

НЕМОЙКИНА АННА ЛЕОНИДОВНА

**ВЛИЯНИЕ СВЕТА И ГОРМОНОВ НА МОРФОГЕНЕЗ ЮККИ СЛОНОВОЙ В КУЛЬТУРЕ IN
VITRO**

03.00.05 – ботаника

03.00.12 – физиология и биохимия растений

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Работа выполнена на кафедре физиологии растений и биотехнологии Томского государственного университета

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Карначук Раиса Александровна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Олонова Марина Владимировна

кандидат биологических наук, доцент Гвоздева Елена Станиславовна

Ведущая организация:

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,
г. Новосибирск

Защита состоится “___” _____ 2003 г. на заседании диссертационного совета Д 212.267.09 при Томском государственном университете по адресу: 634050, Томск, пр. Ленина, 36.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Томского государственного университета

Автореферат разослан “___” _____ 2003 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

С.П. Кулижский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Известно, что свет разного спектрального состава изменяет гормональный баланс растений (Dörfler, Göring, 1978; Köhler et al., 1980; Baraldi, 1988; Cooke, Saunders, 1975; Cooke, Kendrick, 1976; Холодарь, Чекуров, 1989; Карначук и др., 1990). Наблюдаемые морфологические эффекты, возникающие в растениях под влиянием света разного качества, позволяют провести аналогию с действием гормонов, а добавление экзогенных гормонов способно вызывать многочисленные реакции, которые запускаются фоторецепторами (Кулаева, 1967; Воскресенская и др., 1968; Moore, 1979; Протасова, Кефели, 1982; Константинова и др., 1987; Kieber et al., 1993; Noe et al., 1998). Такое взаимодействие света и гормонов поднимает вопрос о том, действуют ли они независимо или гормоны вовлечены в управление фотоморфогенезом (Su, Howwell, 1995; Chinatkins et al., 1996; Гвоздева, 1997). Выяснение механизмов влияния света, гормонов и их взаимного влияния в регуляции морфогенетических процессов относится к одному из актуальных вопросов биологии развития.

Экзогенные гормоны проявляют свое влияние через изменение баланса эндогенных фитогормонов (Weaver, 1972; Wegler, 1977). При клонировании растений приходится оптимизировать среду культивирования по гормональному составу, что позволяет уменьшить затраты при размножении *in vitro*.

Культура *in vitro* является удобной моделью для изучения фоторегуляторных реакций и совместного действия света и экзогенных регуляторов роста. Совместное влияние света и гормонов на растения в культуре *in vitro* освещено в работах некоторых авторов (Константинова и др., 1987; Бутенко, Катаева, 1990; Геринг и др., 1986; Pinker et al., 1986). Однако данные о влиянии этих факторов на образование пазушных побегов *in vitro* немногочисленны и противоречивы.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы являлось выяснение влияния света разного спектрального состава и экзогенных гормонов на морфогенез и гормональный баланс юкки слоновой в культуре *in vitro*.

Для достижения цели были определены следующие задачи:

1. Изучить особенности действия экзогенных гормонов и света разного спектрального состава на морфогенез юкки слоновой в культуре *in vitro*.
2. Описать изменения мезоструктуры листа и количества фотосинтетических пигментов юкки слоновой в культуре *in vitro* при действии света разного спектрального состава и экзогенных гормонов.
3. Исследовать влияние качества света на баланс эндогенных гормонов листьев юкки слоновой, выращенной в культуре *in vitro*.

Научная новизна. Полученные экспериментальные данные вносят вклад в развитие представлений о регуляции морфогенетических процессов светом и гормонами в культуре *in vitro*. Свет разного спектрального состава изменяет баланс эндогенных гормонов, что позволяет изменить реакцию растения на экзогенные гормоны. Определены оптимальные условия микроразмножения юкки слоновой.

Красный свет при кратковременном культивировании побегов юкки слоновой способствует быстрому укоренению растений, что сопряжено с изменением баланса эндогенных гормонов – повышением содержания индолилуксусной кислоты и гиббереллинов. При длительном культивировании на красном свете показан высокий уровень абсцизовой кислоты. Синий свет тормозит рост листьев и корней юкки слоновой в культуре *in vitro* в длину, что сопряжено с изменением баланса эндогенных гормонов – снижением уровня гиббереллинов, повышением цитокининов и абсцизовой кислоты.

Также к новым результатам можно отнести аналогичные изменения мезоструктуры листа, роста листьев и корней юкки слоновой в культуре *in vitro* при действии синего света и бензиламинопурина, а также красного света и нафтилуксусной кислоты. Однако, сходство данных факторов отсутствует при исследовании содержания фотосинтетических пигментов.

Практическая значимость. Показано, что при освещении светом разного спектрального состава возможно уменьшение концентраций гормонов или их полное исключение из среды культивирования, что позволяет сделать среду культивирования более дешевой. На основе результатов, полученных в данной работе, можно рекомендовать использование белых и синих люминесцентных ламп на этапе микроразмножения юкки слоновой для активации пазушных меристем, а также белых и красных – при укоренении *in vitro*.

