

**МОДИФИКАЦИЯ ПРОЦЕССОВ РОСТА
И НАБОРА БИОМАССЫ ПРОТОКОРМОВ
PHALAEOPSIS × *HYBRIDUM BLUME* В КУЛЬТУРЕ
in vitro ПОД ДЕЙСТВИЕМ БРАССИНОЛИДА И КАСТАСТЕРОНА**

**М. А. ЧЕРНЫШ¹⁾, Д. А. ПРЖЕВАЛЬСКАЯ¹⁾, И. А. ГОРСКИЙ¹⁾,
Д. В. КОЛБАНОВ²⁾, В. Н. ЖАБИНСКИЙ³⁾, В. А. ХРИПАЧ³⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾**

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Республиканское учебно-опытное унитарное предприятие БГУ «Щемяслица»,
ул. Жуковского, 15-А, 223049, агрогородок Щемяслица, Минская обл., Беларусь

³⁾Институт биоорганической химии НАН Беларуси,
ул. Академика В. Ф. Купревича, 5, 220141, г. Минск, Беларусь

Браassinостероиды – класс стероидных регуляторов роста растений, обладающих сильным модифицирующим воздействием на ростовые процессы растений. Однако их влияние на рост культур *in vitro* орхидных, включая наиболее коммерчески важный род *Phalaenopsis*, к настоящему времени практически не изучено. Цель нашей работы – выявление особенностей воздействия брассинолида и кастастерона на рост протокормов *Phalaenopsis* × *hybridum Blume* в культуре *in vitro*. В ходе проведенных опытов было показано, что обработка брассинолидом и кастастероном вызывает значительное увеличение прироста массы и длины протокормов. Стимулирующее воздействие браassinостероидов на рост протокормов наблюдалось начиная с их уровня в среде 10^{-10} моль/л. С ростом концентрации эффект браassinостероидов усиливался. При концентрации брассинолида 10^{-6} моль/л отмечался максимальный стимулирующий эффект – двукратное увеличение длины протокормов и увеличение их массы в 2,5 раза по сравнению с контролем. Полученные из обработанных браassinостероидами протокормов микрорастения демонстрировали большую длину корней (до 3 раз по сравнению с контролем; 10^{-7} моль/л брассинолида или

Образец цитирования:

Черныш МА, Пржевальская ДА, Горский ИА, Колбанов ДВ, Жабинский ВН, Хрипач ВА, Демидчик ВВ. Модификация процессов роста и набора биомассы протокормов *Phalaenopsis* × *hybridum Blume* в культуре *in vitro* под действием брассинолида и кастастерона. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2018; 2:105–113.

For citation:

Charnysh MA, Przhevalskaya DA, Horski IA, Kolbanov DV, Zhabinskii VN, Khripach VA, Demidchik VV. Brassinolide- and castasterone-induced modifications of growth processes and biomass accumulation in *in vitro* culture of *Phalaenopsis* × *hybridum Blume* protocorms. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;2:105–113 (in Russ.).

Авторы:

Мария Александровна Черныш – магистрант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Дарья Андреевна Пржевальская – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений биологического факультета.

Илья Андреевич Горский – студент биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Дмитрий Викторович Колбанов – заместитель директора.

Владимир Николаевич Жабинский – доктор химических наук, доцент; главный научный сотрудник лаборатории стероидной химии.

Владимир Александрович Хрипач – доктор химических наук, профессор, академик НАН Беларуси; заведующий лабораторией химии стероидов.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Authors:

Maryia A. Charnysh, master's degree student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. chernyshmaryia@gmail.com

Darya A. Przhevalskaya, junior researcher at the research laboratory of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

daryaprzhevalskaya@gmail.com

Ilya A. Horski, student at the faculty of biology.

bio.gorskiy@bsu.by

Dmitrii V. Kolbanov, deputy director.

dmitry-kolbanov@tut.by

Vladimir N. Zhabinskii, doctor of science (chemistry), docent; chief researcher at the laboratory of steroid chemistry.

vz@ns.iboch.ac.by

Vladimir A. Khripach, doctor of science (chemistry), full professor, academician of the National Academy of Sciences of Belarus; head of the laboratory of steroid chemistry.

khripach@iboch.bas-net.by

Vadim V. Demidchik, doctor of science (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

dzemidchik@bsu.by

кастастерона). На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что брассиностероиды обладают выраженным стимулирующим влиянием на рост и развитие важнейшего представителя декоративных орхидных *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume в культуре *in vitro*. Схожими эффектами, согласно литературным данным, обладают ауксины, обычно рассматривающиеся в качестве антагонистов действия брассиностероидов на корневую систему.

Ключевые слова: *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume; брассиностероиды; семенное размножение; протокормы; культура *in vitro*.

