УДК 57.042
DOI 10.21685/2307-9150-2019-3-2

Е. В. Большакова, И. С. Емельянова, А. С. Лукаткин

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ОРХИДЕИ *ANOECTOCHILUS ROXBURGHII* (WALL.) В УСЛОВИЯХ *EX VITRO*

Аннотация.

Актуальность и цели. Одним из самых сложных и трудоемких этапов в клональном размножении оздоровленных растений *in vitro* является их перевод в условия *ex vitro* и адаптация к экзогенным факторам. Целью работы было определение наиболее подходящих концентраций индолилуксусной кислоты (ИУК) и длительности экспозиции для улучшения приживаемости, морфогенеза и роста орхидеи *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) в условиях *ex vitro*.

Материалы и методы. Пробирочные растения *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) высаживали в универсальный грунт для орхидей с предварительной обработкой раствором ИУК в концентрации 0–1 мг/л в течение 15 и 30 мин с последующим определением приживаемости, роста и органогенеза. Анализ данных осуществляли с использованием приложений Microsoft Excel и Statistica.

Результаты. Выявлено, что экспозиция орхидей в растворе ИУК показала лучшие приживаемость и рост растений в условиях *ex vitro*, чем пересадка без предварительной обработки растений-регенерантов.

Выводы. В ходе исследования выяснилось, что 15-минутная экспозиция клонально размноженных растений *Anoectochilus roxburghii* в растворе ИУК с концентрацией 0,5 мг/л показала наилучший отклик растений на перенос в нестерильные условия.

Ключевые слова: *Anoectochilus roxburghii* (Wall.), культивирование *in vitro*, *ex vitro*, индолилуксусная кислота, приживаемость, морфогенез, рост.

E. V. Bol'shakova, I. S. Emel'yanova, A. S. Lukatkin

CULTIVATION OF THE ORCHID *ANOECTOCHILUS ROXBURGHII* (WALL.) *EX VITRO*

Abstract.

Background. One of the most difficult and time-consuming stages in clonal propagation of regenerated plants is their transfer into *ex vitro* conditions and adaptation to exogenous factors. The aim of the work was to determine the most appropriate concentration of indoleacetic acid (IAA) and the exposure duration to survival, morphogenesis and growth of the orchid *Anoectochilus roxburghii* (Walls.) *ex vitro*.

Materials and methods. Test-tube plants *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) was planted in a universal soil for orchids with pretreatment with IAA solution at a concentration from 0 to 1,0 mg/L for 15 and 30 minutes, followed by determination of survival, growth and organogenesis. Data analysis was carried out using Microsoft Excel and Statistica applications.

© Большакова Е. В., Емельянова И. С., Лукаткин А. С., 2019. Данная статья доступна по условиям всемирной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), которая дает разрешение на неограниченное использование, копирование на любые носители при условии указания авторства, источника и ссылки на лицензию Creative Commons, а также изменений, если таковые имеют место.

Results. It is revealed that exposure of orchids in IAA solutions has the best survival and growth of plants in conditions *ex vitro* than transplantation of regenerated plants without IAA pretreatment.

Conclusions. This research showed that a 15-minute exposure of clonally propagated plants *Anoectochilus roxburghii* in 0,5 mg/L IAA solution revealed the best plants response to transfer in non-sterile conditions.

Keywords: *Anoectochilus roxburghii* (Wall.), *in vitro* culture, *ex vitro*, indoleacetic acid, survival, morphogenesis, growth.

Введение

В роду Анектохилус (*Anoectochilus* Bl.) насчитывается около 40 видов орхидей [1]. Из множества культивируемых орхидей эта группа стоит особняком, она ценится не за цветы, а за красоту листьев с бархатистой кожицей и яркой цветной сеточкой жилок, которые образуют самые разнообразные узоры. Они могут быть серебряными, золотыми, цвета красной меди, бронзы и даже иметь разную окраску на одном листе [2].

