

Центральный ботанический сад
Национальной академии наук Беларуси



Central Botanical Garden
of the National Academy of Sciences of Belarus

Охрана и культивирование орхидей

Материалы X международной научно-практической конференции
1-5 июня 2015 г., Минск, Беларусь

Conservation and Cultivation of Orchids

Materials of X international scientific and practical conference
June 1-5, 2015, Minsk, Belarus



Воздействие брассиностероидов на рост *Phalaenopsis hybridum* Blume в условиях *in vitro*

А.В. Батулев¹, М.А. Черныш¹, В.Н. Жабинский², В.А. Хрипач², В.В. Демидчик¹

¹Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, биологический факультет, Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²Институт биоорганической химии, НАН Беларуси, Минск, Беларусь

The effect of brassinosteroids on growth of *Phalaenopsis hybridum* Blume propagated *in vitro*. A.V. Batuleu, M.A. Charnysh, V.N. Zhabinskii, V.A. Khripach, V.V. Demidchik. Ornamental plants of *Phalaenopsis* genus are widely used in the interior phytodesign. The *in vitro* culture techniques have been developed to propagate the hybrid forms of these plants. These techniques are usually combined with treatments by auxins and cytokinins to control plant growth and development. The aim of this study was to determine the effect of new class of phytohormones, the brassinosteroids, on growth rate and biomass accumulation in cloned *Phalaenopsis hybridum* Blume. Obtained data showed that epicastasterone, homocastasterone, epibrassinolide and homobrassinolide can cause significant stimulation of *Phalaenopsis hybridum* Blume growth and biomass accumulation. Epibrassinolide demonstrated the most pronounced effect which was 2.5-fold increase in growth rate and 3-fold increase in biomass gain. Comparison with auxins showed that brassinosteroids were more potent stimulators of *Phalaenopsis hybridum* Blume growth than auxins. In conclusion, brassinosteroids showed high effectiveness as stimulators of orchid growth. This effect can be used in biotechnological practices and has also to be studied at the cellular and molecular level.

Создание «зеленой» и высокоэкологичной среды обитания – одна из важнейших задач современного общества. В этой связи все более актуальным и востребованным становится озеленение и фитодеизайн помещений. В настоящее время в практике фитодеизайна все чаще используются орхидеи, среди которых наибольшей популярностью пользуются представители рода *Phalaenopsis*. В Беларуси производство орхидей не развито. В этой связи представляет значительный интерес адаптация существующих и разработка новых технологий культивирования орхидей с целью их коммерциализации в нашей стране.

Для размножения орхидей в промышленных масштабах используют как семена, так и микрореклональное размножение. Семенное размножение позволяет получить большое количество растений, но их фенотипические признаки при этом практически не контролируются и утрачиваются качества ценных гибридов. Данный недостаток можно избежать при использовании техники вегетативного клонирования в стерильных условиях, позволяющей сохранить декоративные качества материнского организма.

Определяющим фактором для контроля ростовых процессов и дифференцировки при культивировании растений *in vitro* является содержание и соотношение в среде различных фитогормонов. Для этих целей в биотехнологии растений главным образом используются ауксины и цитокинины. Однако в последние годы появился значительный объем данных, указывающих на то, что еще одна группа фитогормонов, а именно брассиностероиды, может быть использована для регуляции процессов роста и развития растений в условиях культуры *in vitro*. Для представители рода *Phalaenopsis* влияние брассиностероидов на рост в культуре *in vitro* пока не изучено. В этой связи целью настоящей работы было установление характера воздействия важнейших брассиностероидов на рост представителей рода *Phalaenopsis* (на примере *Phalaenopsis*

hybridum Blume) в культуре *in vitro*. В работе было охарактеризовано воздействие различных уровней экзогенных эпикастастерона (ЭК), гомокастастерона (ГК), эпибрассинолида (ЭБ) и гомобрассинолида (ГБ) на рост клонированных стерильных протокормов *Phalaenopsis hybridum* Blume. Также был проведен сравнительный анализ влияния ауксинов и брассиностероидов на этом же объекте.