BRASSINOLIDE- AND CASTASTERONE-INDUCED MODIFICATIONS OF GROWTH PROCESSES AND BIOMASS ACCUMULATION IN *in vitro* CULTURE OF *PHALAEOPSIS* × *HYBRIDUM* BLUME PROTOCOLS

M. A. CHARNYSH^a, D. A. PRZHEVALSKAYA^a, I. A. HORSKI^a,
D. V. KOLBANOV^b, V. N. ZHABINSKII^c, V. A. KHRIPACH^c, V. V. DEMIDCHIK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bTeaching and Research Centre «Schemislitsa», Belarusian State University,
15-A Žukoŭskaha Street, Ščamyslica 223049, Minsk region, Belarus

^cInstitute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
5 Academician V. F. Kupreviča Street, Minsk 220141, Belarus

Corresponding author: V. V. Demidchik (dzemidchik@bsu.by)

Brassinosteroids is a class of plant steroid hormones, which mainly targets growth, development and stress responses in higher plants. Nevertheless, their effects on the growth of orchid plants and orchid *in vitro* cultures, which are used in biotechnology, have not been studied in details. The objective of this work was to characterize effects of major brassinosteroids, such as brassinolide and castasterone, on the growth and development of *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume protocorms *in vitro*. The obtained data show that both brassinolide and castasterone cause significant increase of the physical size and weight of *Phalaenopsis* protocorms. As low as 0.1 nmol · L⁻¹ of brassinolide and castasterone in the medium induced statistically significant stimulation of growth processes. 2–3-fold increase in biomass and length was induced by addition of 0.1–1.0 μmol · L⁻¹ of brassinolide and castasterone. Treatment by brassinosteroids increased the length of roots but did not change their quantity and developmental characteristics. Thus, results of this study clearly show that brassinosteroids are promising agents for regulation of orchid growth, which can act in extremely low concentrations and cause the pronounced stimulatory effects on growth but not on the development. Treatment by brassinosteroids as well as studying their effects on the physiological characteristics of ornamental orchids *in vitro* culture can potentially have an impact on the fundamental knowledge in the field of plant physiology and on the development of new biotechnologies.

Key words: *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume; brassinosteroids; seeds propagation; protocorms; *in vitro* culture.

Введение

Производство орхидей занимает лидирующие позиции в декоративном промышленном цветоводстве. Ежегодные продажи декоративных орхидей оцениваются в мире на уровне 1 млрд долл. США [1]. Наиболее популярными с коммерческой точки зрения родами являются *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, *Oncidium*, *Cymbidium* и *Cattleya*. Основными странами – производителями декоративных орхидей являются Китай, Германия, Япония, Нидерланды, Таиланд и США. В Беларуси производство орхидей не развито. В связи с этим представляет значительный интерес разработка технологий культивирования орхидей в целях их коммерциализации в нашей стране.

Для размножения орхидей в промышленных масштабах используют семена и микроклональное размножение [2]. Семенное размножение позволяет получить большое количество растений, но при этом их фенотипические признаки не контролируются. Данный недостаток отсутствует у микроклонального размножения, при котором сохраняются декоративные качества материнского растения, что особенно важно для гибридных форм [3; 4]. Однако микроклональное размножение дает в тысячи раз меньший выход растений.

Определяющим фактором контроля ростовых процессов и дифференцировки при культивировании *in vitro* является использование в среде фитогормонов, а также их соотношение. В большинстве случаев для контроля развития высших растений в асептической культуре применяются ауксины и цитокинины [5; 6], однако в последние годы появились данные, указывающие на возможность использования для биотехнологических манипуляций с культурами высших растений брассиностероидов (БС) [7; 8]. По ряду физиологических эффектов БС схожи с ауксинами: они модифицируют ростовые процессы, участвуют в дифференциации проводящих тканей и вызывают ряд других реакций [9; 10]. Помимо свойств, схожих с ауксинами, БС обладают уникальными характеристиками, такими как повышение устойчивости к стрессовым воздействиям [11; 12]. В ряде исследований показано прямое участие стероидных гормонов в активации экспрессии «протекторных» генов, связанных со стрессом [10–13]. Отмечается повышение активности антиоксидантных ферментов, уменьшение содержания активных форм кислорода и снижение общей проницаемости мембран проростков огурца [14]. Добавление в среду БС может стимулировать поддержание целостности фотосинтетического аппарата путем уменьшения его повреждения при световом и других типах стрессов [13].

Потенциальное воздействие БС на физиологические процессы у орхидных, включая биотехнологические аспекты культивирования *in vitro*, остается практически не изученным. В то же время для однодольных такие работы имеются. Например, продемонстрировано влияние данной группы фитогормонов на злаковые культуры, такие как рис, пшеница, ячмень и кукуруза [15–17]. Для злаков, в частности, показано, что уровень БС реагирует на возрастающую интенсивность абиотических стрессовых стимулов, а также изменяется у растений, взаимодействующих с бактериальными, грибковыми и вирусными инфекциями [13; 18]. Экзогенно введенные БС способны напрямую регулировать морфометрические параметры злаковых растений, такие как скорость роста, плодовитость, налив и созревание семян [13–18]. В связи с этим представляется возможным влияние БС на рост и развитие орхидей, в частности их культур, используемых в биотехнологических целях.