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. Свет разного спектрального состава изменяет баланс эндогенных гормонов, что позволяет изменить ответ растения на экзогенные гормоны.
2. Существует сходство действия синего света и экзогенных цитокининов, а также красного света и ауксинов на мезоструктуру, рост листьев и корней юкки слоновой в культуре *in vitro*.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на XXXIX и XL Международной студенческой научной конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2001-2002); I и II Международной научной конференции молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной

биологии и биотехнологии» (Алматы, Казахстан, 2001-2002); IV Международной конференции "Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях» (Москва, 2001), 17-ом Международном конгрессе ростовых веществ растений (Брно, Чехия, 2001); Молодежной конференции «Исследования молодых ботаников Сибири» (Новосибирск, 2001); II и III Международной конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы современной науки» (Самара, 2001-2002); Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «IV Сибирская школа молодого ученого» (Томск, 2001); 6-й Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века» (Пущино, 2002); Международной конференции «Современные проблемы интродукции растений и сохранение биоразнообразия экосистем» (Черновцы, Украина, 2002).

Публикации. По теме работы было опубликовано 2 статьи и 13 тезисов.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 133 страницах, содержит 41 рисунок и 15 таблиц. Работа состоит из введения, пяти глав (обзора литературы, описания объекта и методов исследования, результатов экспериментов), заключения, выводов и списка использованной литературы (103 работы на русском языке, 130 – на иностранных языках).

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Состоит из трех разделов, в которых представлены сведения о регуляции морфогенеза растений светом и гормонами. Описаны противоречивые данные о влиянии света разного спектрального состава на морфогенез и гормональный баланс эндогенных гормонов растений в культуре *in vitro*, и показана актуальность дальнейших исследований. Охарактеризованы свойства эндогенных фитогормонов, и показана целесообразность использования экзогенных гормонов в биотехнологии растений. На примере немногочисленных работ рассмотрено совместное влияние света и гормонов на растения в культуре *in vitro*.

2. ОБЪЕКТ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Юкка слоновая - *Yucca elephantipes Regel* (семейство Агавовые - *Agavaceae*) – декоративное растение, перспективная культура промышленного цветоводства. На основе стероидного гликозида – олигофуранозоида, получаемого из экстрактов листьев и культуры клеток юкки, производят медицинские препараты для лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Оптимизация среды культивирования юкки слоновой *in vitro* Размножение микрочеренков, образовавшихся в результате активации пазушных почек, проводили в процессе пассирования их на питательные среды с макро- и микроэлементами по Мурасиге и Скугу (MS) (Murashige, Skoog, 1962), мезоинозит – 100 мг/л, сахара – 3 %, агар – 1 %, тиамин – 1 мг/л, никотиновая кислота – 1 мг/л, пиридоксин – 0,5 мг/л.

Для определения оптимальной среды культивирования было проведено четыре серии опытов: контроль (среда MS без внесения гормонов), внесение цитокининов (6-бензиламинопуридин – БАП, 6-фурфуриламинопуридин – кинетин), внесение ауксинов (3-индолилуксусная кислота – ИУК, α -нафтилуксусная кислота – НУК, 2,4-дихлорфеноуксусная кислота – 2,4 Д), внесение комбинации цитокинин / ауксин.

Определение оптимального режима освещения. В эксперименте использовали растения-регенеранты высотой 2 см с 3 листьями. Растения культивировали на среде MS без гормонов в течение 30 суток под белым (БС), красным (КС), белым светом с красной подсветкой (БС+КС), синим светом (СС) и белым светом с синей подсветкой (БС+СС). Для всех ламп плотность потока квантов равнялась 30 $\mu\text{моль}/\text{м}^2\cdot\text{с}$. При этом интенсивность для белых ламп составляла 7,1 Вт/м², для красных ламп – 5,3 Вт/м², для синих ламп – 7,4 Вт/м². Период освещения был равен 16 часам, температура – 26°C.

Постановка эксперимента при совместном действии света и экзогенных гормонов. На этапе микроразмножения рассмотрены варианты на белом свету в сочетании с синим: БС+СС+1 мг/л БАП+0,1 мг/л НУК, БС+СС+0,5 мг/л БАП+0,1 мг/л НУК, БС+СС+0,25 мг/л БАП+0,1 мг/л НУК, БС+СС+0,1 мг/л БАП+0,05 мг/л НУК. На этапе укоренения рассмотрены варианты на белом свету в сочетании с красным: КС+0,5 мг/л НУК, КС+0,25 мг/л НУК, КС+0,1 мг/л НУК.

