

БИОЛОГИЯ

УДК 581.1.035

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА РАЗМНОЖЕНИЕ И РОСТ ПОБЕГОВ *CYMBIDIUM HYBRIDUM* HORT. *IN VITRO*

© 2013 г.

И.Н. Вельмяйкин, Е.В. Мокишин, А.С. Лукаткин

Мордовский госуниверситет им. Н.П. Огарёва, Саранск

aslukatkin@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.05.2012

Изучено влияние препаратов Эпин-Экстра, Рибав-Экстра и 6-бензиламинопурина на рост и органогенез цимбидиума гибридного *in vitro*. Выявлены оптимальные концентрации Эпин-Экстра для роста побегов ($10^{-4}\%$, $10^{-5}\%$) и размножения псевдобульбами ($10^{-6}\%$). Рибав-Экстра и 6-бензиламинопурина стимулировали рост побегов (максимумы отмечены при концентрациях 10^{-4} ; 1.0 и 3.0 мг/л соответственно).

Ключевые слова: цимбидиум гибридный, микроклональное размножение, *in vitro*, рост, псевдобульбы, регуляторы роста, Рибав-Экстра, Эпин-Экстра, 6-бензиламинопурина.

Введение

Современные сорта орхидей, произрастающие в тропиках и субтропиках, занимают ведущее место в мировой цветочной индустрии [1]. Все представители семейства Орхидные (*Orchidaceae*) имеют очень декоративные цветки, и именно из-за красоты их все чаще используют как комнатные растения. Высокой декоративностью обладают сортовые растения, происходящие из родов *Cymbidium* Sw., *Phalaenopsis* Blum., *Paphiopedilum* Pfitz., *Dendrobium* Sw., *Oncidium* Sw., *Miltonia* Lindl., *Odontoglossum* H.B.K., *Cattleya* Lindl., *Laelia* Lindl. [2].

Один из высокодекоративных представителей этого семейства – цимбидиум гибридный (*Cymbidium hybridum* hort.). Это крупное растение с толстыми, мясистыми корнями и тесно сгруппированными яйцевидными псевдобульбами. Листья ланцетные, длиной 60–70 см, шириной 2–3 см, обхватывают псевдобульбу у основания. Цветонос длиной до 70 см, но есть и миниатюрные гибриды. Цветки крупные, держатся на растении больше месяца. Цветет цимбидиум весной, цветение длится несколько месяцев. Колосовидные соцветия цимбидиума вырастают из овальных псевдобульб, каждое из них может содержать 25–30 цветков. Цветки цимбидиума могут быть однотонными или крапчатыми с широкой цветовой гаммой: белые, розовые, зеленые, красные, коричневые, желтые, зеленые, кремовые. Произрастает цимбидиум в горных районах тропиче-

ской Азии на высоте 1500–2000 м над уровнем моря [3, 4].

В настоящее время существенная часть орхидных находится под угрозой исчезновения. Причиной возникновения такой ситуации послужили, с одной стороны, уязвимость орхидей, имеющих сложную биологию размножения – узкоспециализированное перекрестное опыление; облигатный симбиоз с мицелием гриба определенного вида, необходимый для прорастания микроскопических зародышей, лишенных запасных веществ; длительный цикл развития (до 17 лет); с другой стороны – мощный антропогенный пресс (уничтожение мест их обитания и др.) [5, 6].

Одним из возможных путей сохранения орхидных является их искусственное размножение в культуре *in vitro* для широкого внедрения в практику растениеводства как высокодекоративных растений и, одновременно, возвращение их в естественную среду обитания [7]. Следовательно, технологии клонального микроразмножения представляют исключительную ценность для поддержания биоразнообразия коллекций и сохранения генофонда цветочно-декоративных растений [8].