Для развития технологий размножения орхидей в Беларуси перспективным является размножение семенами в стерильных условиях через культуру стерильных протокормов [19]. Последние представляют собой уникальные по анатомии биполярные структуры орхидных, которые образуются сразу после прорастания семян [20]. У подавляющего количества представителей семейства Orchidaceae на первых этапах развития протокорм не дифференцирован на органы. Апикальная часть протокорма состоит из мелких клеток, представляющих собой апекс побега. Базальная его часть функционирует как «запасной орган», включает крупные паренхимные клетки и покрыта эпидермальными волосками [21]. Развитие зародыша в условиях *in vitro* сопровождается ростом апикальной зоны и значительными изменениями базальной. Для клеток базальной зоны характерны полиплоидия и многоядерность, что свидетельствует об их высокой метаболической активности. В условиях *in situ* данный процесс осуществляется с помощью мицелия гриба, гифы которого проникают в ткани зародыша [20].

Исследования влияния БС на рост и развитие протокормов ранее не проводились. В то же время протокормы играют критически важную роль в онтогенезе орхидных – крупнейшего семейства высших растений на планете (около 30 тыс. видов) [3]. Протокормы, формирующиеся при семенном размножении *in vitro*, могут послужить модельным объектом для изучения воздействия наиболее важных с точки зрения физиологии растений и потенциальной биологической активности БС на рост и развитие орхидных.

Цель настоящей работы – выявление особенностей воздействия важнейших БС: брассинолида и кастастерона – на ростовые процессы у протокормов *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume в культуре *in vitro*. Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи: адаптировать и оптимизировать протоколы получения культуры *in vitro* протокормов *Phalaenopsis*, охарактеризовать влияние брассинолида и кастастерона на рост и развитие протокормов *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume в стерильной культуре.

Материалы и методы исследования

Объект исследования в настоящей работе – культура *in vitro* *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume. Для ее получения производился посев недозревших семян из цельных нераскрывшихся коробочек (рис. 1).

Данный метод является более предпочтительным в связи с простотой проведения. Семена не подвергаются прямому воздействию химикатов, что позволяет использовать более опасные стерилизующие вещества, которые дают больший процент стерильных жизнеспособных проростков [4]. В семенной кожуре недозревших семян еще не накопились вещества, которые отвечают за механизмы покоя семян, при данном условии значительно повышается процент их прорастания [4; 22].

Стерилизация коробочек *Phalaenopsis* осуществлялась посредством 3-кратной обработки 70 % этанолом с последующим обжигом в пламени спиртовки. После коробочки раскрывались стерильным

скальпелем, и уже стерильные семена засеивались на поверхность питательной среды. Для проращивания использовалась агаризованная среда Fast [23], дополненная 1,2 % сахарозы, 0,8 – фруктозы, 0,9 – агара, 0,2 – дрожжевого экстракта, 0,2 – пептона, 0,2 – активированного угля, 1 – мезоинозита, 1 % гумата калия (рН 5,5/КОН).

Семена культивировались в темноте при комнатной температуре до начала прорастания. Чашки с проросшими семенами переносились в условия, подобранные для роста протокормов согласно литературным данным [1–6; 24]: искусственное 16-часовое освещение при температуре (26 ± 2) °С и влажности 70–80 %. После формирования протокормов их переносили на среду Fast с добавлением брассинолида и кастастерона в концентрациях от 10^{-10} до 10^{-6} моль/л. Каждый вариант проводился в 3-кратной повторности с выборкой 16 растений. В качестве контроля использовалась безгормональная среда Fast. Световой и температурный режим для культивирования экспериментальных чашек не изменялся.

Рост стерильных протокормов микроклонов *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume на средах, дополненных различными концентрациями БС, был проанализирован по длине и массе микрорастений, а также по длине их корней. Учет результатов производился на 100-е сутки после введения в среду гормонов.

