



УДК 582.594.2:581.14+58.035.4

## РОЛЬ СЕЛЕКТИВНОГО СВЕТА В МОРФОГЕНЕЗЕ И СОДЕРЖАНИИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ ПРОРОСТКОВ *CYMBIDIUM HYBRIDUM* НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА

Л.В. Хоцкова  
Г.Я. Степанюк  
Р.А. Карначук

Томский государственный  
университет, 634050,  
г. Томск, пр. Ленина, 36

e-mail:  
sbg\_biotech@sibmail.com

Изучали влияние света разного спектрального состава на морфогенез проростков *Cymbidium hort.* (Orchidaceae Juss.) в культуре *in vitro* на безгормональной питательной среде Мурасиге-Скуга на начальных этапах онтогенеза. Показано, что добавление длинноволнового участка спектра к белому свету являлось наиболее благоприятным для роста и развития сеянцев, т.к. формировались более крупные протокормы, листья и корни проростков. Проростки, развивающиеся на синем свете, имели наименьшие ростовые показатели стебля, листа и корня, но насыщенную изумрудно-зеленую окраску листьев, что соответствовало более высокому уровню фотосинтетических пигментов, в отличие от проростков других световых вариантов.

Ключевые слова: *Cymbidium*, семенное размножение *in vitro*, фотоморфогенез, фотосинтетические пигменты, селективный свет.

### Введение

Свет является важнейшим фактором жизнедеятельности и продуктивности зеленых растений. Интенсивность света, его спектральный состав, периодичность освещения проявляются морфогенетическими изменениями в системе целого растения. Адаптация к световому режиму затрагивает различные уровни организации автотрофного организма, конечным результатом которой может быть оптимизация всей деятельности растений [1]. Поглощение растениями лучистой энергии зависит от содержания хлорофилла. В растениях постоянно происходит как его биосинтез, так и разрушение. У высших растений образование хлорофилла происходит на свету [2]. Кроме использования света как источника энергии, фотосинтетические организмы имеют фоторегуляторные системы, которые могут использовать свет различной длины волны как регуляторные сигналы для многих метаболических процессов [3]. Свет контролирует рост и развитие растений через фотоинформационные низкоэнергетические реакции, включаемые регуляторными пигментами. Известно, что рост некоторых видов двудольных и однодольных растений при длительной адаптации к свету разного спектрального состава зависит от качества света, что особенно отчетливо проявлялось для медленно растущих видов [4].

Представители семейства *Orchidaceae* Juss. – многолетние травянистые растения, характеризующиеся медленным циклом развития. Характерными особенностями семян орхидных являются небольшие размеры (0,09 – 1,2 мм) и отсутствие эндосперма, что затрудняет их прорастание и развитие проростков [5]. Методы *in vitro* с использованием питательных сред позволяют преодолеть трудности, связанные с проращиванием семян и подращиванием сеянцев орхидных. Однако в условиях оранжерей сеянцы тропических и субтропических орхидей вступают в генеративную фазу лишь через 5 – 8 лет после прорастания семян.

В настоящее время в коллекционном фонде тропических и субтропических растений Сибирского ботанического сада Томского государственного университета (СибБС ТГУ) семейство *Orchidaceae* Juss. представлено более 80 видами из 26 родов, а также 65 гибридами. Для представителей орхидных, размножение которых традиционными способами связано с определенными трудностями, в том числе для искусственно полученных ги-



бридов, интенсивно разрабатываются методы микрклонального и семенного размножения *in vitro*.

В последнее время наше внимание привлекли высокодекоративные сорта субтропической орхидеи *Cymbidium Sw.*, имеющие эффектные прямостоячие или поникающие соцветия с многочисленными цветками, широко используемые как срезочная и горшечная культура. Благодаря высокой декоративности и продолжительности цветения, цимбидиумы являются одной из наиболее популярных цветочных культур, широко выращиваемых не только в ботанических садах, но и во многих цветоводческих хозяйствах России и других стран [6, 7].