После 30 суток культивирования измеряли морфологические параметры, такие как высота растения, количество листьев и их площадь, количество дочерних побегов при микроразмножении, длина и количество корней, скорость укоренения, масса растения. Так же определяли объем клеток, число клеток на единицу площади, толщину мезофилла и листа, число хлоропластов на клетку, объем хлоропласта. Кроме того, оценивали содержание фотосинтетических пигментов на единицу площади листа спектрофотометрическим методом (Шлык, 1971).

Выделение эндогенных гормонов проводили одновременно из 1 г навески сырого растительного материала. Выделение свободных и связанных индолилуксусной (ИУК) и абсцизовой кислоты (АБК) проводили по методу (Кефели, Турецкая, 1966), свободных цитокининов – по методу (Негрецкий, 1988),

свободных и связанных гиббереллинов (ГК) – по методу (Ложникова и др., 1973). Идентификацию гормонов осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии, используя стандартные метчики гормонов. Учитывая, что ГК₁, ГК₃, а также ГК₄, ГК₇ не разделяются и элюируются в виде общих зон (Обут и др., 1983), анализировали их смеси, которые соответственно обозначали как ГК_{1,3} и ГК_{4,7}. Количественное определение гормонов проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Содержание цитокининов, ИУК, АБК определяли по методу (Кудоярова и др., 1989), ГК – по методу (Холодарь и др., 1995).

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с помощью специализированного пакета “Origin 5.0”. В таблицах приведены данные в виде средних арифметических со стандартной ошибкой, на рисунках – в виде средних арифметических с двухсторонним доверительным интервалом (P=0,95).

3. СВЕТ И ГОРМОНЫ – РЕГУЛЯТОРЫ МОРФОГЕНЕЗА ЮККИ СЛОНОВОЙ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Основную роль при подборе оптимальных условий культивирования растений *in vitro* играют соотношение и концентрация цитокининов и ауксинов в среде культивирования. Результаты опытов показали, что кинетин до 2 мг/л не снимал апикального доминирования побегов юкки слоновой, а более высокие концентрации вызывали образование аномальных листьев. Наиболее эффективным цитокинином являлся БАП.

Вторая серия опытов была направлена на выявление наиболее эффективного ауксина. Гормоны этого класса способны стимулировать развитие корневой системы. Побеги переносили на среды с различными концентрациями ИУК, НУК и 2,4 Д (0,1мг/л, 0,5мг/л, 1 мг/л) и на среду без гормонов. Наиболее активным и экономичным ауксином являлась НУК. Это связано с большей стабильностью синтетических регуляторов в клетке, обусловленной меньшим сродством их к ферментам дезактивации гормона (Шевелуха, 1995). Другой аналог ауксина – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) – даже при незначительных концентрациях вызывал образование каллуса у основания побегов, развитие которого нежелательно.

Известно, что растения характеризуются более высокой регенерационной способностью при культивировании на среде со смесью цитокининов и ауксинов по сравнению с использованием одного цитокинина (Дмитриева, 1981; Высоцкий, Упадышев, 1992; Tao et al., 1998; Thimmarajah, 1999). Поэтому для повышения регенерационной способности юкки слоновой было изучено соотношение БАП и НУК в разных концентрациях. Оптимальной из всех изученных оказалась среда с 1,5 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК. На этой среде наблюдалось наибольшее количество боковых побегов, их высота и масса (Табл. 1).

Таблица 1 – Ростовые характеристики дочерних побегов юкки слоновой, сформированных на этапе микроразмножения с экзогенными гормонами в среде культивирования

Соотношения гормонов	Число дочерних побегов, шт.	Высота дочерних побегов, мм	Сырая масса дочернего побега, мг
1 мг/л БАП+ 0,1 мг/л НУК	2,00±0,13	20,44±2,03	261,34±15,21
1 мг/л БАП+ 0,06 мг/л НУК	2,00±0,12	24,59±2,11	310,00±23,11
1,5 мг/л БАП+ 0,15 мг/л НУК	4,00±0,11	17,83±1,56	210,52±16,38
1,5 мг/л БАП+ 0,1 мг/л НУК	4,00±0,14	30,21±2,45	375,34±23,87
2 мг/л БАП+ 0,2 мг/л НУК	4,00±0,10	10,57±1,20	150,34±12,50
2 мг/л БАП+ 0,1 мг/л НУК	4,00±0,12	11,24±1,00	154,58±13,28

БАП – бензиламинопурин, НУК – нафтилуксусная кислота

Таким образом, на оптимальной среде для микроразмножения образуется в 4 раза больше побегов, чем на безгормональной среде. Применение 0,5 мг/л НУК способствовало сокращению этапа укоренения *in vitro* на 2 недели.

Свет разного спектрального состава вызывал заметные изменения в росте и развитии юкки слоновой в культуре *in vitro*. Красный свет (КС) инициировал быстрое укоренение и наибольшее количество корней. После 15 суток культивирования на КС высота побега оставалась постоянной (Рис. 1).