В литературе имеются отрывочные сведения о влиянии различных регуляторов роста на размножение, развитие почек, индукцию цветения в культуре *in vitro* ряда видов *Cymbidium* [9–11]. Однако сведения по влиянию регуляторов роста на каллусогенез и органогенез орхидных и выбор оптимальных концентраций довольно противоречивы [12, 13]. Очевидно, что для каж-



Рис. 1. Образование псевдобульб у цимбидиума гибридного на среде МС с добавлением $10^{-6}\%$ Эпин-Экстра

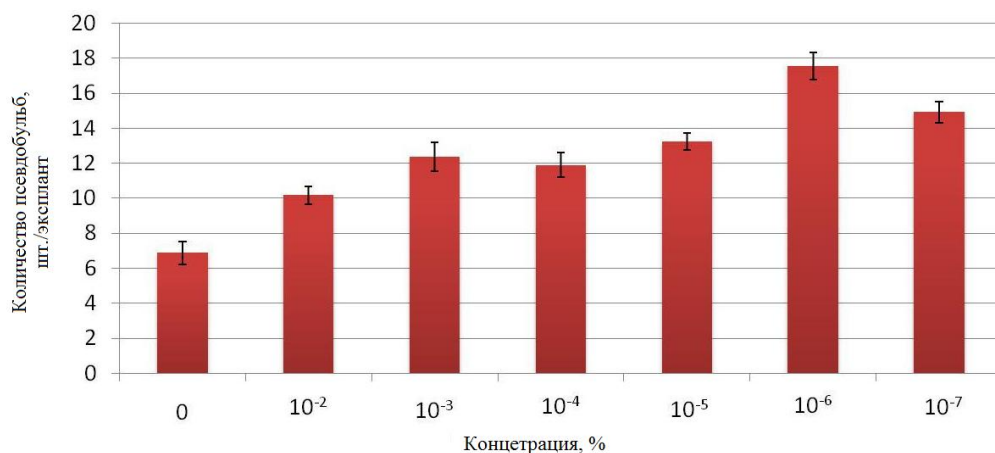


Рис. 2. Влияние различной концентрации Эпин-Экстра на среде МС на образование псевдобульб у цимбидиума гибридного

дого вида нужно подбирать индивидуальные параметры состава питательной среды, регуляторов роста и др. В связи с этим можно предположить, что применение регуляторов роста будет неодинаково интенсивно стимулировать рост побегов и размножение у цимбидиума.

Цель данной работы – изучить влияние различных концентраций регуляторов роста Эпин-Экстра, Рибав-Экстра и 6-бензиламинопурина (6-БАП) на рост, побегообразование и размножение цимбидиума гибридного в культуре *in vitro*.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования служили стерильные пробирочные растения *Cymbidium hybridum* hort. «Memoria Amelia Earhart», любезно предоставленные сотрудниками Главного ботанического сада РАН и размноженные в культуре *in vitro*, и регуляторы роста: 6-БАП – синтетический регулятор роста цитокининового типа действия (ICN Pharmaceuticals, Inc., USA); Рибав-Экстра – продукт метаболизма микоризных грибов, выделенных из корней женьшеня (ЗАО «Сельхозэкосервис», Москва, Россия); Эпин-Экстра – регулятор роста, содержащий 0.025 г/л 24-эпибрасинолида (НЭСТ-М, Москва, Россия).

Для клонального микроразмножения использовали псевдобульбы, а также части побегов. Экспланты высаживали на питательную

среду Мурасиге и Скуга [14], содержащую различные концентрации регуляторов роста: 6-БАП (0.1–4.0 мг/л), Рибав-Экстра (10^{-2} – $10^{-7}\%$), Эпин-Экстра (10^{-2} – $10^{-7}\%$); для сравнения использовали вариант без регуляторов роста. Пробирки с растениями оставляли на 6 недель в условиях непрерывного освещения и комнатной температуры (23–25°C). Измерения проводили спустя 6 недель после посадки, учитывали длину побега (длину листовой пластинки без туберидия) и количество образовавшихся псевдобульб.

Число повторностей в каждом варианте опыта – 8. На рис. 1–8 представлены средние значения с их стандартными ошибками, рассчитанные по стандартным биометрическим критериям. Результаты обрабатывали с использованием программы *Microsoft Excel*.

