

**ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ И  
АНАТОМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КОРНЕЙ *PHRAGMIPEDIUM KOVACHII* J.T.  
ATWOOD, DALSTRÖM & RIC.FERNÁNDEZ**

**Хуссиен М.<sup>1</sup>, Молканова О. И.<sup>1</sup>, Орлова Е. Е.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН

<sup>2</sup>РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева,  
[muthab.hussien95@gmail.com](mailto:muthab.hussien95@gmail.com)

*Phragmipedium kovachii* J.T.Atwood, Dalström & Ric.Fernández является одним из самых высокодекоративных видов орхидей. Этот вид относится к наземным орхидеям, с уникальными цветками диаметром 10-20 см. В настоящее время естественная среда обитания этого таксона значительно сокращена. В связи с этим *P. kovachii* включён в Приложение I СИТЕС, которая запрещает международную коммерческую торговлю. Целью данного исследования являлась разработка эффективного протокола для размножения протокормоподобных тел (PLBs), развитие регенерантов и укоренения *P. kovachii* для его сохранения *ex situ*. Объектами данного исследования служили регенеранты высотой 1.0-1.2 см и протокормоподобные тела. Основной питательной средой для всех экспериментов была 1/2 Murashige and Skoog (1962) (MS). На этапе собственно микроразмножения использовали различные сочетания регуляторов роста 6- бензиламинопурина (6-БАП) и индолилуксусная кислота (ИУК) с добавлением 100 мл/л кокосовой воды (CW) и без нее. Затем регенераты рекультивировали на питательной среде с добавлением различных органических добавок CWи 50 г/л бананового пюре (BN) и разных цитокининов 6-БАП, кинетин (Кин), мета-тополлин (mT) в концентрации 0.5 мг/л. На стадии укоренения использовали питательную среду 1/2 MS с различными органическими добавками и ауксинами: ИУК и индолил-3-масляная кислота (ИМК) в концентрациях (0.5 и 1.0 мг/л). В качестве контроля использовали питательную среду без регуляторов роста. Срезы фиксированных корней сделаны с помощью микротомы MC-2 с подключенным замораживающим столиком ОМТ-2802 Е. Толщина срезов составляла 40-60 мкм. Для выявления лигнификации клеточных стенок корней срезы окрашивали альциановым синим и сафранином.

В результате исследования установлено, что наибольшее число адвентивных побегов ( $5.67 \pm 0.17$  шт.) получено на питательной среде с добавлением CW, 2.0 мг/л 6-БАП и 0.4 мг/л ИУК. В то же время, наибольший процент формирования PLBs (96.7%) и их количество ( $12.58 \pm 0.33$  шт.) отмечены на питательной среде, содержащей CW, 2.0 мг/л 6-БАП и 0.6 мг/л ИУК. На этапе развития регенерантов установлено, что наилучшей является питательная среда с добавлением 0.5 мг/л 6-БАП и CW. При её использовании у регенерантов зафиксированы наибольшие значения изученных признаков: длина проростков ( $1.98 \pm 0.06$  см), число листьев ( $3.50 \pm 0.14$  шт.) и число адвентивных побегов ( $5.58 \pm 0.22$  шт.). На стадии укоренения проростков максимальный процент укоренения (96%) и наибольшее число корней ( $4.33 \pm 0.19$  шт.) достигнуты на среде, содержащей BN и 0.5 мг/л ИМК. Однако наибольшая длина растения ( $5.20 \pm 0.07$  см) и наибольшая длина корня ( $4.27 \pm 0.20$  см) были получены на питательной среде с добавлением CW и 1.0 мг/л ИУК. При культивировании регенерантов на питательной среде с добавлением BN отмечено, что корни имели более развитый центральный цилиндр и содержали много крахмальных зерен в паренхимных клетках. Стела представляет собой пентархный пучок с паренхимной сердцевинкой. Однако на питательной среде, содержащей CW кортекс был толще и паренхимные клетки были крупнее. Стела является тетраархным пучком с склеренхимной сердцевинкой и большим количеством сосудов ксилемы. Полученные результаты позволяют сохранять *P. kovachii ex situ*.

Работа выполнена в рамках ГЗ ГБС РАН (№ 122042700002-6).