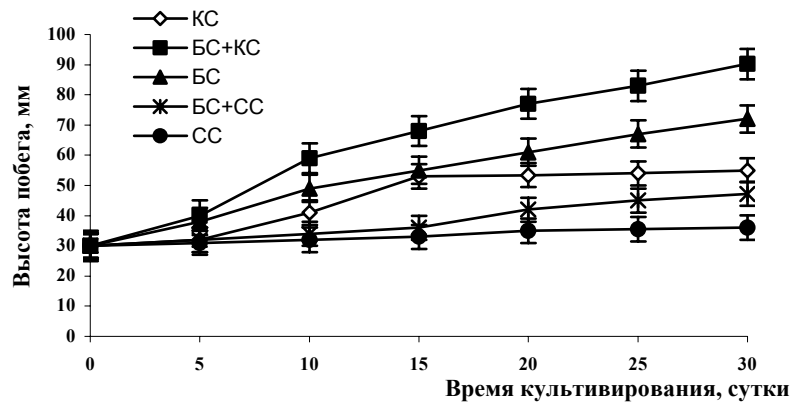


Рисунок 1 - Изменение высоты побега юкки слоновой в зависимости от времени культивирования *in vitro* на свету разного спектрального состава

Многие физиологические ответные реакции растений регулируются синим светом (Воскресенская и др., 1990; Карначук и др., 1987). Синий свет тормозит рост листьев и корней юкки слоновой в культуре *in vitro* в длину. На этапе микроразмножения главной целью является снятие апикального доминирования, что вызывает активацию пазушных меристем. Сопоставив полученные данные наших опытов по всем вариантам освещения можно сделать вывод, что качество света не влияет на образование пазушных побегов юкки слоновой в культуре *in vitro*. Вероятно, на СС и БС+СС не достигался уровень цитокининов, достаточный для снятия апикального доминирования. Однако имеются литературные данные о том, что СС в отличие от КС или темноты увеличивал содержание цитокининов в тканях растений, и таким образом активировал пазушное размножение побега (Köhler et al., 1980; Baraldi, 1988).

Для формирования надземной части растений юкки слоновой оптимальным вариантом освещением оказался БС+КС, так как при этом все ростовые показатели были наибольшими (Табл. 2).

Таблица 2 – Ростовые параметры растений юкки слоновой, культивируемых *in vitro* на свету разного спектрального состава

Варианты освещения	Прирост побега, мм	Количество новых листьев, шт.	Количество корней, шт.	Длина корней, см
СС	6,12±1,44	3,00±0,10	—	—
БС+СС	17,06±2,22	3,00±0,11	2,00±0,10	7,12±1,54
БС	41,54±2,46	5,00±0,14	3,00±0,12	12,00±2,21
БС+КС	60,13±1,02	4,00±0,10	4,00±0,11	20,00±2,11
КС	25,37±2,11	2,00±0,11	6,00±0,11	18,00±2,08

Все больше обращается внимание на возможность существования взаимного действия света и гормонов в регуляции различных процессов (Köhler, 1985; Константинова и др., 1987). Физиологическая активность большинства экзогенных регуляторов обусловлена их способностью влиять на компоненты гормональной системы растений. Свет разного спектрального состава также способен изменять естественный гормональный баланс растений (Baraldi, 1988; Кефели, 1987; Гвоздева, 1997; Vedenicheva et al., 1998; Карначук и др., 2001).

При преобладании синих лучей в спектре наблюдали увеличение эффекта экзогенного цитокинина, который был добавлен в среду культивирования. При содержании гормона 1,5-0,5 мг/л в варианте с СС прослеживалось угнетение роста растений, подобный тому, если бы в среду были добавлены большие концентрации цитокинина. При этом прирост побега был минимальным, и формировалось по 2 аномальных дочерних побега, высота которых не превышала 17 мм (Табл.3).

Результаты опытов показали, что растения в вариантах БС+1,5 мг/л БАП+0,1 мг/л НУК и БС+СС+0,25 мг/л БАП+0,1 мг/л НУК имели по 4 новообразованных побега высотой 30 мм.

Таким образом, увеличение доли синего спектра в освещении микрочеренков юкки способствовало возможности снижения концентрации БАП в среде культивирования в несколько раз без снижения ростовых параметров.

Таблица 3 – Ростовые параметры растений юкки слоновой на этапе микроразмножения *in vitro*, выращенных на свету разного спектрального состава с экзогенными гормонами в среде

Варианты	Высота побега, через 30сут., мм	Количество корней	Длина корней, мм	Число новых побегов,	Высота новых побегов, мм	Площадь листа, см ²

		шт.		шт		
БС+ 1,5 мг/л БАП+ 0,1 мг/л НУК	43,32±2,21	—	—	4,00±0,10	30,21±1,21	2,33±0,11
БС+СС+ 1 мг/л БАП+ 0,1 мг/л НУК	32,68±1,02	—	—	2,00±0,10	10,35±1,57	2,32±0,21
БС+СС+ 0,5 мг/л БАП+ 0,1 мг/л НУК	33,95±1,54	—	—	2,00±0,10	17,11±1,34	2,41±0,18
БС+СС+ 0,25 мг/л БАП+ 0,1 мг/л НУК	50,87±2,02	—	—	4,00±0,10	30,31±2,22	2,37±0,15
БС+СС+ 0,1 мг/л БАП+ 0,05 мг/л НУК	45,34±1,92	2,00±0,10	5,21±0,23	—	—	2,42±0,19

