

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОТАНИКИ
им. В.Ф. КУПРЕВИЧА НАН БЕЛАРУСИ»

УДК 582. 852:581.1:581.16

СОРОКА
Александрина Витальевна

**РЕПРОДУКТИВНАЯ СПОСОБНОСТЬ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ
СЕМ. САСТАСЕАЕ JUSS. В УСЛОВИЯХ ОРАНЖЕРЕИ
И КУЛЬТУРЫ ТКАНИ *IN VITRO***

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 03.00.12 – физиология и биохимия растений

Минск, 2007

Работа выполнена в ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»

Научные руководители: **Гетко Нелли Владимировна**, доктор биологических наук, заведующая лабораторией оранжерейных растений ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»
Фоменко Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

Официальные оппоненты: **Волынец Александр Потапович**, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории физиологии большого растения ГНУ «Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича НАН Беларуси»
Кухарчик Наталья Валерьевна, доктор сельскохозяйственных наук, зав. отделом биотехнологии РУП «Институт плодородства»

Оппонирующая организация: **Белорусский государственный университет**

Защита состоится «12» марта 2008 г. в 14⁰⁰ часов на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.38.01 при ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси» по адресу 220072, г.Минск, ул.Академическая, 27.

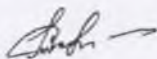
Телефон (факс) ученого секретаря: (017) 284-18-53

E-mail: exp-bot@biobel.bas-net.by

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я. Коласа НАН Беларуси

Автореферат разослан «___» февраля 2008 г.

Ученый секретарь
Совета по защите диссертаций,
кандидат биологических наук



Т.Ф.Сосновская

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время возросла роль сохранения биологического разнообразия растений тропической и субтропической зон в ботанических садах стран с умеренным климатом (Ortega-Baes, Godinez-Alvarez, 2006; Капустян [и др.], 2004). В коллекционном фонде сем. *Sactaceae* Juss. Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси (ЦБС НАН Беларуси), формирование которого началось с 1936 г., представлены виды, имеющие декоративное и лекарственное значение, а также исчезающие виды, занесенные в первое приложение The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (Богдан, 2004; Гетко, Чертович, 2005; Сорока, 2007). Анализ видового разнообразия коллекционного фонда показал, что согласно систематике С. Backeberg в нем насчитывается 336 видов, принадлежащих к 83 родам, согласно систематике Е. Anderson – 54 родам, и который представляет собой ценный генетический ресурс, имеющий научно-познавательное и прикладное значение, но при этом нуждается в пополнении новыми видами растений, а также в размножении и омоложении уже имеющегося материала.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами и темами.

Исследования проводились в рамках плановых тем ГНОФИ «Ресурсы растительного и животного мира – 30, 37» лаборатории оранжерейных растений ГНУ ЦБС НАН Беларуси «Сохранение и обогащение путем интродукции и современных методов репродукции генофонда тропической и субтропической флоры, изучение особенностей их адаптации в условиях оранжерейных комплексов» (№ ГР 20064799, 2006-2011 гг.) и отдела биохимии и биотехнологии растений «Сохранение генофонда редких и хозяйственно ценных видов растений в коллекции *in vitro*. Разработка методов микроклонального размножения и депонирования» (№ ГР 20065434, 2006-2011 гг.).

Цель и задачи исследования. Разработка новых подходов к размножению представителей сем. *Sactaceae* на базе коллекционного фонда ЦБС НАН Беларуси для его омоложения и пополнения новыми видами, а также сравнительное изучение ряда физиологических признаков некоторых генотипов при культивировании *in vitro*, *ex vitro* и *in vivo*. Это предусматривало выполнение следующих задач:

– определить влияние физиологически активных веществ (ФАВ) при вегетативном размножении на индукцию побегообразования, корнеобразования,

рост и развитие растений в зависимости от доз, особенностей препаратов и видов растений;

- исследовать влияние температуры и скарификации на прорастание семян и рост растений на первых этапах онтогенеза;

- изучить влияние ФАВ на прорастание семян и рост растений на первых этапах онтогенеза в зависимости от доз, видов препаратов и генотипов растений;

- провести подбор и модификацию методов размножения *in vitro* с учетом видовой специфики представителей сем. *Cactaceae*;

- провести сравнительное изучение САМ-метаболизма, пигментной системы и анатомической структуры ассимиляционных органов растений при культивировании их в условиях *in vitro*, *ex vitro* и *in vivo*.

Положения, выносимые на защиту:

- физиологически активные вещества как индукторы побегообразования и корнеобразования у разных видов сем. *Cactaceae*;

- предпосевная обработка семян и черенков сем. *Cactaceae* ФАВ и условия культивирования – важнейшие факторы оказывающие влияние на скорость прорастания семян, степень корнеобразования у черенков, жизнеспособность сеянцев и их морфо-физиологические признаки на первых этапах онтогенеза;

- определение биотехнологических подходов и условий культивирования эксплантов *in vitro* как способ увеличения скорости размножения представителей сем. *Cactaceae*;

- характеристика некоторых физиолого-биохимических процессов и анатомической структуры разных видов сем. *Cactaceae* в условиях *in vitro*, при адаптации *ex vitro* и выращенных в условиях оранжереи.

