся внутри) грибов. Возможны взаимодействия и с другими микроорганизмами. Индийские исследователи [6] под руководством J.Saikia изучали орхидные своей страны и указывают на преобладание в корнях бактерий рода *Streptomyces*. Цавкелова Е.А. [7] в своей работе по изучению эпифитных орхидей предлагает патент на использование культуры бактерий родов *Pseudomonas* и *Klebsiella* для стимуляции прорастания семян этих растений.

Для нашего исследования наибольший интерес представляют работы по исследованию особенностей строения корневой системы орхидных, их онтогенеза и микоризообразования.

Орхидные растения России относятся к многолетним травянистым растениям и могут сильно отличаться по строению и функционированию подземной части и продолжительности ее жизни. Поэтому их классификация очень сложна. Достаточно подробно она разработана Т.И. Серебряковой [8], где орхидные описываются вместе с другими многолетними травянистыми растениями. Нас интересует классификация подземных частей орхидных предложенная И.В. Татаренко и Аверковой [9]. Согласно ей, Орхидные делятся на короткокорневищные и длиннокорневищные. По наличию специализированных запасующих органов: с подземными утолщенными запасующими органами (стеблевыми клубнями, клубнелуковицами, корневыми клубнями); с надземными запасующими органами (псевдобульбами, листьями и корнями). По продолжительности жизни корни делятся на 4 группы: более 3 лет; 1-2 года; до 0,5 года и без корней. Например, Скрученник китайский (*Spiranthes sinensis*) относится к растениям с однолетним побегом, с короткими стеблекорневыми тубероидами, с подземными корневыми запасующими органами (корневыми клубнями), с продолжительностью жизни корней 1-2 года.

Не менее важным аспектом изучения орхидных является их онтогенез и связь с почвенными грибами. Семя, прорастая в земле, формирует особое образование, которое называется протокоорм. У автотрофных орхидей гриб обеспечивает растущий протокоорм питательными веществами до момента перехода особи к образованию надземных фотосинтезирующих органов. Некоторые орхидеи специфичны в своих отношениях с видами грибов [10]. Многие исследователи указывают на широкую экологическую приуроченность грибных симбионтов. Исследования *Spiranthes sinensis*, одного из самых распространённых видов в Японии, показали, что во всех местах его обитания симбионтами являются *Rhizoctonia repens* и *R. solani* [11]. Первый гриб отмечается так же, как узкоспецифичный симбионт Любки двулистной (*Platanthera bifolia*) [12].

Развитие мицелия грибов внутри подземных органов орхидных изучено достаточно подробно. Гифы гриба могут проникать в корневую систему на ранних стадиях и на 2-3 год

жизни растения. В отличие от большинства корневищных, у тубероидных видов наблюдается сокращение микоризной инфекции от ювенильных к генеративным растениям [1]. Гриб образует в ряде клеток корней особые клубки гиф – пелотоны, которые позже могут быть переварены клетками растения, что считается защитным механизмом растения от чрезмерного заражения грибом. Особенно часто это наблюдается в осенний период. Таким образом, взаимодействия орхидных растений и грибов носят очень сложный характер, который нельзя называть только симбиотическим. Чаще в литературе встречается понятие «консорциативные связи» под которыми понимается весь спектр взаимодействия орхидных растений с грибами. Под этим понятием рассматривается также и взаимодействие этих растений и с другими организмами (например, с насекомыми опылителями).

Обобщая вышесказанное, можно сказать, что изучение наземных орхидных растений Тюменской области с позиции определения и систематизации микоризообразующих грибов представляет актуальное и новое направление в научной деятельности. Существует вероятность получить новые данные и результаты по известным орхидным растениям региона.

2. Объекты и методы исследования

Работа проводилась в летний период 2024г. Поиск и определение растений происходили при помощи определителя растений «Флора средней полосы Европейской части России [13]. Также, все виды растений были определены и идентифицированы с помощью ученых Тюменской области на платформе "iNaturalist». Было решено остановиться на 6 видах растений: Дремлик лесной (*Epipactis helleborine*), Дремлик темно-красный (*Epipactis atrorubens*), Дремлик болотный (*Epipactis palustris*), Гнездоцветка клобучковая (*Hemipilia cucullata*), Любка двулистная (*Platanthera bifolia*) и Скрученник китайский (*Spiranthes sinensis*). Последний в современной номенклатуре видов носит иногда название Скрученник приятный (*S. australis*). Все растения были обнаружены за пределами заказников и памятников природы [14]. Сбор производился только в случае, если число популяции превышало 10 особей. *Platanthera bifolia* была взята из двух разных локаций и соответственно получила порядковые названия: Любка – 1 и Любка -2. До начала микробиологического исследования, каждое растение хранилось в отдельном пакете в холодильнике при температуре 4 °C. Все последующие этапы микробиологических исследований проводились по методам описанным в учебном пособии «Практикум по микробиологии» [15].

Протокол проведения наблюдений:

1. Стеклянные чашки Петри, фильтровальную бумагу (ø 90 мм) и дистиллированную воду автоклавируют при 121 °C в течение 20 минут.