В связи с этим целью наших исследований являлось изучение влияния света разного спектрального состава на ускорение прорастания семян, рост и развитие проростков, а также содержание фотосинтетических пигментов в развитых листьях сеянцев *Cymbidium hybridum* на начальных этапах онтогенеза.

### Объект и методы исследования

По итогам фенологических наблюдений *Cymbidium hybridum*, культивируемый в оранжереях СибБС с 1993 года, относится к зимнецветущим растениям. Начало цветения приходится на вторую декаду ноября. Продолжительность цветения одного соцветия составляет 40 – 50 дней. Среднее количество цветков в соцветии равняется 18.

В целях массового получения сортов цимбидиума гибридного отработана методика их семенного размножения *in vitro*. В работе использовали семена *C. hybridum*, полученные в результате искусственного опыления цветков сортовых цимбидиумов *Cymbidium Showgirl* и *Cymbidium Lilian Stewart*. Окраска околоцветника *C. Lilian Stewart* светло-зеленоватая, губа белая с широкой бордовой полосой из сливающихся пятен. Цветки крупные, диаметром  $10,2 \pm 0,6$  см. Околоцветник *C. Showgirl* светло-кремового цвета, на белой губе бордовые бархатистые пятнышки. Цветки этого сорта достигают в диаметре  $5,5 \pm 0,5$  см. Продолжительность созревания плодов цимбидиума гибридного после искусственного опыления в оранжереях сада составляет от 200 до 350 дней в зависимости от сорта.

Плоды-коробочки снимали слегка пожелтевшими, протирали 96% этанолом в условиях ламинар-бокса, обжигали над пламенем горелки, вскрывали стерильным скальпелем и производили посев семян на поверхность агаризованной питательной среды Мурасиге-Скуга [8] без добавления фитогормонов в стерильные колбы, которые закрывали крышечками из фольги. Известно, что каждая из трех основных областей фотосинтетически активной радиации (ФАР) (синяя, зеленая, красная), взятая в отдельности, малопригодна для культивирования растений в закрытом грунте [9]. Поэтому в нашем эксперименте проращивание семян и последующее культивирование проростков проводили при освещении белым светом (БС, контроль) или сочетанием белого света с красным (КС,  $\lambda_{\max}=670$  нм), синим (СС,  $\lambda_{\max}=430$  нм) или зеленым (ЗС,  $\lambda_{\max}=550$  нм). В качестве источников света использовали люминесцентные лампы (PHILIPS, 18W G13: TLD 18/33-640 White, TLD 18/15 Red, TLD 18/17 Green, TLD 18/18 Blue). Свет был выровнен по интенсивности на уровне культуры протокормов и составил  $9,7$  Вт/м<sup>2</sup>. Культуры содержались при 16-часовом фотопериоде, температуре  $23 \pm 2$  °С и относительной влажности воздуха 65%. Световые варианты были разделены непроницаемыми ширмами. После прорастания семян пересадка протокормов в свежую питательную среду осуществлялась каждые три месяца.

Содержание фотосинтетических пигментов исследовали в листьях 485-дневных проростков *Cymbidium Showgirl* × *Lilian Stewart*, имеющих по 4-6 развитых листа и 1-2 корня, готовых к пересадке из условий *in vitro* в промежуточный субстрат (Табл. 1, 2). У исследуемых проростков измеряли ростовые показатели: длину и ширину осевых и метамерных органов, число листьев и корней. В качестве модели для вычисления площади листьев использовали формулу площади эллипса:  $S = \pi * L / 2 * D / 2$ , где L – длина листа, D – ширина листа. Суммарную площадь листьев целого растения (СПЛР) получили путем сложения площадей всех листьев одного проростка.

Определение содержания пигментов в 1г сырой массы листьев проводили спектрофотометрическим методом [10]. Для исследования использовали 4-5-й настоящие листья проростков. Навеска растительного материала бралась из листьев нескольких проростков и составляла 0,03 г.