**Ключевые слова:** Orchidaceae, регуляторы роста, органические добавки, анатомия, корни

# IMPROVING OF CLONAL MICROPROPAGATION TECHNOLOGY AND ANATOMICAL ROOT FEATURES OF PHRAGMIPEDIUM KOVACHII J.T. ATWOOD, DALSTRÖM & RIC.FERNÁNDEZ

Hussien M. , Molkanova O. , Orlova E.

*Tsitsin Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences*  
[muthab.hussien95@gmail.com](mailto:muthab.hussien95@gmail.com)

*Phragmipedium kovachii* J.T. Atwood, Dalström & Eric. Fernandez is one of the most beautiful orchid species. This plant belongs to the group of terrestrial orchids and is characterized by its unique flowers, which have a diameter of 10-20 cm. The natural habitat of this species has been significantly diminished. Consequently, *P. kovachii* is listed in Appendix I of CITES, which prohibits international commercial trade of this plants. The aim of this study was to develop an efficient protocol for the mass propagation of protocorm-like bodies (PLBs), regeneration, and rooting of *P. kovachii* for its *ex-situ* conservation. The subjects of this study were regenerants measuring 1.0-1.2 cm and PLBs. The nutrient medium used for all experiments was half-strength Murashige and Skoog (1962) ( $\frac{1}{2}$  MS). During the multiplication stage, various combinations of the growth regulators: 6- benzylaminopurine (6-BAP) and indole-3-acetic acid (IAA), with and without the addition of 100 ml/l coconut water (CW), were tested. Subsequently, the regenerants were recultivated on a nutrient medium supplemented with various organic additives: CW and 50 g/l banana puree (BN), along with various cytokinins such as 6-BAP, kinetin (Kin), and meta-topolin (mT) at a concentration of 0.5 mg/l. At the rooting stage, a  $\frac{1}{2}$  MS nutrient medium with different organic additives and auxins, including IAA and indole-3-butyric acid (IBA) at concentrations of 0.5 and 1.0 mg/l, was used. A nutrient medium without growth regulators served as the control. Sections of the fixed roots were prepared using an MS-2 microtome with a connected freezing table OMT- 2802 E. The thickness of the sections was 40-60 microns. To identify the lignification of the cell walls in the roots, the sections were stained with Alcian blue and safranin. The results of the study showed that the largest number of adventitious shoots ( $5.67 \pm 0.17$  units) was obtained on a nutrient medium supplemented with CW, 2.0 mg/l 6-BAP, and 0.4 mg/l IAA. The highest percentage of PLB formation (96.7%) and the highest number of PLBs ( $12.58 \pm 0.33$  units) were observed on a nutrient medium containing CW, 2.0 mg/l 6-BAP, and 0.6 mg/l IAA. During the PLB regeneration stage, the best nutrient medium was  $\frac{1}{2}$  MS with 0.5 mg/l 6-BAP and CW. The highest values for seedling length ( $1.98 \pm 0.06$  cm), the number of leaves ( $3.50 \pm 0.14$  units), and the number of adventitious shoots ( $5.58 \pm 0.22$  units) were recorded on this medium. At the seedling rooting stage, the highest percentage of rooting (96%) and the largest number of roots ( $4.33 \pm 0.19$  units) were achieved on a medium containing BN and 0.5 mg/l IBA. However, the highest seedling length ( $5.20 \pm 0.07$  cm) and root length ( $4.27 \pm 0.20$  cm) were obtained on a nutrient medium supplemented with CW and 1.0 mg/l IAA. When regenerants were cultivated on a nutrient medium containing BN, the roots exhibited a more developed central cylinder and contained many starch grains in parenchymal cells. The stele had a pentarch arrangement with a parenchymal pith. In contrast, on a nutrient medium containing CW, the cortex was thicker, and the parenchymal cells were larger. The stele had a tetrarch arrangement with a sclerenchymal pith and a large number of xylem vessels. The results obtained from this study provide an effective method for the *ex-situ* conservation of *P. kovachii*.

This research was funded by assignments (№ 122042700002-6) of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

**Keywords:** Orchidaceae, growth regulators, organic additives, anatomy, roots