В настоящее время информации по культивированию орхидей этого рода в культуре *in vitro* очень мало [3, 4], а по их переводу в условия *ex vitro* практически нет. Для растений-регенерантов в условиях *ex vitro* имеется ряд проблем, которые связаны с физиологическими и анатомическими особенностями листьев и корней. К ним относятся слабая фотосинтетическая деятельность; низкая активность устьичного аппарата, как следствие – потеря воды и обезвоживание растений; неспособность к образованию корней второго порядка в условиях *in vitro* [5, 6]. Поэтому при переносе растений-регенерантов в условия *ex vitro* для лучшей адаптации следует поддерживать высокую влажность для надземной части с постепенным ее понижением и подбирать оптимальные условия для роста корней. Проведено множество исследований по оптимизации основных стадий микроразмножения, но на данный момент процесс акклиматизации растений к нестерильным условиям изучен недостаточно [7]. Для ускоренного роста корней клонов растений в качестве стимулятора корнеобразования зачастую используют ИУК, индолилмасляную или нафтилуксусную кислоту [8].

Цель исследования – определение наиболее подходящих концентраций ИУК и длительности экспозиции для улучшения приживаемости, морфогенеза и роста орхидеи *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) в условиях *ex vitro*.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта использовали стерильные пробирочные растения анектохилуса роксбурга *Anoectochilus roxburghii* (Wall.), любезно предоставленные сотрудниками Лаборатории клеточной биотехнологии Центрального ботанического сада НАН Республики Беларусь. Клональное размножение растений *in vitro* проводили на среде по прописи Мурасиге – Скуга (МС) [9] с добавлением активированного угля (1 г/л), регуляторов роста – 0,5 мг/л ИУК и цитокининов (кинетина или 6-бензиламинопурина) в концентрациях 0,5–4,0 мг/л [10] (рис. 1,*а*). Экспланты с хорошо развитой корневой системой вынимали из пробирок, промывали проточной водой для удаления питательной среды (рис. 1,*б*) и помещали в раствор ИУК. При этом варьировали концентрацию от 0,1 до 1,0 мг/л и время экспозиции – 15 и 30 мин (контроль вы-

держивали такое же время в воде). Затем растения-регенеранты высаживали в емкости с универсальным грунтом для орхидей, которые для прохождения процесса адаптации накрывали полиэтиленовой пленкой толщиной 6 мкм (для поддержания влажности). Грунт включал в себя смесь верхового и низинного торфов, азофоску марки NPK (MOP) 16:16:16, известняковую муку; pH 5,5–6,5. Выращивание проводили при 16-часовом фотопериоде и температуре 22–24 °C (рис. 1,*в*).

а)

б)

в)

Рис. 1. *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) на разных стадиях культивирования: *а* – в культуре *in vitro* на среде МС; *б* – вне пробирки, перед обработкой раствором ИУК; *в* – в культуре *ex vitro*, спустя три месяца выращивания

В каждом варианте опыта было по 12–15 растений. Измерения проводили раз в месяц после первых двух недель культивирования в условиях *ex vitro*. При этом учитывали следующие показатели: количество листьев, их размеры, длину побегов. Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием программ Microsoft Excell и Statistica. В нижеприведенных таблицах показаны средние арифметические величины 3-месячных растений с их стандартными ошибками. Достоверность различий между вариантами оценивали по критерию Дункана [11].

Результаты и обсуждение

Перевод растений-регенерантов в условия *ex vitro* – самый сложный процесс при работе с пробирочными растениями, так как в естественных условиях (в отличие от условий *in vitro*) на растения влияет множество иных факторов (состав почвенного субстрата, pH, влажность почвы и воздуха, микрофлора и т.д.) [8].

Решающую роль при переносе растений-регенерантов в условия *ex vitro* играет хорошо сформированная корневая система. Поэтому особое внимание уделяют факторам, способным повлиять на ее образование. Для этого пользуются методом гидропонной установки [12], мини-камерами, содержащими почвенный субстрат и помещенными в специальный раствор [13], а также предварительно выдерживают в растворах с регуляторами роста.

Корневая система, сформированная на растениях *in vitro*, при переносе растений в нестерильные почвенные субстраты в большинстве случаев гибнет. Активное участие в формировании корневой системы в условиях *ex vitro* принимают ауксины, поэтому должно быть достаточное их количество [8]. В связи с этим для лучшего формирования корневой системы мы использовали для обработки растений перед высадкой ИУК в концентрациях 0,1–1,0 мг/л.