Извлечение пигментов из растительной ткани проводили 100% ацетоном. Для предотвращения выцветания, изомеризации, феофитинизации пигментов и нейтрализации кислот клеточного сока их экстракцию проводили в затемненном помещении с предварительно охлажденным растворителем, добавляя при растирании листьев небольшое количество кварцевого песка и  $\text{CaCO}_3$ . Полученный гомогенат количественно переносили из ступки в центрифужные пробирки, уравнивали и центрифугировали при скорости 8000 об./мин. в течение 5 мин. Супернатант доводили тем же растворителем до нужного объема (5 – 8 мл). Полученный экстракт исследовали на спектрофотометре СФ-26 в 1 см кювете. В качестве контроля использовали 100% ацетон. Оптическую плотность экстрактов измеряли при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения хлорофиллов *a* и *b*, соответственно 662 и 644 нм (красный светофильтр). Для определения каротиноидов вытяжку промеряли при длине волны 440,5 нм (фиолетовый светофильтр). Определение мутности экстракта проводили при 720 нм (красный светофильтр). Концентрацию хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов рассчитывали по формулам Хольма для 100% ацетона [11], при этом из величин экстинций растворов каждого пигмента вычитали величину экстинции при 720 нм. Таким образом, с учетом конечного объема вытяжки и навески растительного материала получили данные по содержанию пигментов на единицу сырого веса листьев.

Каждый вариант был выполнен в двух биологических и двух аналитических повторностях. Полученные данные были обработаны статистически с помощью программного пакета MS Excel.

### Результаты и их обсуждение

Первые визуальные признаки прорастания семян *Cymbidium Showgirl* × *Lilian Stewart* в виде крошечных сферических тел (диаметром до 1,0 мм) были обнаружены одновременно на всех вариантах через 30 дней от посева. Проросшие семена составляли 40 – 60 % от общего количества посеянных семян в каждом варианте. Образовавшиеся в течение последующего месяца протокормы имели беловатую окраску, шаровидную форму и, вне зависимости от того, каким образом располагались семена на поверхности питательной среды, были ориентированы базальной частью вниз, на которой визуализировалось кольцо ризоидов.

Через 60 дней от прорастания наибольший эффект на позеленение протокормов (примерно по 50% от общего количества проросших семян на одном варианте) было выявлено на КС и СС. Отмечено, что проростки, растущие на свету с добавлением длинноволнового участка спектра, имели более крупные протокормы и быстрее формировали осевые структуры. Вероятно, активный рост проростков цимбидиума на КС может быть связан с синтезом гиббереллинов, которые стимулируют развитие осевых органов растений [12]. Протокормы цимбидиума, развивающиеся на СС, имели «булавовидную» форму и насыщенную изумрудно-зеленую окраску в отличие от протокормов других световых вариантов. Более темная окраска этих протокормов, возможно, связана с усиленным синтезом цитокининов на синем свету и стимулированием развития хлорофилла [12]. Протокормы, растущие на ЗС, также имели более вытянутую форму, как протокормы на СС, но их окраска при этом варьировала от беловатой до желтовато-зеленой, а апексы были слабо развиты. В контроле на БС протокормы имели шаровидную форму, слегка сжатую в дорзо-вентральном направлении. Их окраска, аналогично окраске протокормов на ЗС, варьировала от бело-желтоватой до слабо-зеленой. По степени развития протокормы на белом свету приближались к протокормам на СС: у них также наблюдалось развитие апексов (рис. 1).