2. Питательную среду Сабуро (40 г/л глюкозы, 10 г/л мясного пептона и 15 г/л агара, pH 5,7) автоклавируют при 115 °С в течение 15 минут.
3. Растительный материал тщательно промывают в проточной воде, после чего корни (подземные части) растений нарезают на 3-6 кусочков.
4. Стерилизация корней включает в себя следующие этапы: 1 минута - 70% этиловый спирт, 10 мин - 2-3% гипохлорит калия, трех- пяти-кратное промывание в стерильной воде.
5. В остывшую среду Сабуро добавляют антибиотики: ампициллин (100 мкг/мл) и канамицин (50 мкг/мл). Питательную среду разливают по чашкам Петри и дают застыть.
6. Кусочки корней после поверхностной стерилизации выкладывают на стерильную фильтровальную бумагу (для удаления лишней влаги с образцов), после чего перекладывают стерильным пинцетом на поверхности агаризованной питательной среды.
7. Образцы инкубируют 4-5 дней при температуре 27 °С.
8. По истечению времени образцы осматривают на предмет роста микромицетов.
9. Изоляты микромицетов пересевают вновь на свежую питательную среду Сабуро для получения чистых культур и инкубируют 5-7 дней при температуре 27 °С.
10. По истечению времени проводят оценку результатов: оценивают макроморфологические признаки, готовят микропрепарат с окрашиванием лактофеноловым синим.

Полученные микромицеты идентифицировали по двум атласам определения грибов [16,17]. Изучение микроморфологических признаков микромицетов проводилось с помощью светового микроскопа Zeiss PrimoStar (увеличение x1000).

3. Анализ полученных данных

3.1. Поиск растений семейства Орхидные в Тюменской области

Платформа iNaturalist является одним из ведущих и признаваемых учеными источников научной информации. Общее количество участников в мире на конец августа 2024 года составляет почти 3 миллиона триста тысяч человек. Общее число выставленных наблюдений при этом – более 207 миллионов. В проекте «Флора России» задействовано 29 тысяч наблюдателей и выставлено почти четыре миллиона наблюдений (<https://www.inaturalist.org/projects/flora-rossii-i-kryma-flora-of-russia-and-the-crimea>). На территории Тюменской области свои наблюдения по растениям за четыре года (2020-2024) сделали 369 наблюдателей и общее количество найденных растений всех видов составляет на конец августа 2024 года 61540 штук. [<https://www.inaturalist.org/projects/tyumen-oblast-flora>]. Такое количество данных, с одной стороны, позволяют искать популяции орхидных сначала на карте. С другой стороны, места произрастания некоторых видов еще не выявлены. Поэтому ряд наших поисков позволил найти новые места популяций. К числу таковых можно отнести

Дремлик темно-красный (*Epipactis atrorubens*). На завершение летнего сезона 2024 года в системе iNaturalist в Тюменской области найдена одна популяция этого вида [<https://www.inaturalist.org/observations/230491298>] в Упоровском районе в окрестностях деревни Масали (рис 1).



Рис. 1. *Epipactis atrorubens* (на заднем плане виден еще один побег). Июль 2024 г. Окрестности д. Масали.

Как уже было сказано, при нахождении растения, мы старались оценить его редкость с помощью геоинформационной карты в платформе iNaturalist. На рис 2. можно оценить встречаемость этого вида как высокую в Европе и европейской части России. На Урале *Epipactis atrorubens* также встречается достаточно часто, а вот на территории Сибири крайне редок. Сравнивая эти данные с информацией в Красной Книге Тюменской области [5] (приложение 1), можно сказать, что наша находка новая и ранее популяции этого вида в указанном районе не регистрировалась.



Рис.2. Локации находок *Epipactis atrorubens* по данным iNaturalis (август 2024год).

Понять, насколько редки на территории Тюменской области изучаемые виды орхидных растений, можно из обобщенной таблицы 1.

Таблица 1.

Количественные показатели находок орхидных в ТО на август 2024года
(таблица составлена автором)

№	Название растения	Количество официальных находок по данным iNaturalist, шт	От наблюдений всех орхидных, %
1	<i>Epipactis helleborine</i>	79	27,1
2	<i>Epipactis atrorubens</i>	1	0,3
3	<i>Epipactis palustris</i>	2	0,7
4	<i>Hemipilia cucullata</i>	60	20,6
5	<i>Platanthera bifolia</i>	50	17,1
6	<i>Spiranthes sinensis</i>	14	4,8

По нашим данным, наиболее редкими видами являются Дремлик болотный и Дремлик темно-красный. С локациями их находок за последние 4 года можно познакомиться в приложении 2. Редкость этих растений, безусловно делает их наиболее интересными с точки зрения изучения их эндофитных микромицетов. При этом, для полноты исследований необходимо опираться на более продолжительные наблюдения. При изучении корневой системы и обитающих в ней микромицетов необходимо также детальнее понимать разницу в её строении.

3.2. Биологическая характеристика исследуемых растений

Непосредственные наблюдения за изучаемыми орхидными растениями мы постарались проанализировать вместе с литературными данными (таблица 2).

Таблица 2.

Важнейшие биологические характеристики изучаемых орхидных (По данным М.Г. Вахрамеевой с соавт. 2014)

№	Название растения	Особенности корневой системы	Наличие грибов симбионтов
1	<i>Epipactis helleborine</i>	Растение с укороченным плагиотропным корневищем. На каждом годичном приросте корневища взрослого растения имеется от 2 до 6 корней. Корни растут несколько лет, достигая минерального горизонта почвы и длины 15-17 см	Более микотрофны молодые особи. Во всех возрастных состояниях микоризообразование в сырых местах более интенсивно. В корнях взрослых растений были отмечены участки, заново инфицированные грибом.
2	<i>Epipactis atrorubens</i>	Растение короткокорневищное. Корневая система образована придаточными корнями, число	На ранних этапах развития Дремлик темно-красный — облигатный микосимбиотроф,