В результате исследования выяснили, что наиболее успешно приживались растения анектохилуса, обработанные 0,5 мг/л ИУК в течение 15 мин. Значение данного показателя в этом варианте было почти в 2 раза больше, чем в контроле (табл. 1). При 30-минутной экспозиции наиболее хороший результат по приживаемости был получен в растворе с концентрацией 1,0 мг/л ИУК, но данный показатель был ниже, чем пиковое значение всего опыта (15 мин в растворе 0,5 мг/л ИУК). Следовательно, для успешного перевода растений анектохилуса в условия нестерильной среды из культуры *in vitro* можно использовать обработку 0,5 мг/л ИУК в течение 15 мин.

Таблица 1

Влияние времени экспозиции и концентрации ИУК на приживаемость растений *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) в условиях e*x vitro*

Время экспозиции, мин	Концентрация ИУК, мг/л	Приживаемость, %
контроль	0	57
15	0,1	82
	0,5	100
	1,0	94
30	0,1	66
	0,5	79
	1,0	83

При изучении воздействия длительности экспозиции и концентрации ИУК на морфогенез были получены следующие результаты. Выявлено, что по количеству побегов существенных и достоверных различий между вариантами опыта получено не было. В контроле и во всех опытах с 15-минутной экспозицией, кроме концентрации 1,0 мг/л, образовывалось в среднем по одному побегу на растение. В остальных вариантах опыта данный показатель был незначительно выше (в среднем 1,1 шт. на растение).

По влиянию предобработки растений-регенерантов в растворах ИУК на длину побега в условиях *ex vitro* выявлено, что максимальный рост был в варианте с 15-минутной обработкой при концентрации ИУК 0,5 мг/л. Это значение практически в 2 раза больше, чем тот же показатель в контроле и в опыте при той же концентрации, но после 30-минутной выдержки (рис. 2).

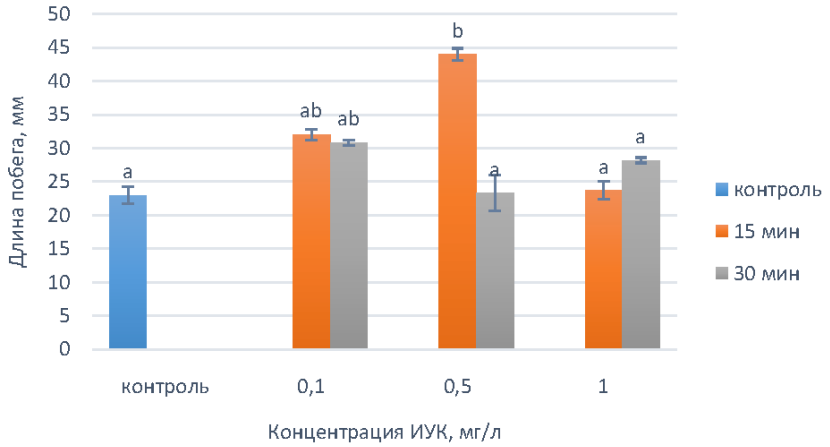

Рис. 2. Зависимость длины побега анектохилуса от времени экспозиции и концентрации ИУК

По количеству образовавшихся листьев можно отметить, что наибольшее их количество было в вариантах с использованием ИУК в концентрации 0,1 мг/л при обеих выдержках, что в среднем на 1 шт. больше, чем в контроле (табл. 2). Максимальная длина листьев была отмечена при той же концентрации, но только при 15-минутной экспозиции.

Таблица 2

Влияние времени экспозиции и концентрации регулятора роста на морфогенез листьев *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) в условиях *ex vitro*

Время экспозиции, мин	Концентрация ИУК, мг/л	Количество листьев, шт.	Длина листьев, мм
контроль	0	3,4 ± 0,3	9,7 ± 1
15	0,1	4,4 ± 0,3	12,9 ± 1,1
	0,5	4 ± 0,2	11,4 ± 0,5
	1,0	3,4 ± 0,1	10,5 ± 0,8
30	0,1	4,3 ± 0,2	11,4 ± 0,7
	0,5	3,9 ± 0,3	10,9 ± 0,6
	1,0	3,9 ± 0,1	12,2 ± 0,8

Таким образом, наилучшее действие на морфогенез *Anoectochilus roxburghii* оказало предварительное выдерживание в растворе ИУК с концентрацией 0,5 мг/л и временем 15 мин.