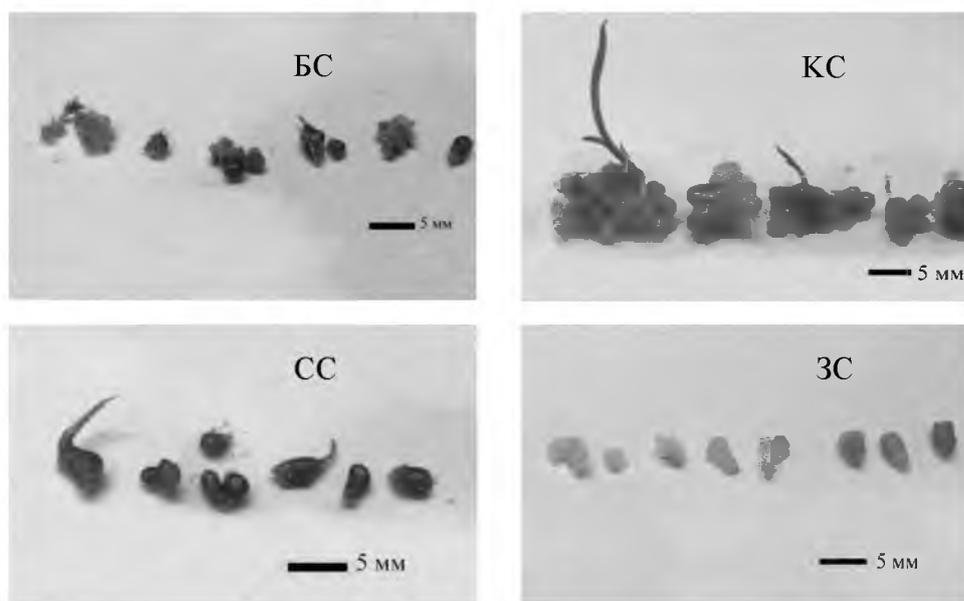


Рис. 1. Проростки *Cymbidium Showgirl*×*Lilian Stewart* в возрасте 60 дней на селективном свете: BC – белый свет, KC – красный свет, CC – синий свет, ЗС – зеленый свет

Известно, что у многих растений, выращиваемых при одинаковых интенсивностях света, общая длина стебля, длина междуузлий и листьев увеличивается с увеличением длины волны света. Кроме этого, красный свет способствует увеличению площади, длины и массы листьев растений, но с тонкой листовой пластинкой, тогда как на синем свете формируются толстые листья с меньшей площадью. Синий свет также ингибирует элонгацию стебля [1, 13, 14]. В нашем эксперименте рост осевых и метамерных органов, а также масса 485-дневных проростков *Cymbidium Showgirl*×*Lilian Stewart* в условиях *in vitro* на синем, зеленом и красном свете увеличивались по мере увеличения длины волны (рис. 2 – 4; табл. 1, 2), что согласуется с литературными данными.

Таблица 1

**Ростовые параметры стебля, корня и сырая масса проростков *Cymbidium Showgirl*×*Lilian Stewart* на белом и селективном свете на безгормональной среде МС в возрасте 485 дней**

Свет	Длина стебля, мм	Ширина стебля, мм	Число корней, шт.	Длина корней, мм	Ширина корней, мм	Сырая масса растения, г
BC	11,75±1,58	1,88±0,07	1,58±0,08	7,63±1,38	1,54±0,05	0,11±0,002
CC	11,50±0,56	2,03±0,16	1,45±0,07	7,64±1,68	1,44±0,03	0,15±0,002
ЗС	<b>19,92±1,90</b>	1,96±0,13	1,73±0,02	14,11±1,97	2,00±0,09	0,20±0,005
KC	13,25±0,66	2,38±0,11	<b>1,88±0,06</b>	<b>22,33±2,56</b>	1,62±0,06	<b>0,22±0,004</b>

Однако длина стебля проростков на ЗС превышала длину стебля на KC в 1,5 раза за счет увеличенных междуузлий побегов. Несмотря на то, что *Cymbidium Sw.* относится к орхидным с симподиальным ростом, молодые побеги на начальных этапах онтогенеза нарастают моноподиально, поэтому мы наблюдали удлинение междуузлий на ЗС. Проростки на CC имели наименьшие ростовые параметры стебля, листа и корня, практически не отличались от контроля на BC.