Введение в среду БС вызывало усиление ростовых процессов, что выражалось в увеличении длины клонированных протокормов (рисунок 1). Наибольшим стимулирующим эффектом обладал ЭБ. Он вызывал увеличение скорости роста примерно в 2,5 раза по сравнению с контролем уже в концентрации 10^{-8} моль/л. При этом более высокие уровни данного фитогормона (10^{-7} и 10^{-6} моль/л) уже не вызывали дополнительного увеличения скорости роста. Таким образом, для данного стероида, вероятно, наблюдалось насыщение стимулирующего действия при 10^{-8} моль/л или даже при более низких концентрациях. В случае ГБ наблюдалась стимуляция роста на 25-30% при 10^{-8} моль/л, однако этот эффект резко усиливался с ростом концентрации данного вещества, достигая приблизительно 90-100% стимуляции роста при 10^{-6} моль/л. ЭК и ГК, хотя и демонстрировали тенденцию к стимуляции роста при 10^{-8} моль/л, статистически-достоверную прибавку в данном показателе вызывали только при 10^{-7} моль/л. Тем не менее оба этих БС вызывали близкий к ЭБ и ГБ эффект при 10^{-6} моль/л (рисунок 1). Таким образом, можно ожидать потенциальный выход на насыщение по эффекту стимуляции роста для ГБ, ЭК и ГК при более высоких уровнях данных веществ в среде культивирования.

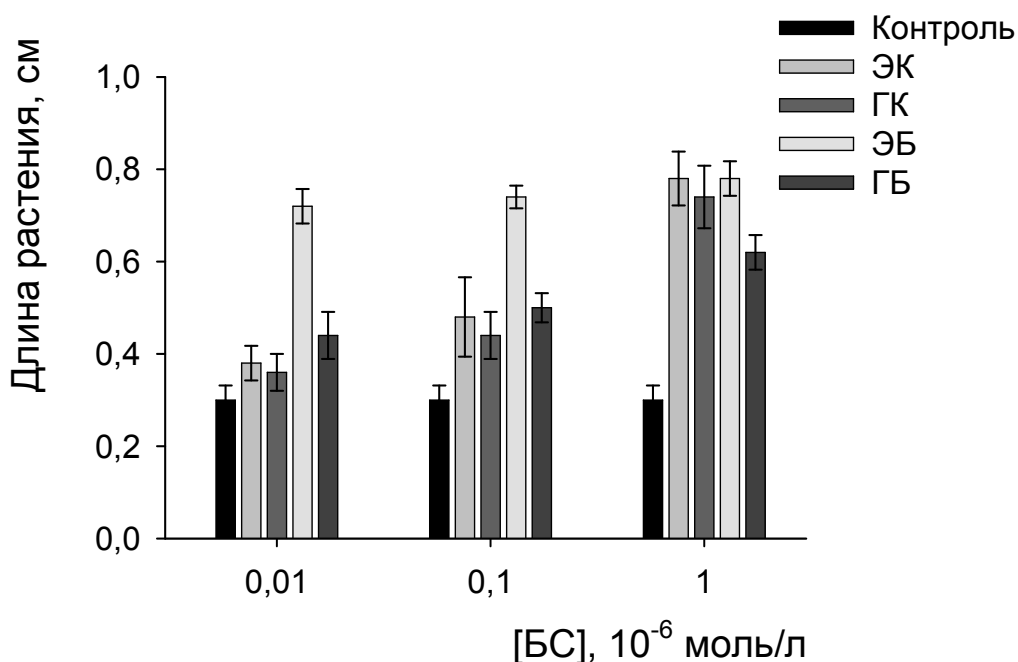


Рисунок 1 – Средние значения длины микроклонов *Phalaenopsis hybridum* Blume, выращенных на безгормональной среде Fast (контроль) и на средах, содержащих различные уровни БС (указаны на рисунке)

Для сравнения полученных результатов с классическими эффектами стимуляции роста под действием ауксинов было протестировано действие 3 ауксинов (рисунок 2). Было обнаружено, что максимальным стимулирующим действием обладала 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д). Добавление данного синтетического ауксина приводило к двукратному увеличению скорости роста при концентрации в среде культивирования 0,3 и 1 мг/л. Индолил-3-уксусная кислота (ИУК) оказывала на 20-30% более слабый эффект, чем 2,4-Д. Индолил-3-масляная кислота (ИМК) демонстрировала наиболее слабое воздействие среди 3 протестированных ауксинов. Для нее

наблюдалось отсутствие статистически-достоверной стимуляции роста при 0,1 и 0,3 мг/л и 30-40% стимуляция при 1 мг/л. Возможно ИМК и ИУК (как следует из данных на рисунке 2) могут выходить на насыщение по эффекту стимуляции роста при более высоких уровнях в среде. Данный вопрос будет рассмотрен в дальнейшей работе.