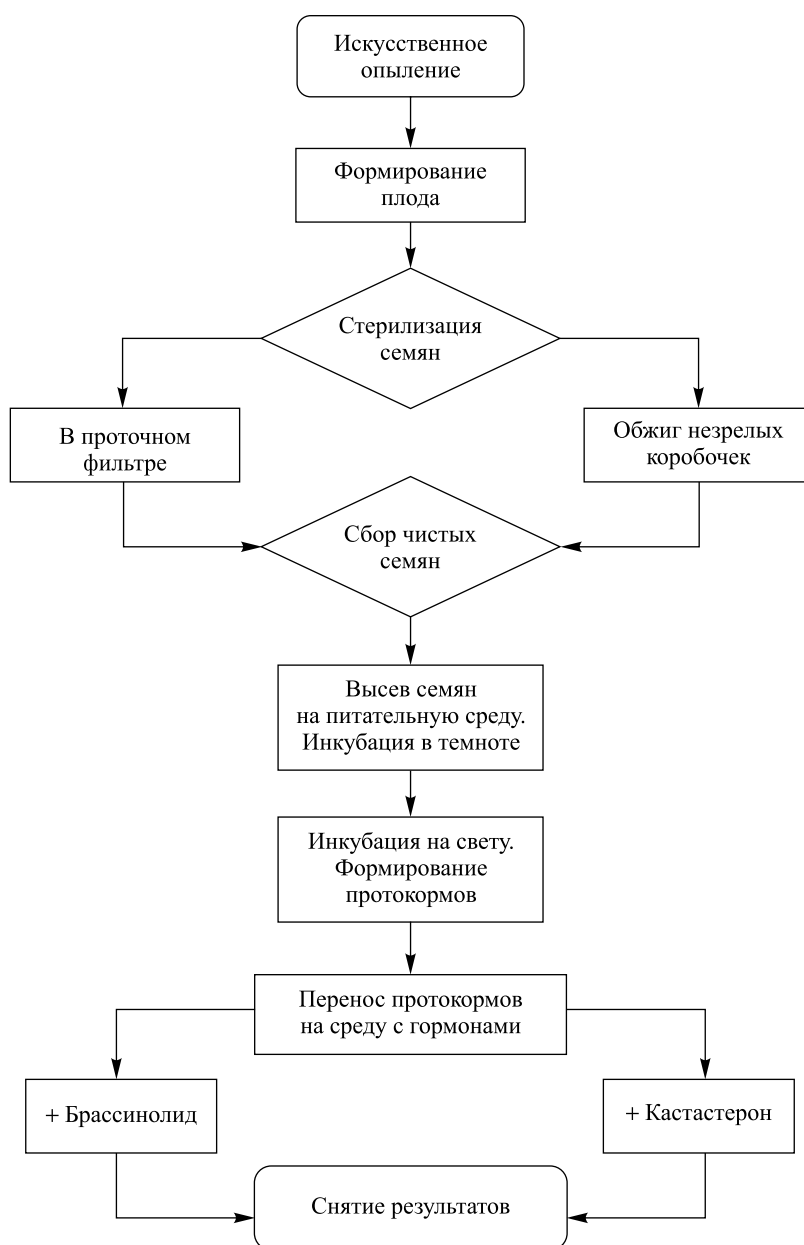


Рис. 1. Блок-схема методики проведения эксперимента
Fig. 1. Flowchart of experimental procedures

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи программного пакета *GraphPad Prism v. 7.0*. Достоверность определялась с помощью *t*-критерия Стьюдента ($P \leq 0,01$). Данные представлены в виде $X \pm Sx$, где X – среднее арифметическое значение показателя; Sx – ошибка среднего арифметического.

Результаты и их обсуждение

Протестировано влияние двух основных БС: brassinотида и кастастерона – на рост протокормов *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume, полученных из семян, в условиях *in vitro* (рис. 2). Измерены длина и масса протокормов на 100-е сутки выращивания при введении в агаризованную среду культивирования 10^{-10} – 10^{-6} моль/л brassинотида или кастастерона. В ходе проведенных экспериментов обнаружено, что добавление в среду БС во всем исследуемом спектре концентраций не вызывает изменений в морфологии микрорастений. Все сформировавшиеся микрорастения состояли из утолщенного стебля, 1–2 листьев характерной формы и 1 воздушного корня. Однако БС значительно интенсифицировали рост и развитие молодых растений, что проявлялось в увеличении длины протокормов и приросте их биомассы (см. рис. 2).

Минимальная из протестированных концентраций brassинотида (10^{-10} моль/л) вызывала увеличение массы по сравнению с контролем на 30 % (табл. 1). Эффект постепенно усиливался с ростом тестируемой концентрации. Максимальный эффект достигался при 10^{-6} моль/л brassинотида, в этом случае наблюдалось 2,5-кратное увеличение массы растений по сравнению с контролем. Brassинотид также стимулирующе влиял на морфологические параметры растений, их размеры значительно возрастали. Уже в концентрации 10^{-10} моль/л наблюдалось достоверное увеличение длины протокормов – на 28 % по сравнению с контролем (см. рис. 2, б, в). Добавление в среду brassинотида в концентрации 10^{-7} моль/л приводило к 2-кратному увеличению длины микрорастений *Phalaenopsis*. В концентрации 10^{-6} моль/л эффект выходил на насыщение.