Результаты и их обсуждение

Один из факторов, влияющих на органогенез в культуре *in vitro*, является количество регуляторов роста в среде. В работе изучали влияние трех различных регуляторов. Выявлено, что применение препарата Эпин-Экстра в целях размножения цимбидиума (посредством образования псевдобульб) было довольно успешным (рис. 1). Количество сформировавшихся псевдобульб зависело от концентрации регулятора в среде (рис. 2). Можно видеть, что Эпин-Экстра максимально стимулировал образование псев-

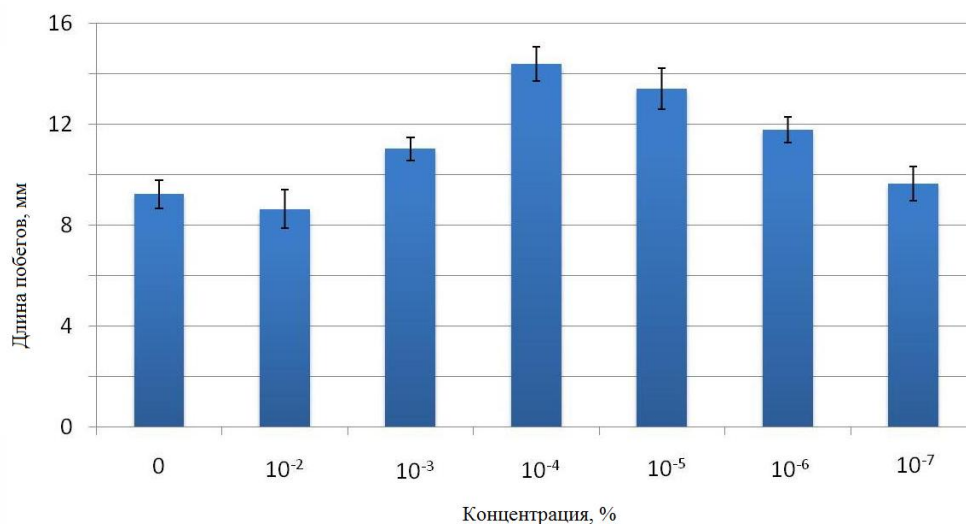


Рис. 3. Влияние различных концентраций Эпин-Экстра на длину побегов у цимбидиума

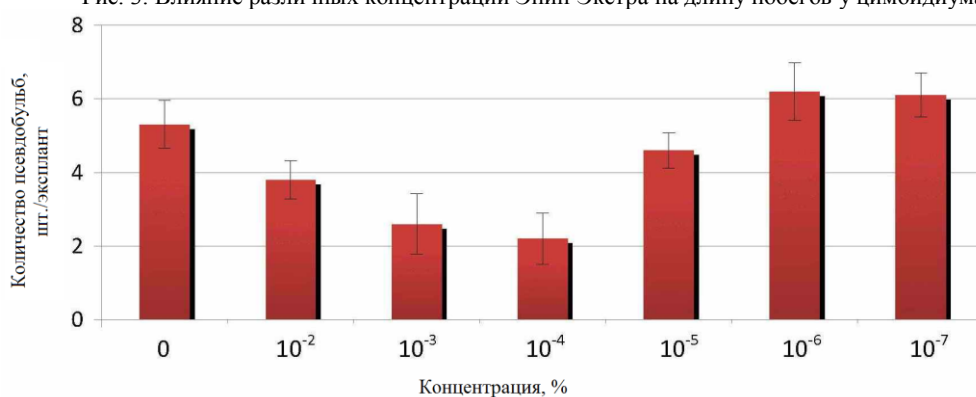


Рис. 4. Влияние препарата Рибав-Экстра на образование псевдобульб у цимбидиума гибридного

Рис. 5. Рост побегов у цимбидиума гибридного на среде МС с добавлением 10⁻⁴% Рибав-Экстра

добульб цимбидиума при концентрации 10⁻⁶%. Применение препарата в больших концентрациях прогрессирующе тормозило образование псевдобульб.