Кроме физических размеров клонированных растений также определялась их масса. Для определения массы растения измерялась общая масса 5 растений в 5 независимых опытах. Полученные данные по изменению массы растений при их культивировании на средах, содержащих различные концентрации фитогормонов показали схожие результаты с описанными выше результатами по изменению длины протокормов. Наибольшим стимулирующим эффектом обладал ЭБ. Он вызывал увеличение массы в 3 раза по сравнению с контролем уже в концентрации 10^{-8} моль/л. Максимальным стимулирующим действием среди ауксинов обладала 2,4-Д, которая в концентрации 1 мг/л оказывала схожий с ЭБ эффект, вызывая увеличение массы почти в 3 раза по сравнению с контрольным результатом.

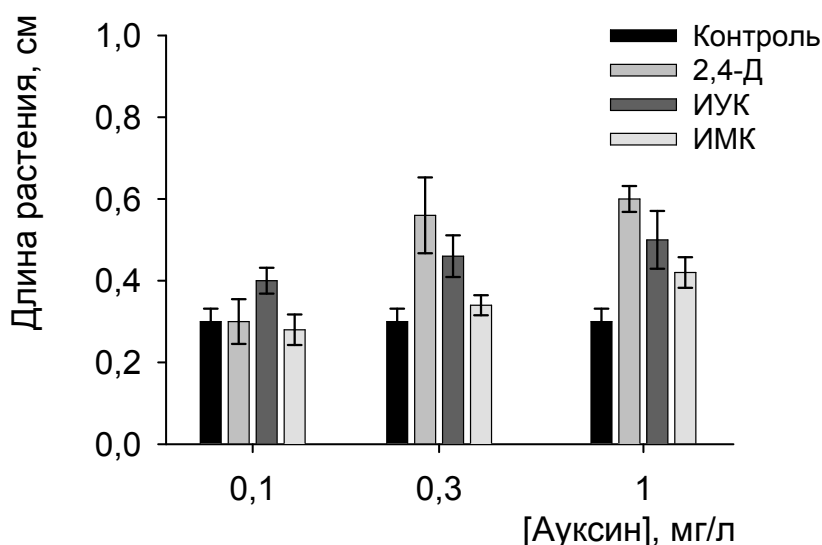


Рисунок 2 – Средние значения длины микроклонов *Phalaenopsis hybridum* Blume, выращенных на безгормональной среде Fast (контроль) и на средах, содержащих различные уровни ауксинов (указаны на рисунке)

Полученные в настоящей работе результаты указывают на стимулирующее влияние БС на рост культуры протокормов *Phalaenopsis hybridum* Blume. Ранее влияние БС на рост данного растения в культуре *in vitro* изучено не было. Однако было показано, что БС способны стимулировать рост культур *Arabidopsis thaliana*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum*. Проведенный в представленной работе сравнительный анализ влияния БС и ауксинов впервые показал, что БС являются более мощными стимуляторами роста микроклонов *Phalaenopsis hybridum* Blume, сопоставимых и даже превосходящих ауксины. Интересным фактом, обнаруженным в работе также является мощный стимулирующий эффект 2,4-Д, ранее неизвестный в литературе.

По физиологическим эффектам брассиностероиды схожи с ауксинами: они воздействуют на схожие сигнально-регуляторные пути, стимулируют рост клеток, участвуют в контроле дифференцировки и закладке тканей и органов. Помимо схожих свойств, брассиностероиды повышают устойчивость растений к стрессовым воздействиям, что может иметь интерес при культивировании растений *in vitro*, поскольку способно ускорять восстановление растения при ранении вследствие субкультивирования или черенкования.

На основании полученных в представленной работе данных можно сделать следующие выводы: 1) Введение в среду БС вызывает увеличение длины клонированных протокормов и веса растений *Phalaenopsis hybridum* Blume. По стимулирующему действию БС можно расположить в следующий ряд: ЭБ > ЭК = ГК > ГБ. Наибольшим стимулирующим эффектом обладает ЭБ, вызывая увеличение скорости роста растения в 2,5 раза; 2) Стимулирующее воздействие БС в концентрации 10^{-8} – 10^{-6} моль/л на рост клонированных растений *Phalaenopsis hybridum* Blume превосходит влияние ауксинов в диапазоне концентраций 0,1-1 мг/л. Среди протестированных ауксинов наибольшим стимулирующим действием обладает 2,4-Д, индуцируя 2-кратное увеличение скорости роста микроклонов орхидей.