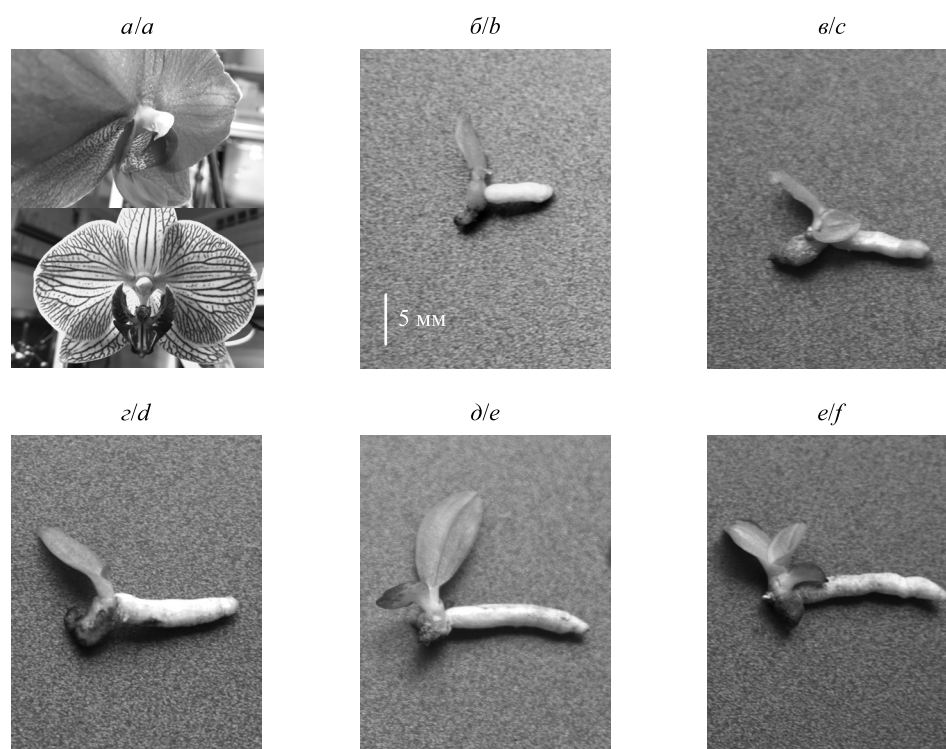


Рис. 2. Внешний вид микрорастений *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume, сформировавшихся на 100-е сутки с момента обработки БС:
а – фенотип материнских линий; б – контроль; в – 10^{-10} моль/л brassинотида;
г – 10^{-10} моль/л кастастерона; д – 10^{-7} моль/л brassинотида; е – 10^{-7} моль/л кастастерона

Fig. 2. Phenotypes of *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume seedlings after cultivation during 100 days in media containing brassinosteroids:
а – flowers of parental plants; б – control (brassinosteroid-free medium);
с – 10^{-10} mol · L⁻¹ brassinotide; д – 10^{-10} mol · L⁻¹ castasterone;
е – 10^{-7} mol · L⁻¹ brassinotide; ф – 10^{-7} mol · L⁻¹ castasterone

Таблица 1

Воздействие брассинолида на рост микрорастений *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume, сформировавшихся из протокормов на 100-е сутки с момента обработки

Table 1

The effect of brassinolide on the growth of *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume microplants after cultivation during 100 days

Концентрация брассинолида, моль/л	Масса растения, мг ($n = 16; X \pm Sx$)	Длина растения, мм ($n = 16; X \pm Sx$)
Нет (контроль)	46,3 ± 1,8	9,3 ± 0,3
10 ⁻¹⁰	60,1 ± 2,3	11,9 ± 0,6
10 ⁻⁹	70,5 ± 3,3	12,7 ± 0,5
10 ⁻⁸	79,8 ± 1,9	13,3 ± 0,6
10 ⁻⁷	105,1 ± 1,6	17,6 ± 0,7
10 ⁻⁶	112,6 ± 4,2	17,4 ± 0,4

Введение в среду кастастерона, так же как и брассинолида, стимулировало набор биомассы и усиление ростовых процессов микрорастений *Phalaenopsis* (табл. 2). Добавление 10⁻¹⁰ моль/л кастастерона вызывало прирост как массы, так и длины (приблизительно на 27 %; см. рис. 2, з). С повышением концентрации отмечалось усиление данного стимулирующего эффекта. Максимальное ростостимулирующее действие кастастерона достигалось при его концентрации 10⁻⁶ моль/л: регистрировались 2-кратный прирост биомассы растений и увеличение их длины по сравнению с контролем на 76 %. Следует отметить, что, несмотря на качественно схожие эффекты, брассинолид воздействовал на рост и набор биомассы сильнее.

Таблица 2

Воздействие кастастерона на рост микрорастений *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume, полученных из протокормов (100 сут)

Table 2

The action of castasterone on the growth parameters of *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume cultivated from seeds during 100 days

Концентрация кастастерона, моль/л	Масса растения, мг ($n = 16; X \pm Sx$)	Длина растения, мм ($n = 16; X \pm Sx$)
Нет (контроль)	46,3 ± 1,8	9,3 ± 0,3
10 ⁻¹⁰	58,9 ± 2,4	11,8 ± 0,2
10 ⁻⁹	65,3 ± 3,6	12,6 ± 0,3
10 ⁻⁸	68,1 ± 2,9	13,3 ± 0,3
10 ⁻⁷	87,2 ± 2,3	15,2 ± 0,3
10 ⁻⁶	97,2 ± 2,7	16,4 ± 0,2

В настоящей работе также был проведен анализ морфологических характеристик корневой системы микрорастений, выращенных на среде с БС. Наблюдалось достоверное увеличение длины корней по сравнению с контрольными растениями во всем диапазоне протестированных концентраций БС (табл. 3). На среде с 10⁻¹⁰ моль/л брассинолида отмечалось ускорение удлинения корня на 44 % ($P = 0,0018$). Для кастастерона данное ускорение составило 64 % ($P < 0,0001$). Прослеживалось усиление эффекта с ростом действующих концентраций БС. Максимальный стимулирующий эффект на удлинение корня был выявлен на средах с 10⁻⁷ моль/л брассинолида и кастастерона, он проявлялся в 3-кратном ускорении процесса роста.