Личный вклад соискателя. Весь экспериментальный материал получен лично автором и при его непосредственном участии. Выбор условий эксперимента, интерпретация результатов и анализ данных проведены соискателем самостоятельно и при консультации с научными руководителями д.б.н. Н.В.Гетько и к.б.н. Т.И.Фоменко. Постановка и проведение ряда экспериментальных работ осуществлялась совместно с н.с. Л.Г.Бердичевец, оформление результатов и фотографий – с н.с. А.В.Зубаревым.

Апробация результатов диссертации. Основные результаты диссертационной работы доложены на Международной научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика Н.В.Смольского «Современные направления деятельности ботанических садов и держателей ботанических коллекций по сохранению биоразнообразия растительного мира» (Минск, 2005 г.), Международной научной конференции молодых ученых «Молодежь в науке – 2005» (Минск, 2005), Международной научной

конференции молодых ученых «Молодежь в науке – 2006» (Минск, 2006 г.), Международной научно-практической конференции «Молодые исследователи – ботанической науке 2006» (Гомель, 2006 г.), Международной научной конференции «Цветоводство без границ» (Харьков, 2006 г.), Международной научной конференции посвященной 75-летию со дня образования Центрального ботанического сада НАН Беларуси «Теоретические и прикладные аспекты интродукции растений как перспективного направления развития науки и народного хозяйства» (Минск, 2007 г.), Четвертой Международной научной конференции «Биологическое разнообразие. Интродукция растений» (Санкт-Петербург, 2007 г.), Пятой Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2007 г.).

Опубликованность результатов диссертации. По теме диссертации опубликованы следующие работы: 6 статей в научных журналах (2,2 авт. л.), 5 статей в материалах научных конференций (1,5 авт. л.).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, основной части (6 глав), заключения, библиографического списка (338 источника, из них 218 на иностранных языках) и 6-ти приложений. В основной части размещено 58 рисунков и 19 таблиц. Диссертация изложена на 173 страницах (таблицы и рисунки – 41, приложения – 11 страниц).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Состояние вопроса

Ботанические сады играют ведущую роль в сохранении генетического потенциала мировой флоры (Heuwood [et al.], 1989). Семейство *Cactaceae* Juss. – крупное специализированное семейство двудольных растений, около 25% видов которого находятся на грани исчезновения (Hunt, 1999). Многие представители этого семейства обладают лекарственными и декоративными свойствами, перспективны для разработки экологически безопасных инсектицидов, представляют ценность как сельскохозяйственные культуры (Cespedes [et al.], 2005; Mizrahi, Nerd 1999; Dubeux [et al.], 2006).

Представители сем. *Cactaceae* – высокоспециализированные суккулентные растения с САМ-типом метаболизма, имеющие некоторые особенности, затрудняющие их размножение в условиях оранжереи: низкую скорость процессов метаболизма, медленный рост, высокую чувствительность к изменению внешних факторов среды (Zavala-Hurtado, Diaz-Solis, 1995; Anderson [et al.], 1994). Проведенный анализ научной литературы показывает перспективность применения ФАВ для стимулирования побегообразования и ускорения процесса укоренения представителей сем. *Cactaceae*. Не вызывает

сомнения потребность в оптимизации условий и приемов проращивания семян, роста и развития сеянцев, поскольку размножение семенами – это один из главных способов пополнения коллекционного фонда редкими видами и поддержания внутривидового разнообразия генотипов. Представляется перспективным при размножении представителей данного семейства использование биотехнологических подходов. Это является особенно актуальным для редких видов, которые не удастся размножить традиционными способами в условиях оранжереи (Guadalupe [et al.], 1999; Rubluo [et al.], 1993). Остаются недостаточно изученными вопросы повышения эффективности вегетативного и семенного размножения представителей сем. *Cactaceae*, в том числе с использованием биотехнологических методов в условиях умеренного климата.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования при изучении особенностей размножения представителей сем. *Cactaceae* являлись растения коллекционного фонда ЦБС НАН Беларуси, а также семена, собранные в оранжерее и полученные из зарубежных коллекций. Изучение вегетативного размножения проводили на 7 видах, семенного – на 6, культивирования в условиях *in vitro* – на 18 видах. Эксперименты по вегетативному размножению проводили в оранжерее ЦБС НАН Беларуси согласно (Турецкая, 1961). Исследовали влияние 6-бензиламинопурина (БАП), кинетина, β -индолилуксусной кислоты (ИУК), α -нафтилуксусной кислоты (НУК), янтарной кислоты (ЯК), коммерческого препарата «Циркон» (ГКК) в различных концентрациях и способах введения в растение на стимулирование побегообразования и укоренение черенков. Исследование всхожести, энергии прорастания семян, жизнеспособности сеянцев и их биометрических параметров на первых этапах онтогенеза в зависимости от способов предпосевной обработки, концентрации ФАВ и условий культивирования проводили в соответствии с принятыми методиками (Strittmatter [et al.], 2002). Исследовали следующие ФАВ: ЯК, НУК, ГКК, коммерческие препараты «Эпин» (ЭБ) и «Гумат натрия» (НГК). При культивировании *in vitro* растения выращивали на модификациях среды МС (Murashige, Scoog, 1962) в культуральных сосудах, размещенных на стеллажах с люминесцентными лампами при 22–26°C, освещенности 5±2 тыс. люкс, 16-ти часовом фотопериоде и влажности воздуха 56–70% в соответствии с общепринятыми методиками (Калинин, Сарнацкая, Полишук, 1980; Бутенко, 1999). О наличии САМ-метаболизма судили по изменению характерной суточной динамики титруемой кислотности клеточного сока (Altesor [et al.], 1992; Winter [et al.], 1981). Количественное содержание фотосинтетических пигментов определяли спектрофотометрическим методом (Ничипорович, 1974).