БАП – бензиламинопурин, НУК – нафтилуксусная кислота, БС – белый свет, СС – синий свет, БС+СС – белый свет в сочетании с синим

На этапе укоренения исследовали сочетания БС+КС и НУК в разных концентрациях. Уменьшение концентрации НУК в среде для укоренения в 2 и более раза возможно при действии БС в сочетании с КС. При содержании 0,25 мг/л НУК в среде культивирования формировались побеги с максимальной высотой (Табл. 4).

Таблица 4– Ростовые параметры растений юкки слоновой на этапе укоренения in vitro, выращенных на свету разного спектрального состава с экзогенными гормонами в среде

Варианты	Высота побега, через 30сут., мм	Количество корней, шт.	Длина корней, см	Площадь листа, см ²
БС+ 0,5 мг/л НУК	60,28±1,54	5,00±0,12	19,45±1,21	4,10±0,32
БС+КС+0,25 мг/л НУК	62,33±1,32	4,00±0,11	22,37±0,01	4,21±0,31
БС+КС+0,1 мг/л НУК	57,41±1,92	3,00±0,10	15,21±1,63	4,16±0,24

БС – белый свет, КС – красный свет, БС+КС – белый свет в сочетании с красным, НУК – нафтилуксусная кислота

Уменьшение концентрации НУК в среде для укоренения возможно при действии белого света в сочетании с красным. Таким образом, освещая растения юкки слоновой в культуре in vitro светом разного спектрального состава, можно уменьшить содержание в среде экзогенных гормонов.

4. ВЛИЯНИЕ КАЧЕСТВА СВЕТА И ЭКЗОГЕННЫХ ГОРМОНОВ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ЛИСТЬЕВ ЮККИ СЛОНОВОЙ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Лист юкки слоновой имеет дорзовентральное строение, состоит из восьми слоев, два из которых слои палисадной ткани, а шесть – губчатой.

При исследовании мезоструктуры листа растений юкки слоновой обнаружили, что на БС развивался лист с максимальной толщиной, а на КС – с минимальной. Тонкие листья на КС наблюдали и другие авторы (Карначук и др., 1987; Ушакова и др., 1992). При длительном освещении КС происходило торможение развития листа. При этом формировалось не 6, а только 5 слоев губчатой паренхимы, и увеличивалась длина клеток, что способствовало уменьшению толщины губчатой ткани. Образовывались длинные и узкие клетки, что приводило к уменьшению объема клеток на КС

Уменьшение объема клеток на СС происходило за счет уменьшения длины клеток, тогда как их ширина оставалась прежней. Толщина палисадной паренхимы на БС и КС достоверно не различалась, но листья, выращенные под СС, имели меньшую длину палисадных клеток и соответственно, при сохранившихся двух слоях этих клеток, меньшую ширину палисадной паренхимы

Варианты освещения белым светом с синей и красной досветкой имели промежуточные значения всех рассматриваемых параметров мезоструктуры. При этом наблюдались незначительные отличия результатов в этих случаях от контроля на БС.

Число хлоропластов варьировало в зависимости от специфики ткани. В среднем на одну клетку палисадной ткани на БС и СС приходилось 35 хлоропластов, а губчатой ткани – 29, что соответствует общепринятым представлениям. Качество света не оказало существенного действия как на число, так и на объем хлоропластов.

При действии экзогенных гормонов, добавленных в среду культивирования, и света, наблюдалось сходство между эффектами, которые они вызывают. Характеристики мезоструктуры в варианте **БС+1,5 мг/л БАП+0,1 мг/л ИУК** и **БС+СС+0,1 мг/л БАП+0,05 мг/л ИУК** достоверно не отличались. Результаты показали, что на **БС+0,5 мг/л ИУК** и **БС+КС+0,1 мг/л ИУК** формировалась сходная анатомическая структура.

У 30-дневных растений юкки, культивируемой на КС, наблюдали снижение концентрации всех фотосинтетических пигментов. Листья на СС содержали хлорофилл в том же количестве, что и на БС. В варианте освещения СС содержание каротиноидов было максимальным и отличалось от результатов на КС в 2 раза. БАП в концентрации выше 0,1 мг/л способствует снижению уровня всех фотосинтетических пигментов независимо от освещения светом разного спектрального состава.

Таким образом, фотосинтетический аппарат при изменении спектра света и концентрации экзогенных гормонов обладает способностью перестраиваться, принимая наиболее выгодное расположение структурных компонентов, которое влечет за собой изменение интенсивности функционирования.