		которых у мощных экземпляров может превышать 40–50, а иногда и до 100).	во взрослом состоянии интенсивность микоризной инфекции — от слабой до средней.
3	<i>Epipactis palustris</i>	Длиннокорневищное растение. Корневище имеет длинные междоузлия и чешуевидные листья, в пазухах которых находятся почки. От каждого узла отходят по 2–4 придаточных корня	В отличие от других видов рода, у Дремлика болотного грибная инфекция корней очень слабая, но на бедных почвах и при низкой освещенности степень микотрофности возрастает. Интенсивное микоризообразование наблюдается также на очень сырых почвах с низким содержанием гумуса
4	<i>Hemipilia cucullata</i>	Клубень 0,5–1,2 см в длину, 0,7–1,8 см в ширину. Покрит густым войлоком из буроватых эпидермальных волосков. Корни немногочисленные короткие и толстые	В природных условиях отмечают высокую специфичность симбиоза <i>H. cucullata</i> с грибом <i>Rhizoctonia goodyerae-repentis</i> . Интенсивность микоризной инфекции в различных онтогенетических состояниях велика (около 90%). Отмечено 4 вида почвенных грибов, образующих «чехол» на поверхности корней.
5	<i>Platanthera bifolia</i>	Сильно утолщенный клубень (2–3 шт), образованный базальными частями одного или двух сросшихся корней, с тонкими вытянутыми корневыми окончаниями.	Взрослые особи сильно инфицированы — интенсивность микоризной инфекции 75%. Отмечена высокая специфичность ее грибного симбионта (не указан)
6	<i>Spiranthes sinensis</i>	С коротким вертикальным корневищем, несущим 2–6 запасующих, слабоутолщенных корней (клубней), 3–6 см длиной	<i>Ceratobasidium cornigerum</i> , <i>Rhizoctonia</i> spp. (<i>R. repens</i> , <i>R. solani</i>)

Представленная таблица необходима для дальнейшей работы по изучению именно корневой системы орхидных. При дальнейшем получении тех или иных изолятов микромицетов на питательных средах, мы исходили из особенностей строения подземной части. В частности, старались сначала фиксировать изображения корневых систем, а затем отбирать и выращивать микромицеты с разных частей. Примером может служить изображение представленное на рис. 3.

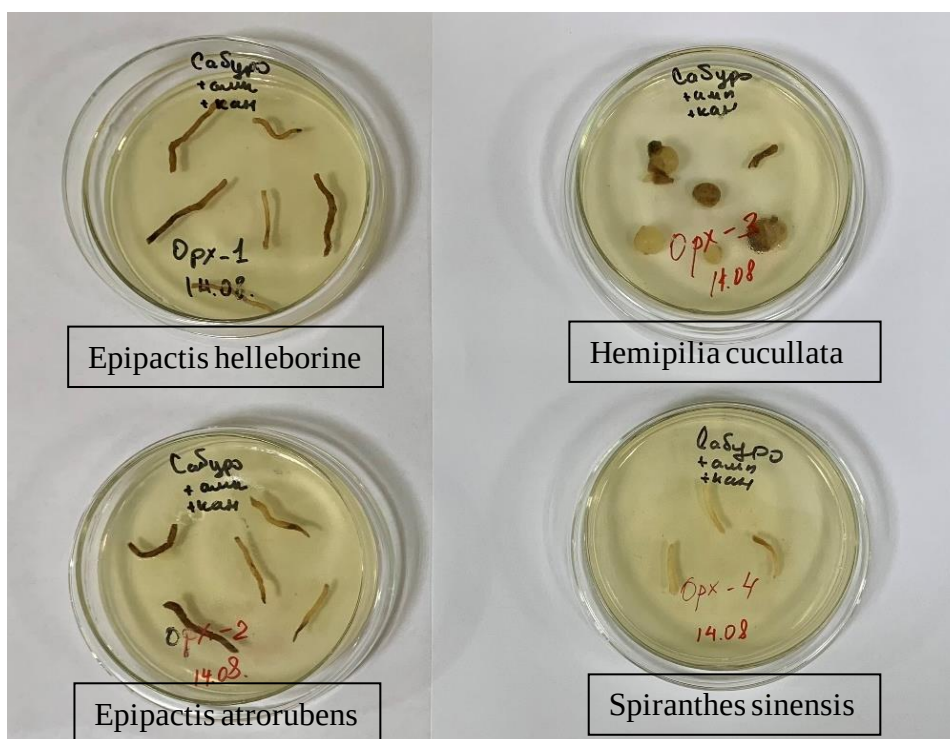


Рис.3. Участки корневых систем четырех видов в питательной среде Сабуро.

Если у Дремликов двух видов (*E. helleborine* и *E. atrorubens*) мы заложили в питательную среду именно придаточные корни с точки зрения морфологии корневой системы представленной в таблице 2, то у Гнездоцветки клубочковой (*Hemipilia cucullata*) это были кусочки клубня и короткие придаточные корни, а у Скрученника китайского (*Spiranthes sinensis*) - запасающие корневые клубни. У найденных позже Любки двулистной (*Platanthera bifolia*) были заложены клубни и короткие корни. У Дремлика болотного (*Eipactis palustris*) – кусочек корневища и придаточные корни (приложение 3).

3.3. Изучение эндосимбиотических микромицетов

Анализ вышеуказанной монографии [1] показал, что некоторые виды изучаемых нами растений еще недостаточно изучены с точки зрения идентификации микосимбионтов. Поэтому первоочередной задачей стало получение чистых культур микромицетов располагающихся внутри корневых образований (эндофитов). Для подавления роста бактериальных изолятов, в частности, экзо- и эндобактериальных симбионтов, в питательную среду Сабуро добавляли антибиотики: ампициллин (100 мкг/мл) и канамицин (50 мкг/мл). Образцы инкубировали шесть суток при $t=27^{\circ}\text{C}$. По истечению времени фиксировали рост изолятов эндофитных микромицетов в исследуемых образцах (рис 4).



Рис.4. Мицелии в образцах корневых участков орхидных (слева *Epipactis atrorubens*, справа *Spiranthes sinensis*). Видны, предположительно, бактериальные колонии вдоль корней цвета слоновой кости.