В представленной работе выполнено первое для орхидных тестирование влияния БС на рост протокормов в культуре *in vitro*. Для важнейшей модели *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume результаты тестирования ростостимулирующей активности БС также приводятся впервые. Литературные данные указывают на то, что БС способны модифицировать рост некоторых других видов орхидных [25–27]. Например, микромолярные уровни 28-гомобрассинолида показали эффективность в качестве стимуляторов регенерации побегов трех сортов *Dendrobium* [25]. Это согласуется с данными о стимулирующем влиянии микромолярных концентраций БС на рост *Phalaenopsis*, полученными в настоящей работе.

Таблица 3

Длина корней микрорастений *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume
на 100-е сутки с момента обработки БС

Table 3

Mean root length of *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume microplants
after cultivation during 100 days in media containing brassinosteroids

Концентрация БС, моль/л	Длина корня, мм ($n = 16$; $X \pm Sx$), при обработке	
	брасинолидом	кастастероном
10^{-10}	$5,9 \pm 0,3$	$6,7 \pm 0,4$
10^{-9}	$7,4 \pm 0,5$	$10,3 \pm 0,5$
10^{-8}	$11,7 \pm 0,6$	$11,4 \pm 0,4$
10^{-7}	$11,9 \pm 0,5$	$12,4 \pm 0,4$
10^{-6}	$9,8 \pm 0,6$	$12,3 \pm 0,4$

Примечание. Длина корня в безгормональной среде (контроль) составила $(4,1 \pm 0,4)$ мм.

Как регулятор роста при размножении орхидей *in vitro* 24-эпибрасинолид (ЭБ) был применен для инициации образования протокормподобных тел (ППТ) *Cymbidium elegans* из верхушек побегов [26]. Наибольшая доля экплантов (91 %), формирующих ППТ, была зарегистрирована на среде Митра с добавлением 4 мкмоль/л ЭБ. Добавление в среду Митра ЭБ также привело к индукции ППТ у растений *Cymbidium bicolor* [27]. Максимальный эффект на образование ППТ (стимуляция на 86 %) был обнаружен при культивировании поперечных тонкоклеточных слоев верхушек побегов на среде с добавлением ЭБ в концентрации 3 мкмоль/л.

Таким образом, проведенные исследования выявили высокую ростостимулирующую активность стероидных фитогормонов, в частности брасинолида и кастастерона, у представителей орхидных. Впервые показана стимуляция роста протокормов в культуре *in vitro* под действием БС, что может быть полезно при создании систем ускоренного размножения орхидей в искусственных условиях. Важно отметить, что БС не изменяли качественных показателей развития орхидей, т. е. влияли главным образом на скорость ростовых процессов. Полученные результаты могут найти прямое применение как в физиологии, так и в биотехнологии растений.

Библиографические ссылки

- Lopez RG, Runkle ES. Environmental physiology of growth and flowering of orchids. *HortScience*. 2005;40(7):1969–1973.
- Jones D, Tisserat B. Clonal propagation of orchids. *Methods in Molecular Biology*. 1990;6:181–191. DOI: 10.1385/0-89603-161-6:181.
- Baker A, Negahdar N, Kaviani B. Micropropagation of *Orchis catasetum* – a rare and endangered orchid. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*. 2014;13(2):197–205.
- Paek KY, Hahn EJ, Park SY. Micropropagation of *Phalaenopsis* orchids via protocorms and protocorm-like bodies. *Methods in Molecular Biology*. 2011;710:293–306. DOI: 10.1007/978-1-61737-988-8_20.
- Saad AIM, Elshahed AM. Plant tissue culture media. In: Rinaldi L (ed.) *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. 2012;2:29–40. DOI: 10.5772/50569.
- Villa F, Pasqual M, Silva EF. Micropropagation of orchid hybrids in Knudson culture medium with addition of vitamins of MS culture medium, benzilaminopurine and activated charcoal. *Semina: Ciências Agrárias*. 2014;35(2):683–693. DOI: 10.5433/1679-0359.2014v35n2p683.
- Liu J, Gao H, Wang X. Effects of 24-epibrassinolide on plant growth, osmotic regulation and ion homeostasis of salt-stressed canola. *Plant Biology*. 2014;16(2):440–450. DOI: 10.1111/plb.12052.
- Wu X. Effects of brassinolide on the antioxidant system and photosynthesis of cucumber seedlings under suboptimal temperature, light and salt environment. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*. 2015;26(9):2751–2757.
- Clouse SD, Sasse JM. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1998;49:427–451. DOI: 10.1146/annurev.arplant.49.1.427.
- Khripach V, Zhabinskii V, de Groot A. Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century. *Annals of Botany*. 2000;86(3):441–447. DOI: 10.1006/anbo.2000.1227.
- Ahamed GJ, Xia XJ, Li X, Shi K, Yu JQ, Zhou YH. Role of brassinosteroid in plant adaptation to abiotic stresses and its interplay with other hormones. *Current Protein and Peptide Science*. 2015;16(5):462–473. DOI: 10.2174/1389203716666150330141427.
- Bajguz A, Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2009;47(1):1–8. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.10.002.
- Kutschera U, Wang Z-Y. Brassinosteroid action in flowering plants: a Darwinian perspective. *Journal of Experimental Botany*. 2012;63(10):3511–3522. DOI: 10.1093/jxb/ers065.