В табл.е 3 и на рис. 5 и 6 представлены данные по содержанию хлорофилла и каротиноидов в наиболее развитых 4-5-х листьях исследуемых проростков цимбидиума под белым (контроль) и селективным светом при выращивании на безгормональной среде МС. Отмечено, что содержание хлорофилла *a* и каротиноидов было



выше на СС, по сравнению с КС и ЗС (рис. 5). Кроме того, на СС содержание хлорофилла *a* преобладало над содержанием хлорофилла *b* в 4,5 раза (рис. 6) и являлось наибольшим, по сравнению с соотношением хлорофиллов на КС, ЗС и в контроле. Однако по соотношению зеленых и желтых пигментов на селективном свете различий практически не было (рис. 6). Суммарное количество хлорофиллов преобладало над содержанием каротиноидов в среднем в 1,63±0,06 раза на всех вариантах. Несмотря на то, что на КС были увеличены ростовые параметры листьев и корней проростков, содержание фотосинтетических пигментов в 4-5-х листьях было наименьшим, по сравнению с другими световыми условиями (табл. 1 – 3).

Таблица 2

**Ростовые параметры листа проростков *Cymbidium Showgirl*×*Lilian Stewart* на белом и селективном свете на безгормональной среде МС в возрасте 485 дн.**

Свет	Число листьев, шт.	Длина листьев, мм	Ширина листьев, мм	Площадь листьев, мм <sup>2</sup>	Суммарная площадь листьев растения, мм <sup>2</sup>	Отношение длины листа к ширине листа
БС	5,17±0,26	27,11±3,08	1,77±0,39	41,07±4,63	212,19±10,28	15,03±3,27
СС	5,25±0,56	26,46±2,58	1,92±0,29	43,39±3,84	227,80±11,21	13,36±1,12
ЗС	5,83±1,11	29,00±3,26	2,01±0,34	49,47±3,47	288,57±12,52	14,01±1,65
КС	<b>6,00±1,27</b>	<b>33,15±4,12</b>	<b>2,08±0,44</b>	<b>61,95±5,91</b>	<b>371,67±14,46</b>	14,62±2,88

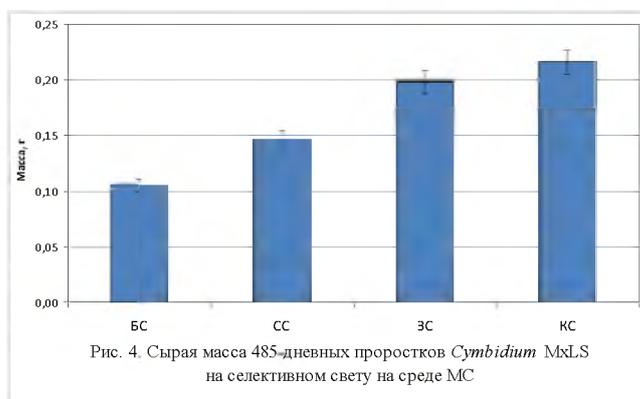
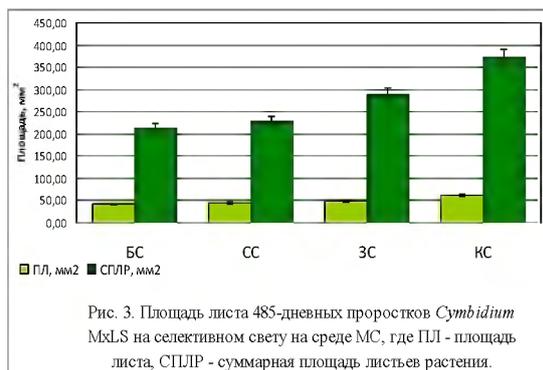
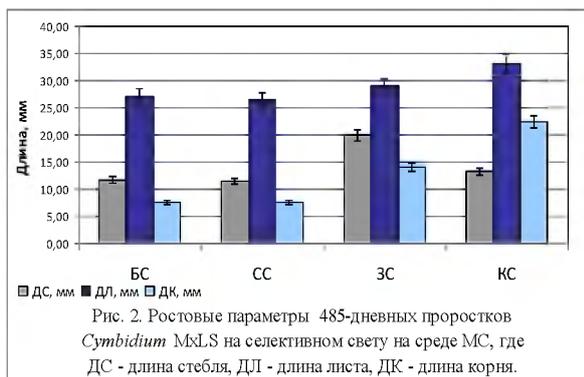
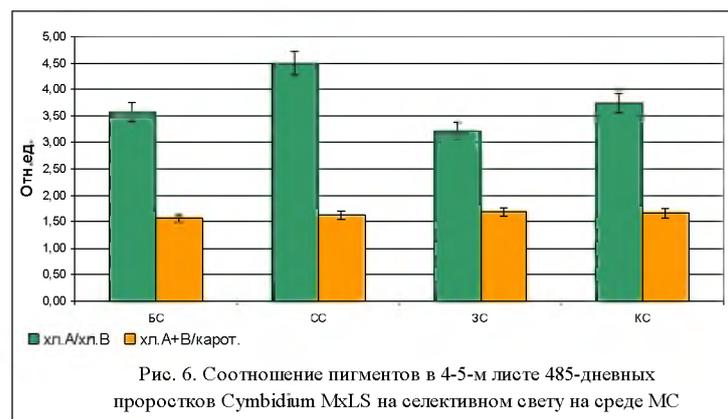
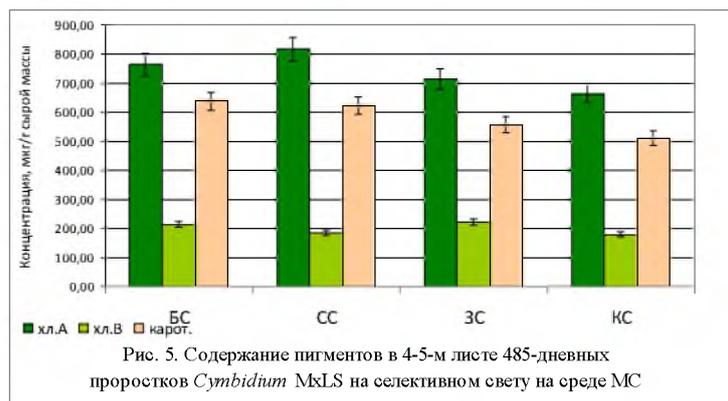