На корневых участках всех видов дремликов выросло по одному виду микромицетов. При этом, у *Epipactis palustris* скорость роста мицелия была наибольшей (приложение 4). Максимальное количество внешне различающихся мицелиев (3) обнаружили на корнях *Spiranthes sinensis* (рис 4). У Гнездоцветки клубучковой (*Hemipilia cucullata*) на кусочке корня и на клубне выросли разные по внешнему виду два мицелия. Важно отметить, что на корнях всех изучаемых образцов наблюдали слабый рост бактерий. Окрашивание по Граму двух образцов бактериальных колоний показало присутствие в корнях Дремлика темнокрасного (*Epipactis atrorubens*) палочковидных грамположительных бактерий, а в корнях Любки двулистной (*Platanthera bifolia*) грамположительных кокков и грамотрицательных палочковидных бактерий (приложение 5). Можно предположить, что, несмотря на наличие в составе питательной среды антибиотиков с различными механизмами действия, органика корней использовалась бактериями для ростовых процессов. Общее количество изолятов микромицетов отобранных и выделенных в чистые культуры составило десять штук. Микроскопирование мицелия эндофитных микромицетов показало следующее. На всех изолятах на среде Сабуро ни один из микромицетов не формировал конидиогенные структуры необходимые для идентификации. Подобное явление отмечается в работе нескольких авторов [18,19]. Они предполагают, что эндогенные микромицеты в ходе онтогенеза теряют способность к формированию структур бесполого размножения. Более того, именно тот факт, что изучаемые культуры не создают конидиогенных структур, может указывать на их эндофитность, то есть внутритканевое существование. С одной стороны, это подтверждает, что полученные нами изоляты относятся именно к эндофитным микромицетам. С другой -

возникает необходимость в секвенировании ДНК для идентификации полученных изолятов микромицетов.

На первую декаду сентября мы смогли зафиксировать только морфологические характеристики мицелия и с помощью светового микроскопа получить изображения мицелия, сформированного на среде Сабуро (приложение 5).

Выводы

В ходе проведенного исследования удалось достигнуть следующих результатов:

1. На территории Тюменской области встречаются 30 видов орхидных растений. В ходе полевых выездов нам удалось обнаружить 6 популяций разных видов пригодных для изъятия из природы и исследования.
2. Впервые обнаружена популяция Дремлика темно-красного (*Epipactis atrorubens*) на территории Упоровского района в окрестностях д. Масали.
3. Анализ литературы и геоинформационной системы iNaturalist позволили выделить из изучаемых нами видов орхидных самый редкий - Дремлик темно-красный (*Epipactis atrorubens*) и наименее редкий – Дремлик лесной (*Epipactis helleborine*).
4. Подземные органы изученных орхидных состоят в основном из корневища и придаточных корней. Только у *Platanthera bifolia* и *Hemipilia cucullata* наблюдали наличие одного – двух клубней.
5. Выделены изоляты эндомицетов изученных растений в количестве 10 видов. На питательной среде Сабуро у всех без исключения изолятов не было обнаружено конидиогенных структур, что с одной стороны не позволяет идентифицировать их таксономическую принадлежность, а с другой - подтверждает их эндофитную природу.
6. По количеству эндофитов все три вида дремликов не отличались. Из придаточных корней каждого мы смогли выделить по одному виду микромицетов.
7. Наибольшее количество микромицелиальных внутрикорневых симбионтов (3 вида) обнаружено на корнях *Spiranthes sinensis*.
8. Создана коллекция десяти изолятов микромицетов в соответствии с видами орхидных растений, произрастающими в Тюменской области.

На данный момент полученных материалов недостаточно, чтобы сделать выводы о видовой специфичности микромицетов изученных орхидных. Тем не менее, полученные изоляты микромицетов могут послужить в последующем исследовании на предмет выделения вторичных метаболитов с биологической активностью. Кроме этого, возможно исследование влияния этих грибов на прорастание семян изученных видов орхидных растений или на, так называемое, биологическое закаливание при выращивании культуры тканей.

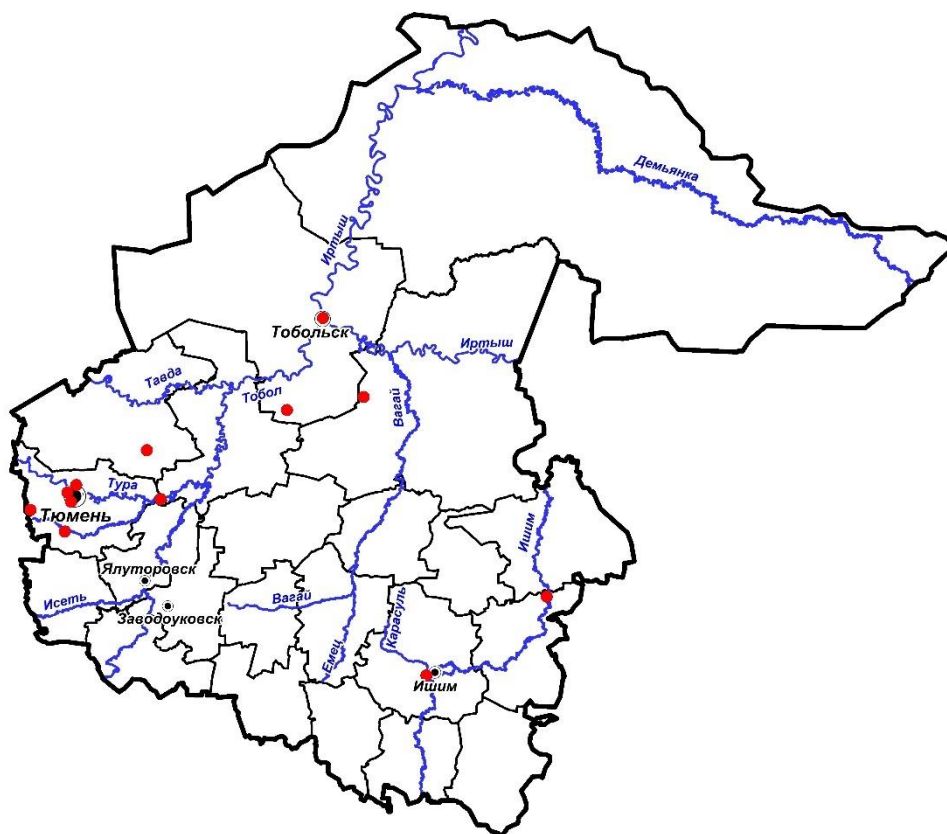
Автор работы выражает огромную благодарность руководителю Степанову Артему Анатольевичу и всему коллективу лаборатории антимикробной резистентности института экологической и сельскохозяйственной биологии X-Bio за всемерную поддержку и внимание к работе.