Количество сухого вещества в образцах определяли методом сухого остатка без предварительного подсушивания (Полевой, Максимов, 1978). Сравнительные анатомические исследования стебля проводили на растениях *Austrocylindropuntia subulata* (Muehlenpf.) Backeb., культивируемых *in vitro*, а также выращенных *in vivo*. Размер клеток определяли в проходящем свете с помощью микроскопа «AxioImager A1». Для измерения использовали программу «AxioVision». Исследования проводили при увеличении $\times 200$ и $\times 100$ (Мокронос, Борзенкова, 1978). Количество хлоропластов в клетке определяли в образцах по методу (Вечер, Булко, 1985). Статистический анализ проводили с использованием параметрических и непараметрических методов с помощью программы *Statistica*.

Результаты исследований и их обсуждение

Влияние ФАВ на эффективность вегетативного размножения представителей сем. *Cactaceae*

Стимулирование бокового побегообразования. Проведенные исследования выявили благоприятное влияние ФАВ на формирование боковых побегов у растений *Trichocereus pachanoi* Britton et Rose и *Ferocactus horridus* Britton et Rose. Реакция на использование ФАВ оказалась видоспецифичной, в частности *Trichocereus pachanoi* характеризовался более заметной реакцией на обработку по сравнению с *Ferocactus horridus*. Оптимальным вариантом для обоих видов, при котором отмечено стимулирование роста, активация ареол и наиболее быстрое формирование побегов, является инъекция 0,1 мл раствора, содержащего кинетин и БАП в концентрации 15 мг/л. Исследования показали целесообразность использования в дальнейшем сочетания двух и более вариантов обработки растений, например, сочетание механического повреждения верхушки и обработку растворами ФАВ.

Стимулирование укоренения черенков. Установлено, что для видов с хорошо развитой водозапасающей паренхимой (*Mammillaria albidula* Backeb., *Mammillaria centricirra* Lem., *Trichocereus pachanoi*, *Austrocylindropuntia subulata*) более эффективным является введение действующих веществ погружением оснований черенков в концентрированные растворы на 5 минут или обработкой их смесью с тальком. Укоренение эпифитных видов (*Ripsalis teres* (Vell.) Steud., *Schlumbergera truncate* (Haworth) Moran.) более эффективно при инкубировании оснований черенков в водных растворах ФАВ в течение 24 часов. Показано, что на 140-й день эксперимента процесс укоренения закончен и идет наращивание массы стебля, в то время как у видов с хорошо развитой водозапасающей паренхимой все еще происходит уменьшение сырой массы,

Понижение температуры до 15°C снижало всхожесть семян, но увеличивало процент выживших сеянцев. У скарифицированных семян, которые проращивали при 15°C, отмечены более высокая всхожесть и формирование более крупных сеянцев, а для *Mammillaria densispina* характерно и увеличение процента жизнеспособных сеянцев.

Влияние ФАВ при проращивании семян в условиях *in vivo*.
Инкубирование семян в течение часа в растворах ФАВ положительно влияет на всхожесть семян, энергию прорастания, а также жизнеспособность сеянцев, их биометрические показатели на начальных этапах роста и развития, при этом реакция у видов различалась. Растворы НУК, ЭБ, НГК, ЯК увеличили всхожесть семян *Mammillaria bocasana* var. *Multilanata*. Показано, что для *Mammillaria bocasana* var. *Rosea* положительный эффект оказали все исследуемые ФАВ, кроме НГК, при этом более эффективным оказался раствор ГКК. Для вида *Mammillaria parkinsonii* благоприятным для повышения всхожести оказалось воздействие НУК и ГКК. Наиболее высокой всхожестью отличался вид *Escobaria zilziana*, наиболее низкой – *Mammillaria gracillis*. У *Mammillaria parkinsonii* и *Mammillaria densispina* в ответ на обработку стимуляторами роста выявлены изменения длины и диаметра сеянцев, сочетающиеся с увеличением длины корней. Положительная реакция на ФАВ показана у вида *Escobaria zilziana*, а для видов *Mammillaria gracillis* и *Mammillaria bocasana* var. *Multilanata* она оказалась неоднозначной.

Выявлено, что обработка семян растворами ФАВ, в целом увеличила жизнеспособность сеянцев (рисунок 2).

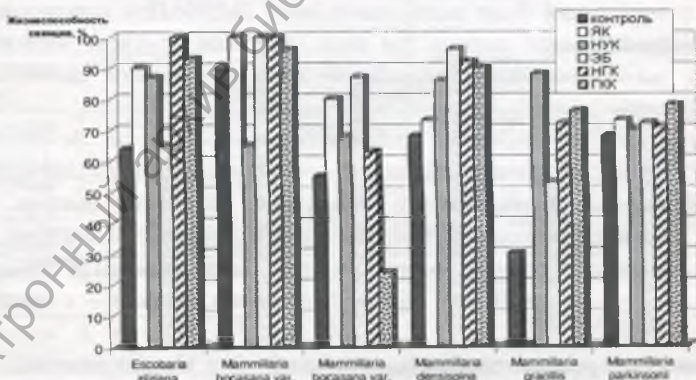


Рисунок 2 – Влияние ФАВ на жизнеспособность сеянцев некоторых видов сем. *Cactaceae*

Проращивание семян в условиях *in vitro*. Проращивание семян в условиях *in vitro* увеличивает всхожесть некоторых видов, но уменьшает скорость прорастания. Нами выявлены преимущества проращивания семян сем. *Cactaceae* в культуре *in vitro*: получение более крупных и жизнеспособных семян, а также возможность их дальнейшего микроклонального размножения, что особенно важно для редких видов.