5. ГОРМОНАЛЬНЫЙ БАЛАНС ЛИСТЬЕВ ЮККИ СЛОНОВОЙ, СФОРМИРОВАННЫХ НА СВЕТУ РАЗНОГО СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА

При выращивании юкки на КС в течение 15 суток наблюдали активный рост листьев, в которых уровень свободной эндогенной ИУК был в 1,6 раз больше, чем на БС (Рис. 2). Растения, выращенные на БС+КС, имели уровень свободной ИУК больше, чем на БС и КС. Вероятно, это инициировало быстрое укоренение, образование большого количества корней и растяжение междоузлий побегов при этом варианте освещения.

В листьях юкки слоновой обнаружены свободные и связанные формы гиббереллинов $ГК_{1,3}$ и $ГК_{4,7}$. Результаты ИФА показали, что действие КС и БС+КС выражалось в увеличении уровня свободных ГК, вероятно, за счет синтеза (Рис. 3). Удлинению листьев и междоузлий на КС и, особенно, на БС+КС могло способствовать увеличение содержания ИУК и ГК, так как известно, что ауксины и гиббереллины стимулируют растяжение междоузлий, а при совместном присутствии увеличивают эффект друг друга (Brian, 1966; Wareing, Phillips, 1984; Kara et al., 1997). При этом ГК могут повышать уровень ИУК, а также действовать независимо (Дерфлинг, 1985; Gordon, 1982).

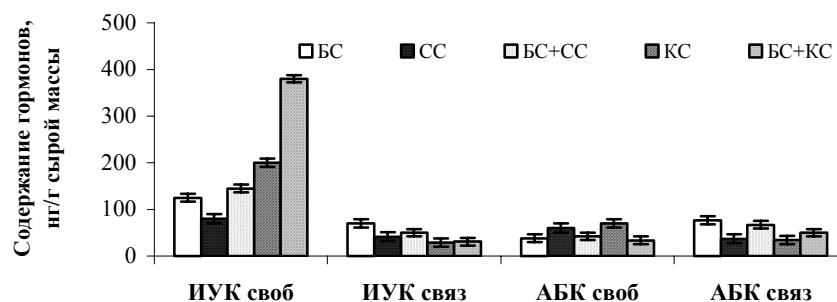


Рисунок 2 - Содержание ИУК и АБК в листьях юкки слоновой, сформированных *in vitro* на свету разного спектрального состава в течение 15 суток (БС- белый свет, СС- синий, КС- красный, БС+СС- белый свет с синей досветкой, БС+КС- белый свет с красной досветкой)

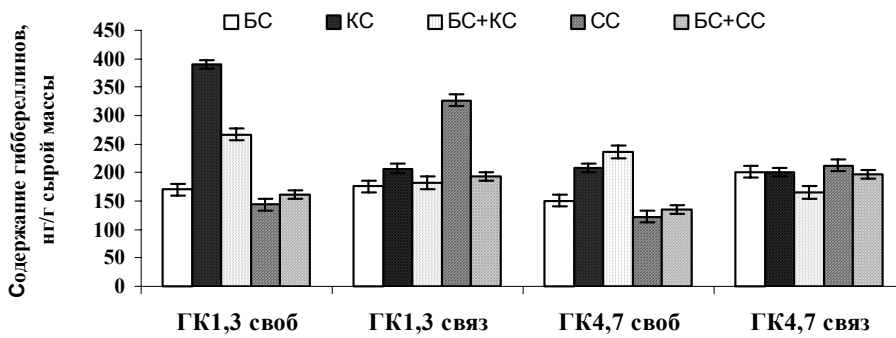


Рисунок 3 - Содержание гиббереллинов (ГК) в листьях юкки слоновой, сформированных *in vitro* на свету разного спектрального состава в течение 15 суток (BC- белый свет, KC- красный, CC- синий, BC+KC- белый свет с красной досветкой, BC+CC- белый свет с синим)

Причиной угнетения роста при длительном освещении KC является повышение уровня свободной АБК в 2 раза, вероятно, за счет активации синтеза и высвобождения из связанных форм.

Синий свет задерживал рост листьев и корней в длину. Это можно связать с понижением уровня ГК и ИУК, по сравнению с результатами на красном свету (Рис.2, Рис.3).

Повышение уровня зеатина на синем свету объясняет стимуляцию клеточного деления, вследствие которого происходило уменьшение длины клеток мезофилла, и соответственно их объема (Рис.4).

У растений, выращенных на синем свету, содержание АБК было выше, чем на красном и белом свету (Рис. 2). Имеются литературные данные, подтверждающие, что синий свет изменяет гормональный баланс в сторону ингибиторов роста (Протасова, 1981; Карначук и др., 1987; Гвоздева, 1997; Тищенко, 2000).