Список источников литературы

1. Вахрамеева, М.Г., Варлыгина Т.И., Татаренко И.В. Орхидные России (биология, экология и охрана [Текст]/ М.Г. Вахрамеева, Т.И. Варлыгина, И.В. Татаренко - М: Товарищество научных изданий КМК, 2014. - 437с.
2. Глазунов, В.А. Определитель сосудистых растений Тюменской области [Текст]/В.А. Глазунов, Н.И. Науменко, Н.В. Хозяинова – Тюмень: ООО «РГ «Перспект», 2017 – 744с.
3. Куликов, П.В., Филиппов, Е.Г. Особенности становления микоризного симбиоза в онтогенезе орхидных умеренной зоны [Текст] // Экология. № 6., 2001 - С.442–446.
4. Маракаев, О.А. Специфика фотосинтетического аппарата орхидных разных видов [Текст] / О.А. Маракаев, Матер. 9-й Межд. науч. конф. «Охрана и культивирование орхидей», Санкт-Петербург, 26–30 сент. 2011 г. М.: Т-во науч. изданий КМК. 2011 - С.290–294.
5. Красная книга Тюменской области [Электронный ресурс]// Режим доступа: https://admtyumen.ru/ogv_ru/about/redbook/redbook.htm?ysclid=m0gw6ykmg3554836687
6. Juri Saikia, Rajkumari Mazumdar , Debajit Thakur. Phylogenetic affiliation of endophytic actinobacteria associated with selected orchid species and their role in growth promotion and suppression of phytopathogens [Электронный ресурс]// Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36570961/>
7. Цавкелова, Е.А. Микроорганизмы, ассоциированные с оранжевыми орхидными [Текст]: Автореф. дис. на соиск. уч. степ. канд. биол. н. М.: МГУ. 2003 - 23 с.
8. Серебрякова, Т.И. Жизненные формы и модели побегообразования наземно-ползучих многолетних трав [Текст] / Т.И. Серебрякова, Жизненные формы: структура, спектры и эволюция. М., 1981. - С.161–179.
9. Татаренко, И.В., Аверкова, Г.П. Развитие годичных побегов и корневых систем некоторых видов дальневосточных орхидных [Текст]: И.В. Татаренко, Г.П. Аверкова. // Бюл. Бот. сада им. И.С. Косенко. (Краснодар). № 7., 1998. - С.153–154.
10. Clements, M.A. Orchid mycorrhiza association// Lindleyana. Vol.3. No.2. 1988. - P.73–86.
11. Terashita, T. Fungi inhabiting wild orchids in Japan. 2. Isolation of symbionts from *Spiranthes sinensis* var. *amoena* // Trans. Mycol. Soc. Japan. Vol.23. 1982. - P.319–328.
12. Мамаев, С.А. Орхидные Урала: систематика, биология, охрана [Текст] / С.А. Мамаев, М.С. Князев, П.В. Куликов, Е.Г. Филиппов, Екатеринбург: УрОРАН, 2004. – 123с.

13. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части России [Текст] / П.Ф. Маевский, 11-е изд. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. – 635с.
14. Глазунов, В.А., Максимова С.Л., Николаенко С.А., Новикова А.А., Петрова О.А., Ситников П.С., Хозяинова Е.Ю., Хозяинова Н.В. Особо охраняемые природные территории Тюменской области. Тюмень: ООО «Принт-Сервис», 2021. 152 с.
15. Нетрусов, А.И. и др. Практикум по микробиологии. Учеб. пособие для студ.высш.уч. заведений [Текст] / А.И.Нетрусов, М.А.Егорова, Л.М.Захарчук и др. -. М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608с.
16. Westblade LF, Burd EM, Lockhart SR, Procop GW. 2023. Larone’s medically important fungi: a guide to identification. 7th ed. ASM Press, Washington, DC., 560 pp.
17. Watanabe, T. (2010). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species, Third Edition (3rd ed.). CRC Press. doi.org/10.1201/EBK1439804193
18. Xiang Sun, Liang-Dong Guo. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. Mycology Vol. 3, No. 1, March 2012, 65–76. doi.org/10.1080/21501203.2012.656724
19. Hossain, M. M., Rahi, P., Gulati, A., & Sharma, M. (2013). Improved ex vitro survival of asymbiotically raised seedlings of Cymbidium using mycorrhizal fungi isolated from distant orchid taxa. Scientia Horticulturae, 159, 109–116. doi:10.1016/j.scienta.2013.05.003