Нами было показано, что реакция представителей сем. *Cactaceae* на скарификацию, обработку растворами ФАВ и проращивание в условиях *in vitro* оказалась видоспецифичной. Наиболее эффективным вариантом для *Escobaria zilziana* было инкубирование семян в растворе ГКК; для *Mammillaria densispina* – культивирование *in vitro* на среде с БАП 4 мг/л; для *Mammillaria gracillis* – инкубирование в растворах НУК, ЭБ, НГК, ГКК; для *Mammillaria bocasana var. Multilanata* – проращивание скарифицированных семян при температуре 15°C или инкубирование в растворах ЯК, НУК, ЭБ; для *Mammillaria bocasana var. Rosea* – проращивание скарифицированных семян при температуре 15°C, инкубирование в растворах ЯК, ЭБ или культивирование на среде с БАП 2 мг/л; для *Mammillaria parkinsonii* – скарификация семян, инкубирование в растворах ЯК, НУК, ГКК.

Размножение представителей сем. *Cactaceae* в культуре *in vitro*

Введение растительного материала в культуру *in vitro*. В результате исследований по введению растительного материала в культуру *in vitro* выявлено, что стерилизация растительной ткани большинства исследованных нами видов была успешной при использовании раствора AgNO_3 (1,8%), однако для семян концентрация была значительно ниже (0,2%). При использовании других дезинфицирующих агентов для ряда генотипов отмечено негативное влияние на жизнеспособность эксплантов и невозможность дальнейшего развития растений.

Изучена меристематическая активность апикальных и латеральных эксплантов *Austrocylindropuntia subulata*, *Chamecereus silvestrii* cv. *Variiegata* и *Trichocereus pachanoi*. Выявлено, что латеральные экспланты быстрее, чем апикальные начинают проявлять меристематическую активность. Показано, что растения *Schlumbergera truncata* физиологически более активны в период с декабря по март, в то время как *Austrocylindropuntia subulata* – с июня по сентябрь.

Размножение растительного материала *in vitro*. Исследовано действие регуляторов роста на размножение представителей сем. *Cactaceae* в культуре *in vitro*. Активной реакцией на внесение в среду гормонов отличались виды *Austrocylindropuntia subulata* и *Opuntia salmiana*. К 8-й неделе культивирования почти во всех вариантах зарегистрированы процессы побегообразования и

корнеобразования. Для вида *Trichocereus pachanoi* характерно корнеобразование к 8-й неделе культивирования, побегообразование – к 16-й. Наиболее выраженная физиологическая активность у видов *Chamecereus silvestrii* cv. *Variiegata* и *Tephrocactus camachoi* проявилась к 16-й неделе культивирования. Значительное количество микропобегов на 16-й неделе культивирования отмечено у *Chamecereus silvestrii* cv. *Variiegata* ($14,2 \pm 0,56$) (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние гормональных добавок на число микропобегов на одном экспланте у некоторых видов сем. *Cactaceae* к 16-й неделе культивирования

Гормональные добавки, мг/л	<i>Austrocylindropuntia subulata</i>	<i>Chamecereus silvestrii</i> cv. <i>Variiegata</i>	<i>Opuntia salmiana</i>	<i>Tephrocactus camachoi</i>	<i>Trichocereus pachanoi</i>
Без добавления	$2,0 \pm 0,08$	$3,5 \pm 0,14$	$3,1 \pm 0,12$	-	$1,3 \pm 0,05$
БАП 2	$6,3 \pm 0,25$	$12,2 \pm 0,48$	$8,6 \pm 0,34$	-	$1,6 \pm 0,06$
БАП 2 + ИУК 0,1	$5,5 \pm 0,22$	$10,1 \pm 0,40$	$7,4 \pm 0,29$	-	$2,2 \pm 0,09$
БАП 2 + ИУК 0,5	$4,8 \pm 0,19$	$9,8 \pm 0,39$	-	-	$2,0 \pm 0,08$
БАП 2 + НУК 0,5	$7,4 \pm 0,29$	$3,8 \pm 0,15$	-	-	$3,5 \pm 0,14$
БАП 4	$11,1 \pm 0,44$	$11,4 \pm 0,45$	$6,7 \pm 0,26$	-	$3,8 \pm 0,15$
БАП 4 + ИУК 0,1	$7,2 \pm 0,28$	$9,3 \pm 0,37$	$6,2 \pm 0,24$	-	$5,1 \pm 0,20$
БАП 4 + НУК 0,1	$7,6 \pm 0,30$	$4,1 \pm 0,16$	-	-	$9,2 \pm 0,36$
Кинетин 2 мг/л	$6,8 \pm 0,27$	$14,2 \pm 0,56$	$5,8 \pm 0,23$	-	-
Кинетин 2 + НУК 0,1	$6,0 \pm 0,24$	$10,6 \pm 0,42$	$5,2 \pm 0,20$	$1,2 \pm 0,04$	-
Кинетин 2 + НУК 0,5	$9,3 \pm 0,37$	-	-	$1,5 \pm 0,06$	-
Кинетин 4	$8,6 \pm 0,34$	-	-	$2,3 \pm 0,09$	-
Кинетин 4 + НУК 0,1	$7,5 \pm 0,30$	$2,9 \pm 0,11$	-	$2,9 \pm 0,11$	-
Кинетин 4 + НУК 0,5	$7,0 \pm 0,28$	$3,1 \pm 0,12$	-	$2,6 \pm 0,10$	-

Примечание – Символ (-) обозначает, что данные отсутствуют.