Таблица 3

**Содержание фотосинтетических пигментов в 4-5 листьях проростков *Cymbidium Showgirl*×*Lilian Stewart* на белом и селективном свету на безгормональной среде МС в возрасте 485 дней (мкг/г сырой массы)**

Свет	хл.А	хл.В	карот.	хл.А+хл.В	хл.А/хл.В	хл.А+В/карот.
БС	764,7±23,4	214,5±10,7	637,7±31,8	979,2±48,9	3,58±0,18	1,56±0,05
СС	816,2±40,8	184,3±9,2	622,5±30,6	1000,5±50,1	4,50±0,22	1,62±0,08
ЗС	712,7±35,6	222,5±11,1	557,6±27,9	935,3±49,9	3,21±0,16	1,69±0,08
КС	665,3±33,2	179,6±9,1	510,3±25,4	844,9±42,2	3,74±0,19	1,66±0,07



### Заключение

Таким образом, при выращивании *Cymbidium Showgirl*×*Lilian Stewart* в культуре *in vitro* на безгормональной питательной среде Мурасиге–Скуга на селективном свету было обнаружено, что добавление длинноволнового участка спектра к белому свету являлось наиболее благоприятным для роста и развития сеянцев на начальных этапах онтогенеза, т.к. на этом участке спектра формировались более крупные протокормы и, в дальнейшем, листья и корни проростков. Однако длина стебля проростков на зеленом свету превышала длину стебля на красном свету в 1,5 раза за счет увеличенных междоузлий побегов.

Несмотря на то, что на КС были увеличены ростовые параметры листьев и корней проростков, содержание фотосинтетических пигментов в 4-5-х листьях было наименьшим, по сравнению с другими световыми условиями

Протокормы, развивающиеся на синем свету, имели «булавовидную» форму и насыщенную изумрудно-зеленую окраску, которая отмечалась и у листьев проростков, что соответствовало более высокому уровню фотосинтетических пигментов, в отличие от протокормов других световых вариантов. Кроме того, на СС содержание



хлорофилла *a* преобладало над содержанием хлорофилла *b* в 4,5 раза. Однако ростовые параметры стебля, листа и корня проростков на СС были наименьшими, по сравнению с КС, ЗС и контролем.