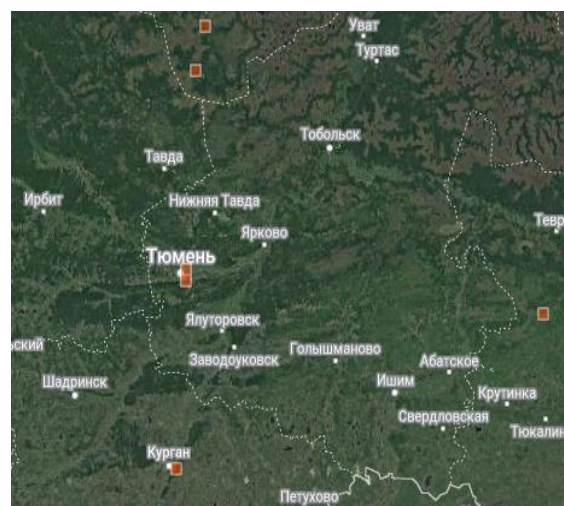
Карта находок Дремлика темно-красного (*Epipactis atrorubens*) по данным Красной Книги Тюменской области [5].



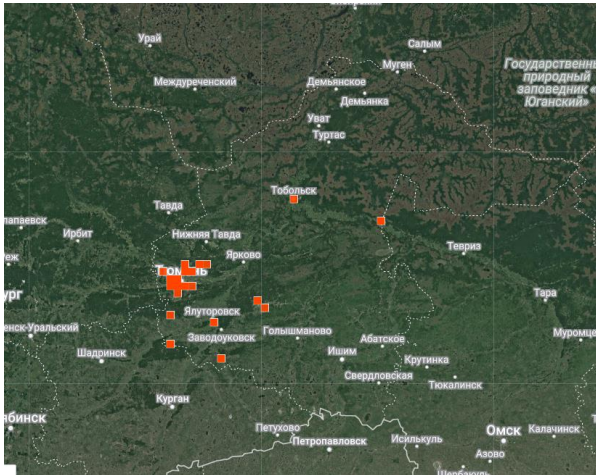
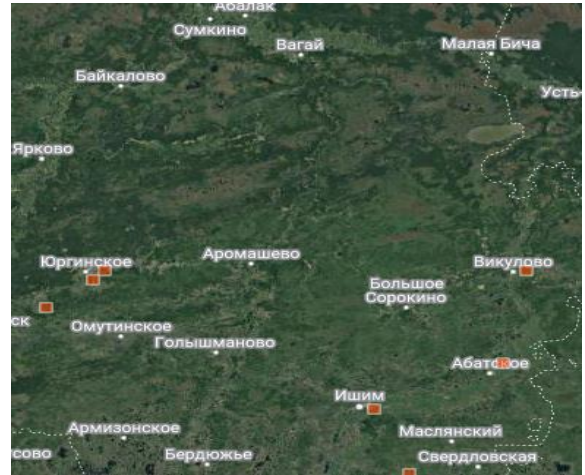
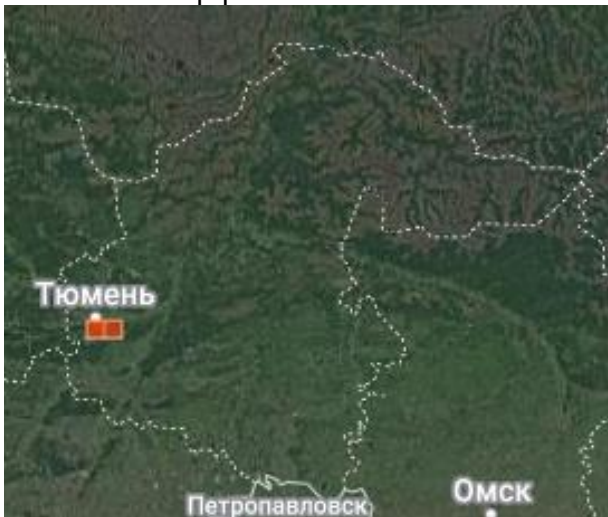
Находки 6 изучаемых видов орхидных растений в Тюменской области и близлежащих территориях