Установлено, что при культивировании растений на питательной среде МС интенсивное побегообразование у большинства видов отмечалось при

добавлении БАП 2–4 мг/л и ИУК 0,5 мг/л, а также кинетина 4 мг/л + ИУК 0,1–0,5 мг/л. (рисунок 3).



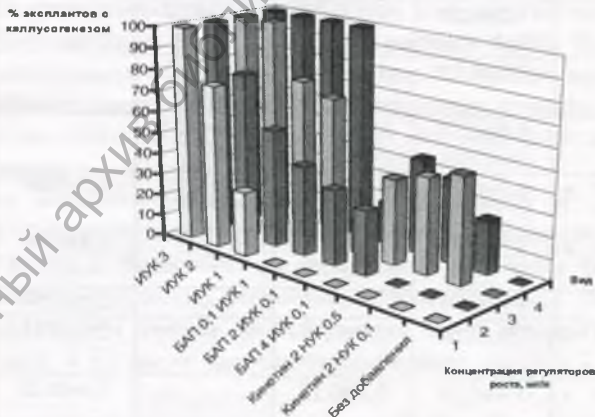
1



2

Рисунок 3 – Побегообразование на среде с содержанием БАП 2 + ИУК 0,1 мг/л у *Austrocyllindropuntia subulata* к 8-й неделе культивирования (1), у *Chamaecereus silvestrii* cv. *Variegata* к 16-й неделе культивирования (2)

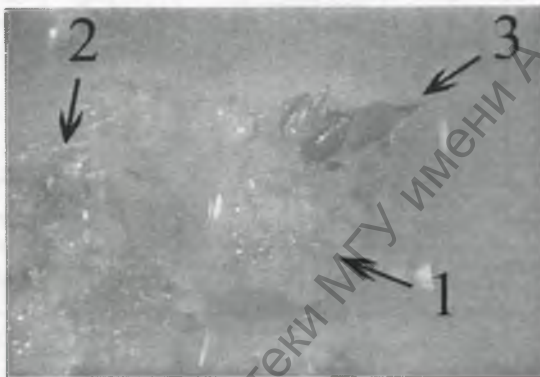
Каллусо- и морфогенез в культуре ткани кактусов. Исследованы особенности каллусогенеза для ряда генотипов сем. *Cactaceae*. Проведенные исследования позволили установить, что активно растущий каллус формируется не у всех видов, и интенсивность его формирования на средах с разным гормональным составом зависит от генотипа (рисунок 4).



1 – *Dolichothele longimamma*; 2 – *Opuntia salmiana*; 3 – *Austrocyllindropuntia subulata*; 4 – *Chamaecereus silvestrii* cv. *Variegata*

Рисунок 4 – Влияние регуляторов роста в среде культивирования на каллусогенез у представителей сем. *Cactaceae* на 8-ю неделю культивирования

У исследованных видов на среде МС с добавлением ИУК 3 мг/л отмечалась высокая интенсивность каллусообразования. Повышение концентрации ИУК в среде культивирования вызывало оводнение каллуса, что вело к его нежизнеспособности. Разработаны условия получения вторичного морфогенеза. Показано, что при переносе каллуса на среду культивирования, содержащую БАП 2 мг/л после 7-ми недель культивирования развились побеги, а при переносе на среду, содержащую БАП 2 мг/л + ИУК 0,1 мг/л к 9-й неделе культивирования отмечена индукция эмбриогенеза (рисунок 5).



1 – каллусная ткань, 2 – инициация органогенеза, 3 – побегообразование
Рисунок 5 – Органогенез из каллусной ткани *Opuntia salmiana*

Культивирование, подготовка и адаптация растений к условиям *ex vitro*. Создание коллекций генотипов в культуре *in vitro* представляет собой перспективный способ сохранения биоразнообразия сем. *Cactaceae*. Показано, что культивирование растений *Austrocyllindropuntia subulata*, *Chamaecereus silvestrii* cv. *Variegata*, *Tephrocactus camachoii*, *Trichocereus pachanoi* на модификациях среды МС возможно в течение длительного периода.

Выявлены специфические особенности культивирования растений сем. *Cactaceae* в культуре *in vitro*. Среди них можно отметить склонность тканей к витрификации (гипергидратации) и относительно невысокую скорость ростовых процессов. Витрифицированные сеянцы отмечены у видов: *Astrophytum ornatum* (DC.) Webb., *Mammillaria bocasana* var. *Rose*, *Mammillaria densispina*, *Melocactus taxonii*, *Mammillaria parkinsonii*, *Parodia magnifica* Ritt.