Заключение

Анализ данных показал, что использование индолилуксусной кислоты в качестве агента, стимулирующего рост и приживаемость растений при переносе из культуры *in vitro* в нестерильные условия, оказывает благоприятное воздействие на растения орхидеи *Anoectochilus roxburghii* (Wall.). Приживаемость, органогенез и рост были выражены лучше вследствие 15-минутной экспозиции клонально размноженных растений в 0,5 мг/л ИУК.

Библиографический список

1. **Белицкий, И. В.** Орхидеи / И. В. Белицкий. – Москва : АСТ : Астрель, 2001. – 175 с.
2. **Згурская, М. П.** Орхидеи / М. П. Згурская. – Харьков : Фолио, 2008. – 223 с.
3. Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus* / N. V. Ket, E. J. Hanh, S. Y. Park, D. Chakrabarty, K. Y. Paek // Biologia plantarum. – 2004. – Vol. 48, № 3. – P. 339–344.
4. Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and *in vitro* culture of seeds / Y.-J. Shiau, A. P. Sagare, U.-C. Chen, S.-R. Yang, H.-S. Tsay // Botanical Bulletin of Academia Sinica. – 2002. – Vol. 43. – P. 123–130.
5. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions / J. Pospíšilová, I. Tichá, P. Kadleček, D. Haisel, Š. Plzáková // Biologia Plantarum. – 1999. – Vol. 42, № 4. – P. 481–497.
6. **Гиголашвили, Т. С.** Условия микроклонирования формируют специфический культуральный фенотип / Т. С. Гиголашвили, О. Н. Родькин, В. Г. Реуцкий // Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда : тез. докл. VII Междунар. конф. – Москва, 1997. – С. 413.
7. **Hazarika, B. N.** Acclimatization of tissue-cultured plants / B. N. Hazarika // Current Science. – 2003. – Vol. 85, № 12. – P. 1704–1712.
8. **Деменко, В. И.** Адаптация растений, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям / В. И. Деменко, В. А. Лебедев // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 1. – С. 60–70.
9. **Murashige, T.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473–497.
10. **Большакова, Е. В.** Влияние среды и регуляторов роста на органогенез орхидей в культуре *in vitro* / Е. В. Большакова, О. А. Ведяшкина, И. С. Емельянова, А. С. Лукаткин // Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на Севере : сб. материалов III науч.-практ. конф. с междунар. участием и Научной школы по клеточной биотехнологии (4–8 июня 2018 г.). – Якутск : Изд. дом СВФУ, 2018. – С. 118–122.
11. Большой практикум по ботанике, физиологии и экологии растений : учеб. пособие / А. С. Лукаткин, Д. И. Башмаков, Э. Ш. Шаркаева, Е. В. Мокшин, Т. С. Колмыкова, Т. Б. Силаева, Е. В. Варгот, А. М. Агеева. – Саранск : Изд-во Мордовского ун-та, 2015. – 332 с.
12. **Вечернина, Н. А.** Адаптация растений-регенерантов с использованием гидропоники / Н. А. Вечернина, О. К. Таварткиладзе, И. Д. Бородулина, А. А. Эрст //

Известия Алтайского государственного университета. – 2008. – № 3 (55). – С. 7–10.
13. *Ex vitro* rooting using a mini growth chamber increases root induction and accelerates acclimatization of Kopyor coconut (*Cocos nucifera* L.) embryo culture-derived seedlings / A. A. Husin, T. Julianto, A. Yuniaty, A. Rival, St. W. Adkins // In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant. – 2018. – Vol. 54, № 5. – P. 508–517.