Epipactis atrorubens

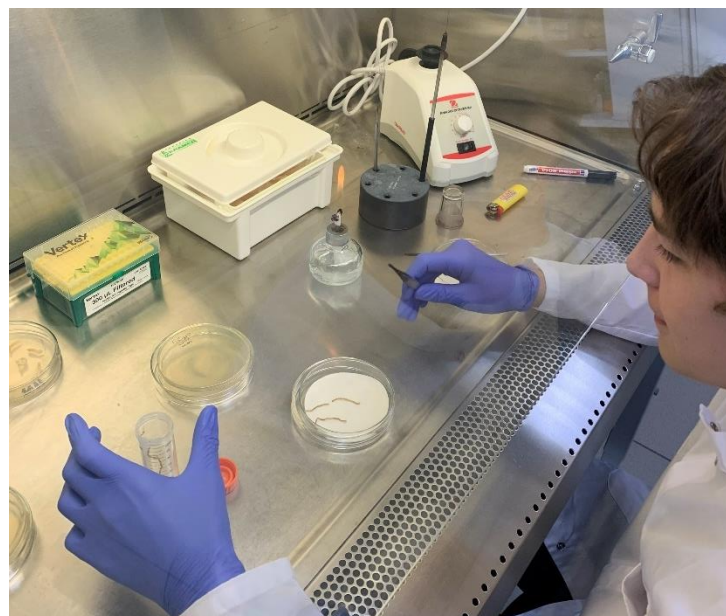


Epipactis palustris

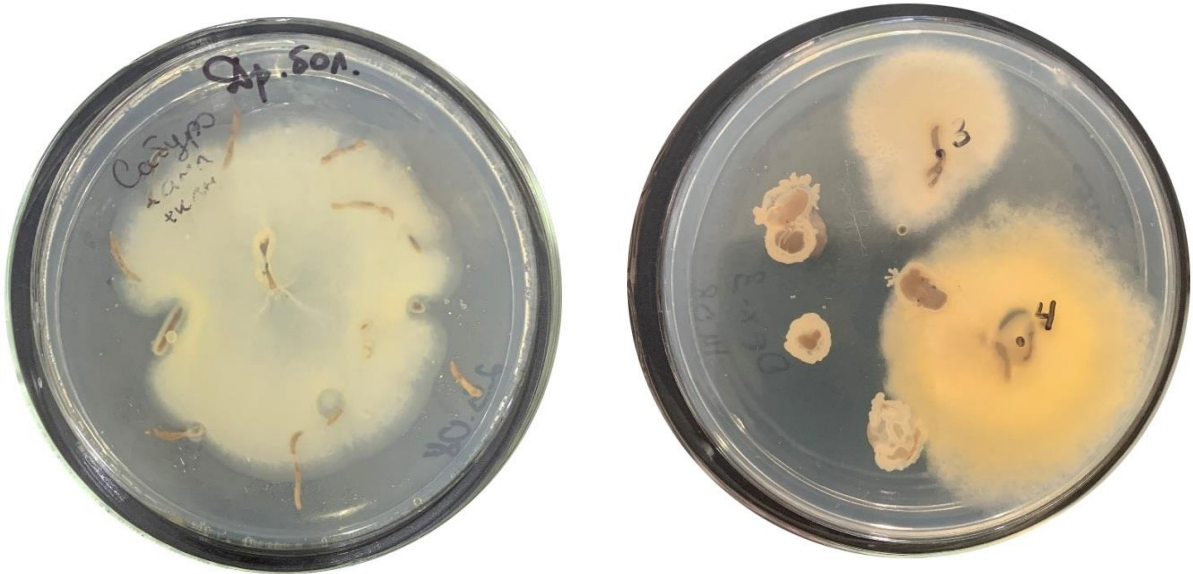
*Epipactis helleborine**Platanthera bifolia**Spiranthes australis**Hemipilia cucullata*

Приложение 3

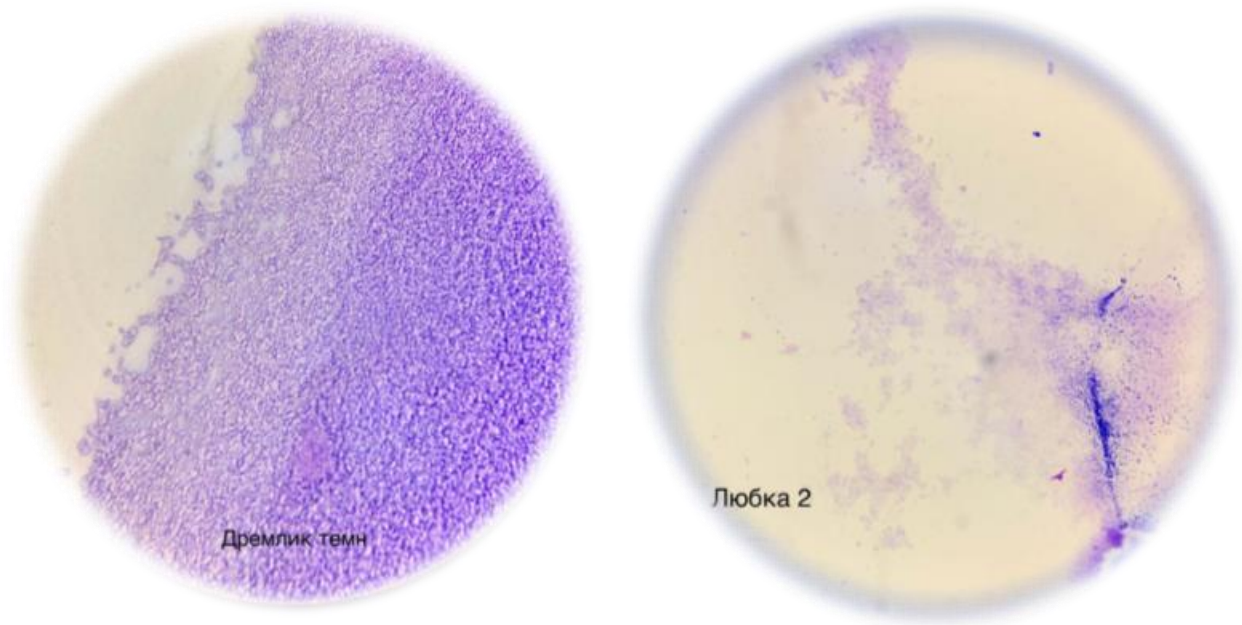
В чашку Петри на среду Сабуро выкладываются корни и корневище Д. болотного (*Epipactis palustris*)

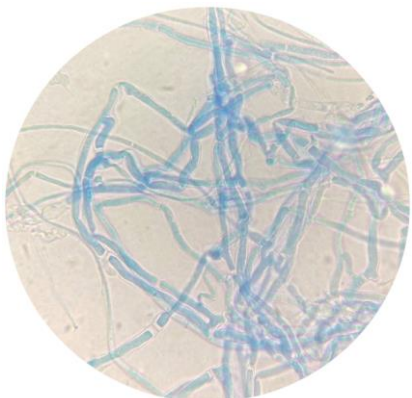


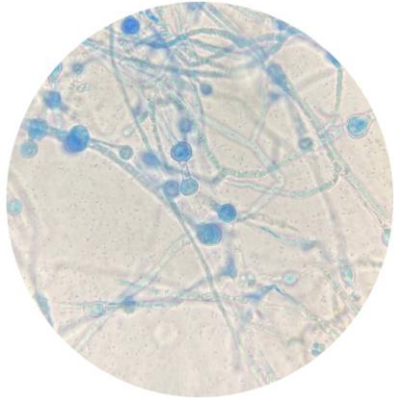
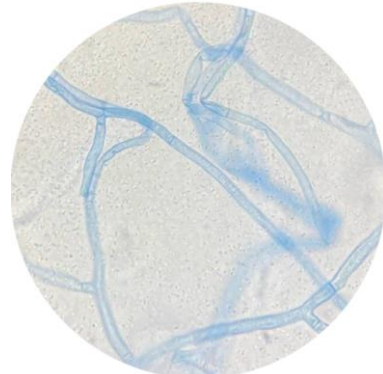
Мицелий на корнях Дремлика болотного (*Eriactis palustris*) (слева)
и Гнездоцветки клобучковой (справа)