### Список литературы

1. Карначук Р.А., Протасова Н.Н., Добровольский М.В., Ревина Т.А., Ничипорович А.А. Физиологическая адаптация листа левзеи к спектральному составу света // Физиология растений. – 1987. – Т. 34, № 1. – С. 51 – 59.
2. Велит И.А., Бондарь П.И., Сахно Т.В., Кожушко Г.М. Влияние спектрального состава света на содержание пигментов в листьях томата // Физиология и биохимия культурных растений. – 2004. – Т.36, №4. – С.349 – 355.
3. Воскресенская Н.П. Принципы фоторегулирования метаболизма растений и регуляторное действие красного и синего света // Фоторегуляция метаболизма и морфогенеза растений / Под ред. Курсанова А.Л. и др. – М.: Наука, 1975. – С. 16-36.
4. Карначук Р.А. Регуляторное влияние зеленого света на рост и фотосинтез листьев // Физиология растений. – 1987. – Т. 34, № 4. – С. 765 – 773.
5. Черевченко Т. М., Кушнир Г. П. Орхидеи в культуре. – Киев: Наукова думка, 1986. – 200с.
6. Герасимов С.О., Журавлев И.М. Орхидеи. – М.: Росагропромиздат, 1988. – 208 с.
7. L.V. Tuong Huan, T. Takamura, M. Tanaka Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid // Plant Science. – 2004. – V. 166. – P. 1443–1449.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473 – 497.
9. Прикупец Л.Б., Тихомиров А.А. Оптимизация спектра излучения при выращивании овощей в условиях интенсивной светокультуры // Светотехника. – 1992. – № 3. – С. 5.
10. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971.
11. Головацкая И.Ф., Карначук Р.А. Свет и растение. – Томск: Изд-во Томского университета, 1999. – 100с.
12. Карначук Р.А., Головацкая И.Ф. Гормональный статус, рост и формирование растений, выращенных на свету разного спектрального состава // Физиология растений. – 1998. – Т. 45, № 6. – С. 925 – 934.
13. Немойкина А.Л., Карначук Р.А. Совместное действие света разного спектрального состава и экзогенных гормонов на мезоструктуру *Yucca elephantipes* R. в культуре *in vitro* // Электронный журнал «Исследовано в России». 2002. – С. 1930 – 1937. Режим доступа: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2002/174.pdf>
14. Maigull Appelgren Effects of light quality on stem elongation of *Pelargonium* *in vitro* // Scientia Horticulturae. – 1991. –V. 45, Is. 3-4. – P. 345-351.

## A ROLE OF SELECTIVE LIGHT IN MORPHOGENESIS AND PHOTOSYNTNETIC PIGMENTS LEVELS OF *CYMBIDIUM HYBRIDUM* SEEDLINGS AT THE INITIAL STAGES OF ONTOGENESIS

**L.V. KHOTSKOVA**  
**G.J. STEPANJUK**  
**R.A. KARNACHUK**

Tomsk State University, Lenina  
avenue, 36, Tomsk, 634050,  
Russia

e-mail:  
[sbg\\_biotech@sibmail.com](mailto:sbg_biotech@sibmail.com)

The influence of light quality on morphogenesis of *in vitro* seed-grown *Cymbidium* hort. (Orchidaceae Juss.) plants on nutrient MC medium without phytohormons at the initial stages of ontogenesis was investigated. Addition of long-wave spectrum to white light was the best for growth and development of the plantlets. Growth parameters like leaf and root length, leaf area and fresh mass whole plantlet were highest with plants grown under red light. Seedlings grown under blue light had most less growth parameters of shoot, leaf and root. However, emerald-green color of leaves of these plants was related with more high levels of leaf pigments (chlorophylls and carotenoids) compared to red or green light or white cool fluorescent light treatments. This study suggests that the production of quality *Cymbidium* hort. plants is possible by culturing the plants *in vitro* under white light with blue or red light sources.

Key words: *Cymbidium*, seed propagation *in vitro*, photomorphogenesis, photosynthetic leaf pigments, light quality.