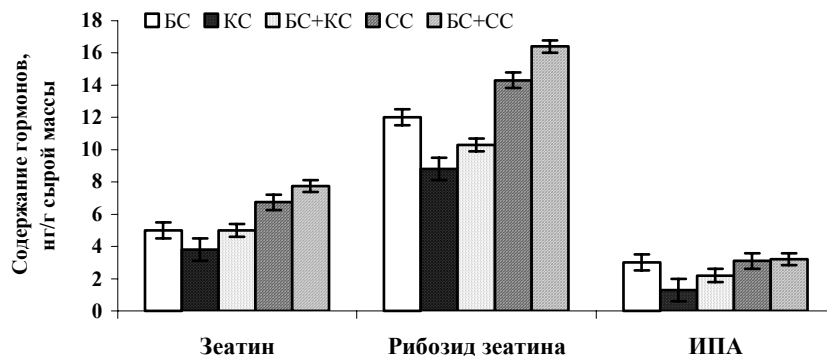


Рисунок 4 - Содержание цитокининов в листьях юкки слоновой, сформированных *in vitro* на свету разного спектрального состава в течение 15 суток

Таким образом, результаты наших опытов показали специфическое действие KC и CC на уровень эндогенных гормонов юкки слоновой, культивируемой *in vitro*. Регуляторная роль спектрального состава света в значительной степени обусловлена количественными и качественными изменениями фитогормонов в растениях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Юкка слоновая является перспективной культурой промышленного цветоводства. Однако, производство данной культуры в нашей стране ограничено недостаточным количеством посадочного материала. Клональное микроразмножение юкки имеет ряд преимуществ перед традиционными способами размножения: получение генетически однородного посадочного материала, высокий коэффициент размножения, возможность автоматизации процесса выращивания.

В ходе работы были определены оптимальные условия размножения юкки слоновой в культуре *in vitro*. На среде с 1,5 мг/л бензиламинопурина и 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты наблюдалось наибольшее количество боковых побегов, их высота и масса. Применение 0,5 мг/л нафтилуксусной кислоты способствовало сокращению этапа укоренения *in vitro* на 2 недели.

Результаты наших опытов показали специфическое действие красного и синего света на морфогенез и уровень эндогенных гормонов листьев юкки слоновой, культивируемой *in vitro*. При культивировании побегов юкки слоновой на красном свете повышается содержание индолилуксусной кислоты и гиббереллинов, что способствует быстрому укоренению. Однако, длительное освещение красным светом угнетало рост побега, образование хлорофилла и развитие мезофилла листа. Причиной угнетения роста, вероятно, является повышение уровня свободной абсцизовой кислоты в 2 раза при длительном выращивании на красном свете. В варианте с освещением белым светом в сочетании с красным отмечали активное развитие побега и корней.

Результаты опытов показали, что синий свет не оказывал существенного влияния на образование новых побегов. На синем свете наблюдали увеличение содержания фотосинтетических пигментов.

При рассмотрении совместного действия света и гормонов на синем свете наблюдали увеличение эффекта экзогенного цитокинина, который был добавлен в среду культивирования. На основании полученных данных можно рекомендовать значительное уменьшение концентраций цитокининов при освещении белым светом в сочетании с синим, что будет способствовать уменьшению себестоимости питательной среды. На этапе укоренения *in vitro* возможно полное исключение нафтилуksусной кислоты из среды при действии белого света в сочетании с красным.

Таким образом, полученные экспериментальные данные вносят вклад в развитие представлений о регуляции морфогенетических процессов растений в культуре *in vitro* светом и гормонами и могут быть использованы при получении посадочного материала юкки слоновой в промышленных масштабах.

ВЫВОДЫ

1. При действии экзогенных гормонов и света на мезоструктуру листьев юкки слоновой наблюдается сходство между эффектами, которые они вызывают. Синий свет, так же как и бензиламинопури́н, уменьшает объем клеток мезофилла и увеличивает число клеток на единицу площади. Красный свет и нафтилуksусная кислота уменьшают толщину мезофилла, что приводит к формированию тонких листьев.

2. Красный свет, так же как и бензиламинопури́н, уменьшает количество фотосинтетических пигментов. Синий свет увеличивает содержание всех фотосинтетических пигментов. Нафтилуksусная кислота увеличивает содержание только хлорофиллов.

3. Красный свет при кратковременном культивировании побегов юкки слоновой в культуре *in vitro* способствует быстрому укоренению растений, что сопряжено с изменением баланса эндогенных гормонов в листьях – повышением содержания индолилуксусной кислоты и гиббереллинов. При длительном культивировании на красном свете наблюдается высокий уровень абсцизовой кислоты.

4. Синий свет тормозит рост листьев и корней юкки слоновой в культуре *in vitro* в длину, что сопряжено с изменением баланса эндогенных гормонов – снижением уровня гиббереллинов, повышением цитокининов и абсцизовой кислоты.

5. Показано, что оптимальной средой для юкки слоновой на этапе микроразмножения является среда с 1,5 мг/л бензиламинопурина и 0,1 мг/л нафтилуksусной кислоты, на этапе укоренения *in vitro* – с 0,5 мг/л нафтилуksусной кислоты.