14. Xia XJ, Wang YJ, Zhou YH, Tao Y, Mao WH, Shi K, et al. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Plant Physiology*. 2009;150(2):801–814. DOI: 10.1104/pp.109.138230.
15. Hartwig T, Chuck GS, Fujioka S, Klempien A, Weizbauer R, Potluri DPV, et al. Brassinosteroid control of sex determination in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(49):19814–19819. DOI: 10.1073/pnas.1108359108.
16. Wu CY, Trieu A, Radhakrishnan P, Kwok SF, Harris S, Zhang K, et al. Brassinosteroids regulate grain filling in rice. *The Plant Cell*. 2008;20(8):2130–2145. DOI: 10.1105/tpc.107.055087.
17. Kaur N, Kirat K, Saini S, Sharma I, Gantet P, Pati PK. Reactive oxygen species generating system and brassinosteroids are linked to salt stress adaptation mechanisms in rice. *Plant Signaling and Behavior*. 2016;11(12). DOI: 10.1080/15592324.2016.1247136.
18. Wang F, Bai MY, Deng Z, Osés-Prieto JA, Burlingame AL, Lu T, et al. Proteomic study identifies proteins involved in brassinosteroid regulation of rice growth. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2010;52(12):1075–1085. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2010.00992.x.
19. Козлова ОН, Бурчик НА. *In vitro* коллекция орхидных в ЦБС НАН Беларуси. *Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира: сборник докладов II Всероссийской научно-практической конференции, 19–21 августа 2008, Волгоград, Россия*. Белгород: БелГУ; 2008. с.109–112.
20. Mukerji KG, Chamola BP, Sharma AK. *Glimpses in botany. The orchid protocorm: on opinion*. New Delhi: APH Publishing Corporation; 1996.
21. Черевченко ТМ, Лаврентьева АН, Иванников РВ. *Биотехнология тропических и субтропических растений in vitro*. Киев: Наукова Думка; 2008.
22. Balilashaki K, Gantait S, Naderi R, Vahedi M. Capsule formation and asymbiotic seed germination in some hybrids of *Phalaenopsis*, influenced by pollination season and capsule maturity. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2015;21(3):341–347. DOI: 10.1007/s12298-015-0309-z.
23. Fast G. *Orcideen kultur*. Stuttgart: Ulmer, 1980.
24. Zeng SJ, Huang W, Wu K. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016;36(3):521–534. DOI: 10.3109/07388551.2014.993585.
25. Kumari IP, George TS. A study on *in vitro* shoot morphogenesis in *Dendrobium* cultivars induced by steroid plant growth regulator 28-homobrassinolide (28-hBL). *Acta Horticulturae*. 2017;1165:73–78. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1165.10.
26. Malabadi RB, Nataraja K. Brassinosteroids influences *in vitro* regeneration using shoot tip sections of *Cymbidium elegans* Lindl. *Asian Journal of Plant Sciences*. 2007;6(2):308–313. DOI: 10.3923/ajps.2007.308.313.
27. Malabadi RB, Teixeira JA, Nataraja K. Shoot tip transverse thin cell layers and 24-epibrassinolide in the micropropagation of *Cymbidium bicolor* Lindl. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. 2015;2(2):44–48.