Формирование развитой корневой системы для успешной акклиматизации растений в условиях *ex vitro* наиболее активно происходило у видов *Schlumbergera truncate*, *Opuntia salmiana*, более медленно у *Austrocyllindropuntia subulata* и *Dolichothele longimamma*. Лучшее укоренение исследуемых видов

отмечено на среде МС с добавлением БАП 4 мг/л + НУК 0,1 мг/л + уголь 2 г/л (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние соотношения кинетина, НУК и активированного угля в среде МС на скорость укоренения регенерантов. % укоренившихся растений

Вид	Период, неделя	Регуляторы роста (мг/л) и активированный уголь (г/л)								
		Без добавления	Кинетин 2 НУК 0,1	Кинетин 2 НУК 0,5	Кинетин 4	Кинетин 4 НУК 0,1	Кинетин 4 НУК 0,1 уголь 2	БАП 2 НУК 0,1	БАП 4 НУК 0,1	БАП 4 НУК 0,1 уголь 2
<i>Austrocylindropuntia subulata</i>	4	50	45	69	30	32	90	55	35	100
	8	70	71	100	58	65	100	75	60	100
<i>Opuntia salmiana</i>	4	55	60	72	30	54	85	75	70	80
	8	100	90	100	100	87	100	95	90	100
<i>Dolichothele longimamma</i>	4	47	53	60	25	45	65	50	42	68
	8	58	69	74	50	67	82	70	65	85
<i>Schlumbergera truncata</i>	4	75	79	80	75	76	81	82	78	100
	8	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Для создания оптимальных условий перехода растений в условия *ex vitro* нами была разработана методика, благодаря которой процент выживших растений *Dolichothele longimamma*, *Schlumbergera truncata*, *Melocactus maxonii*, *Mammillaria parkinsonii* составил 100%, *Austrocylindropuntia subulata* – 90%, *Opuntia salmiana* – 85%, *Eriocereus jusherti*, *Mammillaria bocasana* var. *Rose*, *Mammillaria bocasana* var. *Multilanata*, *Mammillaria densispina* – менее 80%.

Структурно-функциональные особенности представителей сем. *Cactaceae* в разных условиях культивирования

Существующая специфика газообмена и ассимиляции в условиях *in vitro* оказывает непосредственное воздействие на формирование структурно-функциональной системы у растений с САМ-метаболизмом и дальнейшую их адаптацию к условиям *ex vitro*. Впервые проведено сравнительное изучение типа фотосинтеза у растений сем. *Cactaceae*, культивируемых *in vitro*, *ex vitro* (при переносе *in vitro* растений в условия оранжереи) и *in vivo* (выращенных в условиях оранжереи).

Исследование САМ-метаболизма растений культивируемых *in vitro*, *ex vitro* и *in vivo*. Растения, культивируемые в условиях *in vitro*, имеют выраженный САМ-тип метаболизма, что указывает на то, что подобранные концентрации регуляторов роста в среде МС не нарушают формирования присущих генотипу структурных и функциональных особенностей. Изменения рН и титруемой кислотности клеточного сока в течение суток, характерные для САМ-метаболизма у растений *Austrocylindropuntia subulata*, в условиях *ex vitro* указывают на успешную адаптацию растений (рисунок 6).

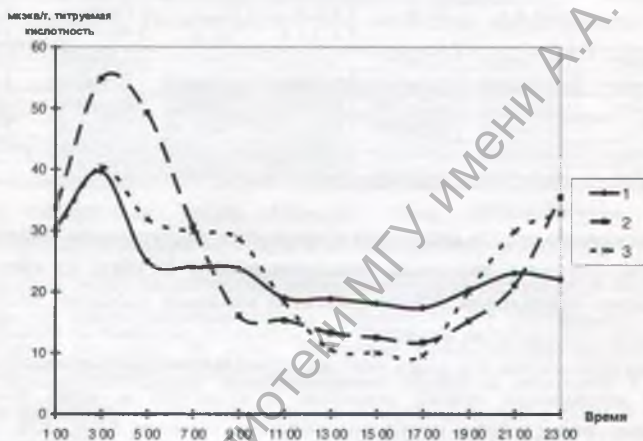


Рисунок 6 – Изменение титруемой кислотности клеточного сока в течение суток у растений *Austrocylindropuntia subulata*, культивируемых *in vitro* (1), *ex vitro* (2) и *in vivo* (3)

Пигментный фонд растений в культуре *in vitro*, *ex vitro* и *in vivo*. На примере анализа пигментного фонда, адаптированного к произрастанию в условиях высокой солнечной инсоляции вида *Austrocylindropuntia subulata* и «бесхлорофильного» культивара *Chamaecereus silvestrii* cv. *Variegata*, показано, что при культивировании побегов *in vitro* в условиях недостатка света у обоих видов возрастает суммарное содержание хлорофилла по сравнению с растениями, выращенными в оранжерее (*in vivo*). Черенки «бесхлорофильной» формы в условиях *in vitro* зеленеют. С переносом образцов в условия *ex vitro* этот признак исчезает, что указывает на пластичность пигментной системы этих видов, обеспечивающую их адаптируемость к новым условиям произрастания. Та же закономерность характерна и для суммы каротиноидов у обоих видов. И в этом плане способность клонов восстанавливать пигментный фонд, характерный для материнского растения, отражает сохранение генетических или эпигенетически обусловленных признаков при размножении растений

методами культуры ткани, что представляется весьма важным для размножения ценных декоративных форм представителей сем. *Cactaceae* (таблица 3).