Изучение действия препарата Эпин-Экстра на рост побегов цимбидиума показало, что некоторые концентрации регулятора существенно повышали длину побегов (рис. 3). Максимальная длина побегов была при концентрациях эпинбрасинолида 10⁻⁴ и 10⁻⁵%, что регистрировалось на протяжении всего периода культивирования. Более высокие и низкие дозы регулятора в среде приводили к существенному замедлению процессов роста, в результате длина побегов достоверно не отличалась от варианта без регулятора.

Использование природного регулятора Рибав-Экстра показало, что этот препарат не индуцировал обильного образования псевдобульб по сравнению с вариантом без регулятора, а при

концентрациях 10⁻³–10⁻⁴% они образовывались в совсем малых количествах (рис. 4). Большой эффект данный препарат оказал на рост побегов (рис. 5). При этом выявлена типичная для регуляторов роста одновершинная кривая с максимумом (20 мм) при концентрации 10⁻⁴% (рис. 6). Малые концентрации в меньшей степени стимулировали рост побегов. Активация ростовых процессов цимбидиума при действии данного регулятора обусловлена тем, что в состав препарата входит смесь аминокислот, которые включаются в синтез белков, регулирующих процессы роста и развития проростков, а также ряд биологически активных соединений, влияющих на деление клеток и рост органов.

Использование 6-БАП в качестве регулятора роста для цимбидиума тоже дало неплохие результаты. Образование псевдобульб происходило не при всех концентрациях и в малых количествах (5–6 шт. на эксплант) (рис. 7). Так как

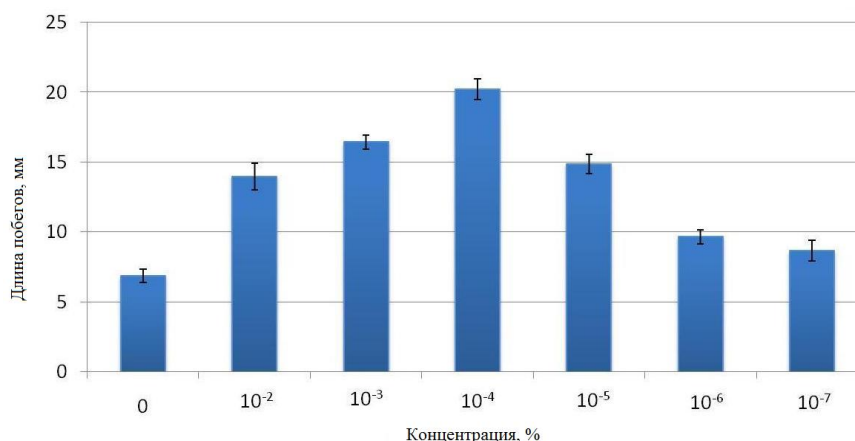


Рис. 6. Влияние различных концентраций Рибав-Экстра на длину побегов у цимбидиума

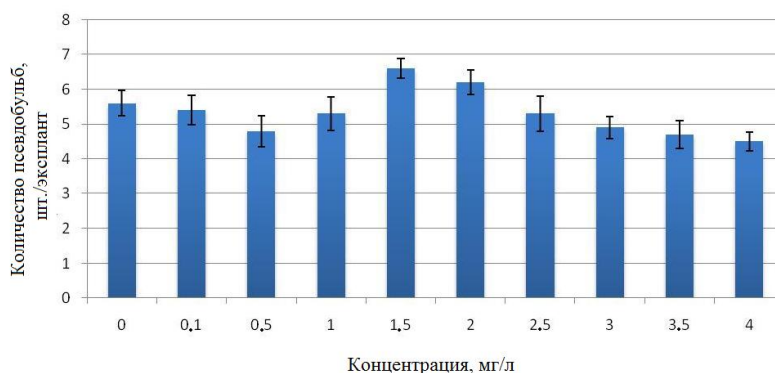


Рис. 7. Влияние 6-БАП на образование псевдобульб у цимбидиума гибридного

данный регулятор роста является синтетическим цитокинином, он в большей степени стимулирует рост вегетативных органов; показано (рис. 8), что максимальная длина побега цимбидиума в культуре *in vitro* была при концентрациях 1.0 и 3.0 мг/л (около 14.5 мм).