6. Длительное освещение белым светом в сочетании с синим увеличивает уровень цитокининов в листьях юкки слоновой, что позволяет в несколько раз уменьшить концентрацию экзогенного цитокинина в среде культивирования *in vitro*.

7. Растения, выращенные на белом свете в сочетании с красным, имеют высокий уровень индолилуксусной кислоты, что позволяет исключить экзогенные ауксины из среды культивирования на этапе укоренения *in vitro*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Логинова (Немойкина) А.Л. Микрклональное размножение юкки слоновой // Исследования молодых ботаников Сибири: тезисы докладов молодежной конференции. – Новосибирск, 2001. – С.53.
2. Логинова (Немойкина) А.Л. Влияние света разного спектрального состава на морфогенез *Yucca elephantipes* при культивировании *in vitro* // материалы XXXIX Международной студенческой научной конференции «Студент и научно-технический прогресс». – Новосибирск, 2001. – С.74.

3. Логинова (Немойкина) А.Л. Оптимизация среды культивирования *in vitro* юкки слоновой с использованием методов математического планирования эксперимента // Актуальные вопросы современной биологии и биотехнологии: тезисы докладов I Международной научной конференции молодых ученых и студентов. – Алматы: Изд-во «Агроуниверситет», 2001. – С.124.
4. Логинова (Немойкина) А.Л., Карначук Р.А. Роль красного света в регуляции морфогенеза и активности фитогормонов юкки слоновой в процессе культивирования *in vitro* // Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях: тезисы докладов 6-ой Международной конференции. – М.: Изд-во МСХА, 2001. – С.175-176.
5. Логинова (Немойкина) А.Л. Оптимизация среды культивирования *in vitro* юкки слоновой // Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях: тезисы докладов 6-ой Международной конференции. – М.: Изд-во МСХА, 2001. – С.175.
6. Loginova (Nemoykina) A., Karnachuk R. The influence of red light on *Yucca elephantipes* growth and hormones activity *in vitro* // 17th International Conference on Plant Growth Substances. – Brno, Czech Republic: Published by Mendel University of Agriculture and Forestry, 2001. – P.137.
7. Loginova (Nemoykina) A. Optimization of medium content for *Yucca elephantipes* *in vitro* culture with the mathematical planning method // 17th International Conference on Plant Growth Substances. – Brno, Czech Republic: Published by Mendel University of Agriculture and Forestry, 2001. – P.173.
8. Логинова (Немойкина) А.Л., Карначук Р.А. Роль синего света в регуляции морфогенеза и активности фитогормонов юкки слоновой в процессе культивирования *in vitro* // Актуальные проблемы современной науки: тезисы докладов II Международной конференции молодых ученых и студентов. Естественные науки. Часть 2. Секция: Биология и медицинские науки. – Самара: СамГТУ, 2001 г. – С.95.
9. Немойкина А.Л., Карначук Р.А. Влияние синего света на морфогенез и количество фитогормонов *Yucca elephantipes* в культуре *in vitro* // IV Сибирская школа молодого ученого: материалы Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. – Томск: ТГПУ, 2001. – С. 258.
10. Немойкина А.Л. Спектральный свет и содержание фотосинтетических пигментов *Yucca elephantipes* *in vitro* // Биология – наука 21 века: тезисы докладов 6-й Пушинской школы-конференции молодых ученых. – Пушино, 2002. – с.167.
11. Немойкина А.Л., Карначук Р.А. Морфогенез и гормональный баланс юкки слоновой в культуре *in vitro* на свету разного спектрального состава // Научный вестник Черновицкого университета: сборник научных трудов. Биология.– Вып. 145: – Черновцы: ЧНУ, 2002. – С. 72- 76.
12. Немойкина А.Л. Зависимость структурно-функционального состояния фотосинтетического аппарата *Yucca elephantipes* *in vitro* от спектрального света и экзогенных гормонов // Актуальные вопросы современной биологии и биотехнологии: тезисы докладов II Международной конференции молодых ученых и студентов. – Алматы: Изд-во «Агроуниверситет», 2002. – С. 79-80.
13. Немойкина А.Л. Влияние света разного спектрального состава на мезоструктуру листа юкки слоновой в культуре *in vitro* // Студент и научно-технический прогресс. Биология: материалы XI Международной научной студенческой конференции.– Новосибирск: НГУ, 2002. – С .91.
14. Немойкина А.Л. Оптимизация условий освещения юкки слоновой при микрклональном размножении // Сборник трудов ТСХИ НГАУ. – Вып. 5. – Томск, 2002 г. – С. 115-118.
15. Немойкина А.Л., Карначук Р.А. Совместное действие света разного спектрального состава и экзогенных гормонов на мезоструктуру *Yucca elephantipes* в культуре *in vitro* // Электронный журнал «Исследовано в России». – 2002. – № 174. – С. 1930-1937.
<http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2002/174.pd>