References

1. Lopez RG, Runkle ES. Environmental physiology of growth and flowering of orchids. *HortScience*. 2005;40(7):1969–1973.
2. Jones D, Tisserat B. Clonal propagation of orchids. *Methods in Molecular Biology*. 1990;6:181–191. DOI: 10.1385/0-89603-161-6:181.
3. Baker A, Negahdar N, Kaviani B. Micropropagation of *Orchis catasetum* – a rare and endangered orchid. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*. 2014;13(2):197–205.
4. Paek KY, Hahn EJ, Park SY. Micropropagation of *Phalaenopsis* orchids via protocorms and protocorm-like bodies. *Methods in Molecular Biology*. 2011;710:293–306. DOI: 10.1007/978-1-61737-988-8_20.
5. Saad AIM, Elshahed AM. Plant tissue culture media. In: Rinaldi L (ed.) *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. 2012;2:29–40. DOI: 10.5772/50569.
6. Villa F, Pasqual M, Silva EF. Micropropagation of orchid hybrids in Knudson culture medium with addition of vitamins of MS culture medium, benzilaminopurine and activated charcoal. *Semina: Ciências Agrárias*. 2014;35(2):683–693. DOI: 10.5433/1679-0359.2014v35n2p683.
7. Liu J, Gao H, Wang X. Effects of 24-epibrassinolide on plant growth, osmotic regulation and ion homeostasis of salt-stressed canola. *Plant Biology*. 2014;16(2):440–450. DOI: 10.1111/plb.12052.
8. Wu X. Effects of brassinolide on the antioxidant system and photosynthesis of cucumber seedlings under suboptimal temperature, light and salt environment. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*. 2015;26(9):2751–2757.
9. Clouse SD, Sasse JM. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1998;49:427–451. DOI: 10.1146/annurev.arplant.49.1.427.
10. Khripach V, Zhabinskii V, de Groot A. Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century. *Annals of Botany*. 2000;86(3):441–447. DOI: 10.1006/anbo.2000.1227.
11. Ahammed GJ, Xia XJ, Li X, Shi K, Yu JQ, Zhou YH. Role of brassinosteroid in plant adaptation to abiotic stresses and its interplay with other hormones. *Current Protein and Peptide Science*. 2015;16(5):462–473. DOI: 10.2174/1389203716666150330141427.
12. Bajguz A, Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2009;47(1):1–8. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.10.002.
13. Kutschera U, Wang Z-Y. Brassinosteroid action in flowering plants: a Darwinian perspective. *Journal of Experimental Botany*. 2012;63(10):3511–3522. DOI: 10.1093/jxb/ers065.
14. Xia XJ, Wang YJ, Zhou YH, Tao Y, Mao WH, Shi K, et al. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Plant Physiology*. 2009;150(2):801–814. DOI: 10.1104/pp.109.138230.
15. Hartwig T, Chuck GS, Fujioka S, Klempien A, Weizbauer R, Potluri DPV, et al. Brassinosteroid control of sex determination in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(49):19814–19819. DOI: 10.1073/pnas.1108359108.
16. Wu CY, Trieu A, Radhakrishnan P, Kwok SF, Harris S, Zhang K, et al. Brassinosteroids regulate grain filling in rice. *The Plant Cell*. 2008;20(8):2130–2145. DOI: 10.1105/tpc.107.055087.

17. Kaur N, Kirat K, Saini S, Sharma I, Gantet P, Pati PK. Reactive oxygen species generating system and brassinosteroids are linked to salt stress adaptation mechanisms in rice. *Plant Signaling and Behavior*. 2016;11(12). DOI: 10.1080/15592324.2016.1247136.
18. Wang F, Bai MY, Deng Z, Osés-Prieto JA, Burlingame AL, Lu T, et al. Proteomic study identifies proteins involved in brassinosteroid regulation of rice growth. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2010;52(12):1075–1085. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2010.00992.x.
19. Kozlova ON, Burchik NA. *In vitro* kolleksiya orkhidnykh v Tsentral'nom botanicheskom sadu Natsional'noi Akademii nauk Belarusi. *Biotehnologiya kak instrument sokhraneniya bioraznoobraziya rastitel'nogo mira: sbornik dokladov II Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, 19–21 August 2008, Volgograd, Russia*. Belgorod: BelGU; 2008. p.109–112 (in Russ.).
20. Mukerji KG, Chamola BP, Sharma AK. Glimpses in botany. The orchid protocorm: on opinion. New Delhi: APH Publishing Corporation; 1996.
21. Cherevchenko TM, Lavrentyeva AN, Ivannikov RV. Biotechnology of tropical and subtropical plants *in vitro*. Kyiv: Naukova dumka; 2008 (in Russ.).
22. Balilashaki K, Gantait S, Naderi R, Vahedi M. Capsule formation and asymbiotic seed germination in some hybrids of *Phalaenopsis*, influenced by pollination season and capsule maturity. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2015;21(3):341–347. DOI: 10.1007/s12298-015-0309-z.
23. Fast G. *Orcideen kultur*. Stuttgart: Ulmer, 1980.
24. Zeng SJ, Huang W, Wu K. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016;36(3): 521–534. DOI: 10.3109/07388551.2014.993585.
25. Kumari IP, George TS. A study on *in vitro* shoot morphogenesis in *Dendrobium* cultivars induced by steroid plant growth regulator 28-homobrassinolide (28-hBL). *Acta Horticulturae*. 2017;1165:73–78. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1165.10.
26. Malabadi RB, Nataraja K. Brassinosteroids influences *in vitro* regeneration using shoot tip sections of *Cymbidium elegans* Lindl. *Asian Journal of Plant Sciences*. 2007;6(2):308–313. DOI: 10.3923/ajps.2007.308.313.
27. Malabadi RB, Teixeira JA, Nataraja K. Shoot tip transverse thin cell layers and 24-epibrassinolide in the micropropagation of *Cymbidium bicolor* Lindl. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. 2015;2(2):44–48.

Статья поступила в редколлегию 14.05.2018.
Received by editorial board 14.05.2018.