Сравнение различных регуляторов роста показало, что органогенез (образование псевдобульб) более интенсивно шел в случае Эпин-Экстра, на втором месте – 6-БАП. Использование Рибав-Экстра с этой целью было неэффективным. В то же время рост побегов был максимальным при использовании препарата Рибав-Экстра, за которым следовали 6-БАП и Эпин-Экстра.

В литературе имеются немногочисленные сведения о применении регуляторов роста при размножении орхидных [4, 9–11, 15]. Показано, что использование тидиазурина в концентрациях 0.01–1 мг/л способствовало инициации побеговых почек у *Cymbidium sinense* Willd. *in vitro* [9]. Сравнение тидиазурина, N⁶-(2-изопентенил)аденина и 6-БАП при размножении *Cymbidium ensifolium* var. *misericors* *in vitro* выявило наибольшую эффективность тидиазурина (3.3–10 мкМ) и N⁶-(2-изопентенил)аденина (10–33 мкМ) в комбинации с 1.5 мкМ α-нафтилуксусной кислоты (НУК) для индукции образования цветков [10]. При изучении влияния ре-

гуляторов роста на размножение *in vitro* *Cymbidium faberi* Rolfe выяснено, что 1.0 мг/л 6-БАП + 0.5 мг/л НУК максимально повышали индукцию адвентивных побегов, тогда 0.5 мг/л индолмасляной кислоты было оптимальной дозой для укоренения [11]. В то же время подавляющее большинство работ связано с использованием только синтетических цитокининов, тогда как по аналогам brassinosteroidов и природных регуляторов роста данные полностью отсутствуют.

Выводы

В ходе проведенных опытов по влиянию регуляторов роста на органогенез и рост *Cymbidium hybridum* hort. «Memoria Amelia Earhart» в культуре *in vitro* выявлен положительный эффект применения данных препаратов в определенных концентрациях:

- 1) оптимальная концентрация Эпин-Экстра для образования псевдобульб – 10⁻⁶%, для роста побегов цимбидиума – 10⁻⁴%;
- 2) применение препарата Рибав-Экстра в концентрации 10⁻⁴% способствовало интенсивному росту побегов у цимбидиума;
- 3) 6-БАП стимулировал рост побегов цимбидиума, особенно при концентрациях 1.0 и 3.0 мг/л.

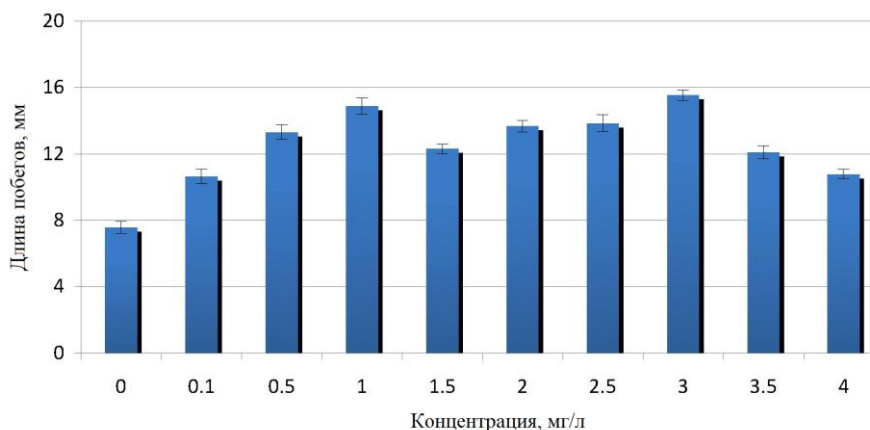


Рис. 8. Влияние различных концентраций 6-БАП на длину побегов у цимбидиума

Выявленные концентрационные закономерности применения синтетических и природного регуляторов роста могут быть использованы при размножении *Cymbidium hybridum hort.* «Memoria Amelia Earhart» *in vitro*, в зависимости от предпочитаемого способа размножения – через побеги или псевдобульбы.