Таблица 3 – Содержание и соотношение фотосинтетических пигментов (мг/г сырой массы) в фотосинтезирующих тканях побега *Austrocylindropuntia subulata* (1) и «бесхлорофилльной» формы *Chamaecereus silvestrii* cv. *Variegata* (2) при культивировании *in vitro*, *ex vitro* и *in vivo*

Вид	Образец	Содержание и соотношение пигментов, мг/г сырой массы побега					
		Хл. а	Хл. b	Хл. а + Хл. b	Хл. а Хл. b	Сумма каротиноидов	Хлорофилл каротиноиды
1	In vitro	0,51±0,01	0,33±0,01	0,84±0,03	1,56±0,06	0,05±0,00	16,47±0,66
	Ex vitro	0,48±0,02	0,28±0,01	0,76±0,03	1,70±0,07	0,06±0,00	13,84±0,56
	In vivo	0,27±0,01	0,05±0,00	0,32±0,01	5,28±0,22	0,14±0,00	2,31±0,09
2	In vitro	0,03±0,00	0,02±0,00	0,05±0,00	1,62±0,06	0,03±0,00	1,66±0,07
	Ex vitro	0,02±0,00	0,02±0,00	0,04±0,00	0,72±0,03	0,03±0,00	1,33±0,05
	In vivo	0,01±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00	0,50±0,02	0,03±0,00	1,10±0,03

Накопление сухого вещества в тканях и особенности анатомической структуры стебля у растений культивируемых *in vitro*, *ex vitro* и *in vivo*.

Исследования накопления сухого вещества показали сходную тенденцию для обоих видов – увеличение значений при переходе растений из культуры *in vitro* к условиям оранжереи, что указывает на нормальную адаптируемость растений. Меньшее накопление сухого вещества в культуре *in vitro*, по-видимому, обусловлено недостатком ресурсов, главным образом CO₂, для протекания фотосинтеза. Исследования анатомии стебля растений *Austrocylindropuntia subulata*, культивируемых *in vitro*, адаптированных к условиям *ex vitro* и выращенных *in vivo*, показали, что размеры клеток увеличиваются по направлению к центру цилиндра, а число хлоропластов в клетке уменьшается. Сравнительный анализ показал, что растения *ex vitro* имеют более крупные клетки и большее число хлоропластов по сравнению с растениями в культуре *in vitro*, и их значения приближаются к растениям, выращенным *in vivo*, что указывает на их успешную адаптацию к условиям оранжереи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

Проведены комплексные исследования физиологических аспектов репродукции 28 представителей сем. *Cactaceae* на базе коллекционного фонда Центрального ботанического сада НАН Беларуси, включающие изучение влияния различных факторов на эффективность вегетативного и семенного

размножения видов и разработку новых биотехнологических приемов репродукции, на основании чего сделаны следующие выводы:

1. Установлено стимулирующее действие ФАВ на формирование бокового побегообразования у *Trichocereus pachanoi*, *Ferocactus horridus* и укоренение черенков *Mammillaria albidula*, *Mammillaria centricirrha*, *Trichocereus pachanoi*, *Austrocylindropuntia subulata*, *Ripsalis teres*, *Schlumbergera truncate*. При этом выбор действующего вещества, способ его введения в растение и концентрация видоспецифичны. Впервые установлено, что для стимулирования роста, активации ареол и быстрого формирования побегов у *Trichocereus pachanoi*, *Ferocactus horridus* наиболее эффективным является инъекция раствора из двух цитокининов: кинетин 15 мг/л + БАП 15 мг/л. Для укоренения видов с хорошо развитой водозапасающей паренхимой (*Mammillaria albidula*, *Mammillaria centricirrha*, *Trichocereus pachanoi*, *Austrocylindropuntia subulata*) эффективен метод погружения оснований черенков в концентрированный раствор ФАВ или обработка сухой смесью. Укоренение эпифитных видов (*Ripsalis teres*, *Schlumbergera truncate*) эффективно при замачивании черенков в водных растворах ФАВ [2].

2. Показана также видоспецифическая реакция растений рода *Mammillaria* и *Escobaria* на скарификацию семян, обработку их растворами ФАВ и проращивание в условиях *in vitro*. Наиболее эффективным вариантом для *Escobaria zilziana* оказалось инкубирование семян в растворе ГКК; для *Mammillaria densispina* – культивирование *in vitro* на среде с БАП 4 мг/л; для *Mammillaria gracillis* – инкубирование в растворах НУК, ЭБ, НГК, ГКК; для *Mammillaria bocasana* var. *Multilanata* – проращивание скарифицированных семян при температуре 15°C или инкубирование в растворах ЯК, НУК, ЭБ; для *Mammillaria bocasana* var. *Rosea* – проращивание скарифицированных семян при температуре 15°C, инкубирование в растворах ЯК, ЭБ или культивирование на среде с БАП 2 мг/л; для *Mammillaria parkinsonii* – скарификация семян, инкубирование в растворах ЯК, НУК, ГКК [3, 4, 6].

3. Выявлены как общие особенности ответной реакции растений сем. *Cactaceae* при размножении их *in vitro*: наиболее оптимальным стерилизующим веществом для всех видов является раствор $AgNO_3$; более высокой физиологической активностью у большинства видов обладают латеральные экспланты; активное побегообразование большинства исследуемых видов происходит на средах МС с концентрацией БАП 2–4 мг/л + ИУК 0,5 мг/л, а также кинетин 4 мг/л + НУК 0,1–0,5 мг/л, а лучшее корнеобразование – на средах МС с добавлением БАП 4 мг/л + НУК 0,1 мг/л + активированный уголь 2 г/л, так и видовая специфика при введении растений в культуру *in vitro* и их дальнейшем культивировании [1, 7, 8, 9].