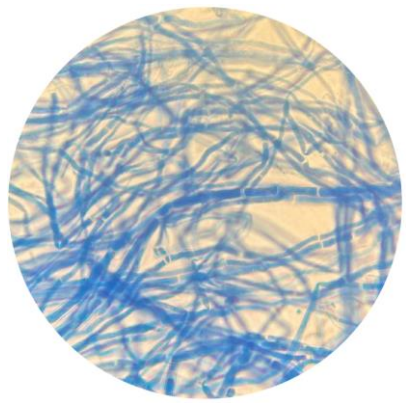
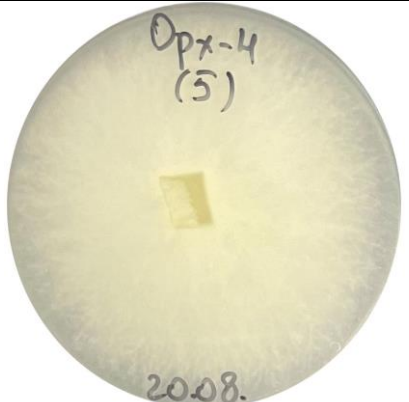
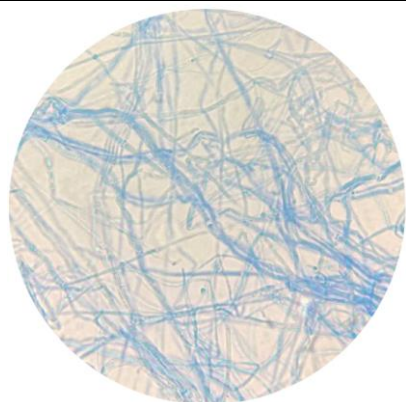


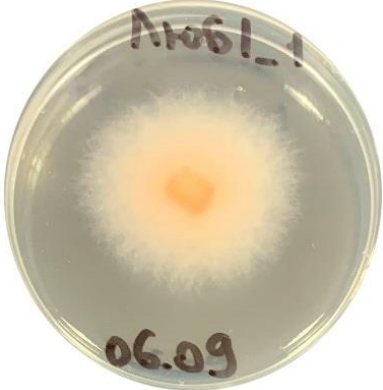
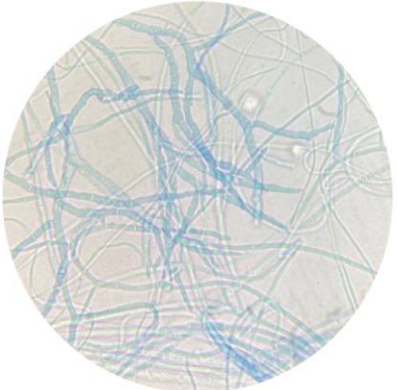
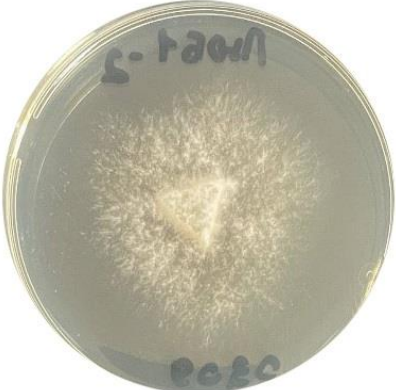
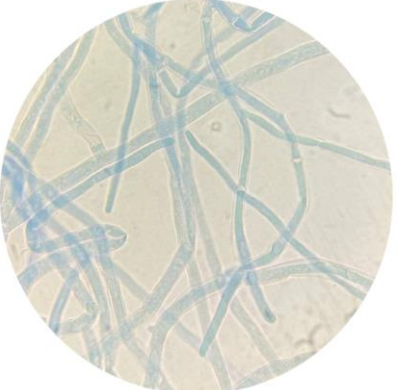
Микрофотографии бактерий (x 1000) из корней *Eriactis atrorubens* и *Platanthera bifolia* 2

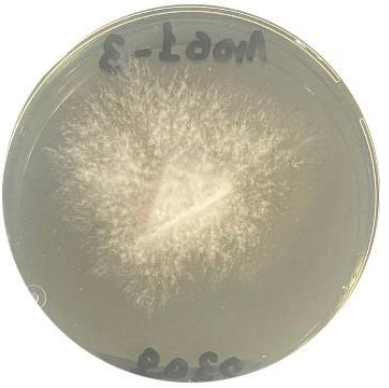


№	Вид растения	Реверс колонии микромицета	Внешний вид колонии микромицета	Препарат микромицета (увеличение x1000)
1	Epipactis helleborine			
2	Epipactis atrorubens			

3	<i>Epipactis palustris</i>			
				?
4	<i>Hemipilia cucullata</i>			

5	Spiranthes sinensis			
6	Spiranthes sinensis			

7	Platanthera bifolia-1			
8	Platanthera bifolia-1			

9	Platanthera bifolia-1			
10	Platanthera bifolia 2	