Авторы выражают благодарность зав. лабораторией биотехнологии растений ГБС РАН им. Н.В. Цицина О.И. Молкановой за любезно предоставленные растения цимбидиума гибридного, Н.А. Толмачевой (ЗАО «Сельхозэкосервис») за любезно предоставленный препарат Рибав-Экстра.

Список литературы

1. Гродзинский А.М. Биология орхидей. Загадки и перспективы // Охрана и культивирование орхидей. Киев: Наукова думка, 1983. С. 3–6.
2. Висящева Л.В., Соколова Т.А. Промышленное цветоводство. М.: Агропромиздат, 1991. 386 с.
3. Селезнева В.А. Тропические и субтропические орхидеи. М.: Наука, 1965. 170 с.
4. Вахрамеева М.Г., Денисова Л.В., Никитина С.В., Самсонов С.К. Орхидеи нашей страны. М.: Наука, 1991. 223 с.
5. Батыгина Т.Б. Система воспроизведения у орхидных // Матер. Всесоюз. симп. «Охрана и культивирование орхидей», Таллин, 1980. С. 107–110.
6. Антипина В.А. Размножение редких тропических орхидных *in vitro* // Матер. II Всерос. науч.-

практ. конф. «Биология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира», Белгород, 19–21 августа 2008. С. 29–33.

7. Бутенко Р.Г. Клеточные технологии в сельскохозяйственной науке и практике // В кн.: Основы сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Наука, 1990. С. 154–235.

8. Родин А.Р., Калашникова Е.А. Получение посадочного материала древесных, цветочных и травянистых растений с использованием методов биотехнологии. М.: МГУЛ, 2004. 84 с.

9. Chang C., Chang W. Effect of thidiazuron on bud development of *Cymbidium sinense* Willd *in vitro* // Plant Growth Regul. 2000. V. 30. № 2. P. 171–175.

10. Chang C., Chang W. Cytokinins promotion of flowering in *Cymbidium ensilium* var. *Misericors* *in vitro* // Plant Growth Regul. 2003. V. 39. № 3. P. 217–221.

11. Jun T., Liqin Y., Fen K., Daqiu Z. Effects of plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Cymbidium faberi* Rolfe // African J. Biotechnology. 2011. V. 10 (69). P. 15639–15646.

12. Chowdhury I., Rahman A.R.M., Islam M.O., Matsui S. Effect of plant growth regulators on callus proliferation, plantlet regeneration and growth of plantlets of *Doritaenopsis* orchid // Biotechnology. 2003. V. 2. P. 214–221.

13. Козицкий Ю.Н., Борукаева М.Ф., Смирнова Н.С. Регуляторы роста и микро размножение цветочных культур // Цветоводство. 1980. № 2. С. 13–15.

14. Мокшин Е.В., Лукаткин А.С. Практикум по культуре растительных клеток и тканей: учебное пособие. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2009. 60 с.

15. Черевченко Т.М. Тропические и субтропические орхидеи / Отв. ред. Д.Н. Доброчаева; НАН Украины, Центр. бот. сад им. Н.Н. Гришко. Киев: Наукова думка, 1993. 254 с.

EFFECT OF GROWTH REGULATORS ON *IN VITRO* SHOOT GROWTH AND PROPAGATION OF *CYMBIDIUM HYBRIDUM HORT.*

I.N. Velmyaykin, E.V. Mokshin, A.S. Lukatkin

The effects of plant growth regulators Epin-Extra, Ribav-Extra, and 6-benzylaminopurine on *in vitro* growth and organogenesis of *Cymbidium hybridum hort.* have been studied. The optimal concentrations of Epin-Extra have been found ($10^{-4}\%$, $10^{-5}\%$) for the shoot growth and ($10^{-6}\%$) for pseudobulb propagation. Ribav-Extra and 6-benzylaminopurine stimulated the shoot growth with the maxima observed at concentrations of $10^{-4}\%$, and 1.0 and 3.0 mg/L, respectively.

Keywords: *Cymbidium hybridum hort.*, micropropagation, *in vitro*, growth, pseudobulbs, growth regulators, Ribav-Extra, Epin-Extra, 6-benzylaminopurine.