References

1. Belitskiy I. V. *Orkhidei* [Orchids]. Moscow: AST: Astrel', 2001, 175 p. [In Russian]
2. Zgurskaya M. P. *Orkhidei* [Orchids]. Kharkov: Folio, 2008, 223 p. [In Russian]
3. Ket N. V., Hanh E. J., Park S. Y., Chakrabarty D., Paek K. Y. *Biologia plantarum*. 2004, vol. 48, no. 3, pp. 339–344.
4. Shiau Y.-J., Sagare A. P., Chen U.-C., Yang S.-R., Tsay H.-S. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 2002, vol. 43, pp. 123–130.
5. Pospíšilová J., Tichá I., Kadleček P., Haisel D., Plzáková Š. *Biologia Plantarum*. 1999, vol. 42, no. 4, pp. 481–497.
6. Gigolashvili T. S., Rod'kin O. N., Reutskiy V. G. *Biologiya kletok rasteniy in vitro, biotekhnologiya i sokhranenie genofonda: tez. dokl. VII Mezhdunar. konf.* [Biology of plant cells in vitro, biotechnology and gene pool preservation: proceedings of VII International conference]. Moscow, 1997, p. 413. [In Russian]
7. Hazarika B. N. *Current Science*. 2003, vol. 85, no. 12, pp. 1704–1712.
8. Demenko V. I., Lebedev V. A. *Izvestiya Timiryazevskoy sel'skokhozyaystvennoy akademii* [Proceedings of Timiryazev Agricultural Academy]. 2011, no. 1, pp. 60–70. [In Russian]
9. Murashige T., Skoog F. *Physiol. Plant*. 1962, vol. 15, no. 3, pp. 473–497.
10. Bol'shakova E. V., Vedyashkina O. A., Emel'yanova I. S., Lukatkin A. S. *Perspektivy fitobiotekhnologii dlya uluchsheniya kachestva zhizni na Severe: sb. materialov III nauch.-prakt. konf. s mezhdunar. uchastiem i Nauchnoy shkoly po kletochnoy biotekhnologii (4–8 iyunya 2018 g.)* [Prospects of phytobiotechnologies for life quality improvmeent in the North: proceedings of III scientific and practical conference with international participation and the Scientific school of cell biotechnologies (June 4th–8th, 2018)]. Yakutsk: Izd. dom SVFU, 2018, pp. 118–122. [In Russian]
11. Lukatkin A. S., Bashmakov D. I., Sharkaeva E. Sh., Mokshin E. V., Kolmykova T. S., Silaeva T. B., Vargot E. V., Ageeva A. M. *Bol'shoy praktikum po botanike, fiziologii i ekologii rasteniy: ucheb. posobie*. [Universal tutorial on botany, physiology and ecology of plants: tutorial]. Saransk: Izd-vo Mordovskogo un-ta, 2015, 332 p. [In Russian]
12. Vechernina N. A., Tavartkiladze O. K., Borodulina I. D., Erst A. A. *Izvestiya Altayskogo gosudarstvennogo universiteta* [Proceedings of Altay State University]. 2008, no. 3 (55), pp. 7–10. [In Russian]
13. Husin A. A., Julianto T., Yuniaty A., Rival A., Adkins St. W. *In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant*. 2018, vol. 54, no. 5, pp. 508–517.

Большакова Екатерина Викторовна
аспирант, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарева (Россия, г. Саранск, ул. Большевистская, 68)

E-mail: Fateeva.ek.v@yandex.ru

Bol'shakova Ekaterina Viktorovna
Postgraduate student, Ogarev Mordovia State University (68 Bolshevistskaya street, Saransk, Russia)

Емельянова Ирина Сергеевна
аспирант, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарева (Россия, г. Саранск, ул. Большевистская, 68)

E-mail: emelyanovairina08@rambler.ru

Emel'yanova Irina Sergeevna
Postgraduate student, Ogarev Mordovia State University (68 Bolshevistskaya street, Saransk, Russia)

Лукаткин Александр Степанович
доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой ботаники, физиологии и экологии растений, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарева (Россия, г. Саранск, ул. Большевистская, 68)

E-mail: aslukatkin@yandex.ru

Lukatkin Aleksandr Stepanovich
Doctor of biological sciences, professor, head of sub-department of botany, physiology and ecology of plants, Ogarev Mordovia State University (68 Bolshevistskaya street, Saransk, Russia)

Образец цитирования:

Большакова, Е. В. Культивирование орхидеи *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) в условиях *ex vitro* / Е. В. Большакова, И. С. Емельянова, А. С. Лукаткин // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – 2019. – № 3 (27). – С. 16–23. – DOI 10.21685/2307-9150-2019-3-2.