4. Доказана высокая адаптируемость растений *Austrocylindropuntia subulata*, размноженных в условиях *in vitro*, о чем свидетельствуют изменения pH и титруемой кислотности клеточного сока в течение суток, которые характерны для растений с САМ-метаболизмом. В то же время это указывает на то, что подобранные концентрации регуляторов роста в среде Мурасиге-Скуга не нарушают формирования присущих генотипу структурных и функциональных особенностей. Выяснены некоторые физиолого-биохимические особенности растений видов *Austrocylindropuntia subulata* и «бесхлорофильной» формы *Chamaecereus silvestrii* cv. *Variegata* при переносе их в условия *ex vitro*: содержание хлорофиллов *a* и *b* уменьшается и приближается к значениям этих показателей у растений, выращенных в условиях *in vivo*, что свидетельствует об их успешной адаптации и восстановлении декоративных качеств. Количество каротиноидов возрастает у первого вида и сохраняется на одном уровне у второго. Анатомические исследования побегов показали, что растения *Austrocylindropuntia subulata*, перенесенные в условия *ex vitro*, имеют более крупные клетки и большее количество хлоропластов в клетке по сравнению с растениями в культуре *in vitro* [5].

Практическое использование результатов:

5. На основании проведенных исследований впервые разработаны методы повышения эффективности вегетативного размножения для 7 видов, увеличения всхожести семян для 6 видов кактусов. Введены в культуру *in vitro* 15 видов, впервые для 4 видов разработаны схемы микроклонального размножения [1-4, 6-9, 11].

6. Разработанные методы повышения эффективности вегетативного и семенного размножения, в том числе с использованием культуры *in vitro*, позволили пополнить коллекционный фонд сем. *Cactaceae* ЦБС НАН Беларуси, который насчитывает по классификации С. Backeberg 83 рода, по Е. Anderson 54 рода, по W. Barthlott 49 родов, четырема новыми видами *Escobaria zilziana*, *Mammillaria densispina* *Parodia mammulosa*, *Opuntia salmiana*, а также размножить уже имеющиеся экземпляры 24 видов [10]. Часть размноженных растений передана в экспозиционную оранжерею ЦБС НАН Беларуси, используемую для демонстрационных и образовательных целей, а также в Лужковскую среднюю школу для создания «Зимнего сада» в целях усиления экологического образования. Полученные результаты используются при чтении курса «Физиология растений» в МГУ им. А. А. Кулешова [акты о внедрении].

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах

1. **Сорока, А.В.** Оптимизация методик культивирования *in vitro* некоторых видов кактусов / А.В. Сорока // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2005. – №5. – С. 67–69.
2. **Сорока, А.В.** Применение регуляторов роста для вегетативного размножения некоторых видов семейства *Cactaceae Juss.* / А.В. Сорока, Н.Л. Королева // Биологический вестник. – 2006. – Т. 10, № 2. – С. 68–70.
3. **Сорока, А.В.** Влияние биологически активных веществ на прорастание семян некоторых видов сем. *Cactaceae Juss.* / А.В. Сорока // Веснік МДУ імя А.А. Куляшова. – 2006. – №4 (25). – С. 249–254.
4. **Сорока, А.В.** Влияние скарификации на прорастание семян некоторых видов сем. *Cactaceae Juss.* / А.В. Сорока // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2006. – №5. – С. 183–186.
5. **Сорока, А.В.** Особенности САМ метаболизма у представителей сем. *Cactaceae Juss.* / А.В. Сорока // Веснік МДУ імя А.А. Куляшова. – 2007. – № 4 (28). – 165–170.
6. **Сорока, А.В.** Разработка методов введения в культуру *in vitro* некоторых представителей сем. *Cactaceae Juss.* / А.В. Сорока, Н.В. Гетко, Т.И. Фоменко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2008. – № 1. – С. 18–22.

Материалы конференций

7. **Сорока, А.В.** Биотехнологические подходы культивирования *in vitro* представителей семейства *Cactaceae* в ЦБС НАНБ. / А.В. Сорока, Л.Г. Бердичевец // Современные направления деятельности ботанических садов и держателей ботанических коллекций по сохранению биоразнообразия растительного мира: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения академика Н. В. Смольского, Минск, 27–29 сент. 2005 г. / НАН Беларусі, Центральный ботанический сад; редкол.: В.Н. Решетников [и др.]. – Минск, 2005. – С. 222–225.
8. **Сорока, А.В.** Морфофизиологические особенности культивирования некоторых представителей семейства *Cactaceae Juss.* / А.В. Сорока // Молодые исследователи – ботанической науке 2006: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Гомель, 21–22 сент. 2006 г. / Министерство образования Республики

Беларусь, Гомель. гос. ун-т им. Ф. Скорины; редкол.: Н.М. Дайнеко [и др.]. – Гомель, 2006. – С. 54–58.

9. **Сорока, А.В.** Применение культуры *in vitro* для размножения некоторых видов сем. *Cactaceae* Juss. / А.В. Сорока // Биологическое разнообразие. Интродукция растений: материалы Междунар. науч. конф., Санкт-Петербург, 5–8 июня 2007 г. / Ботанический сад Ботанического ин-та им. В. Л. Комарова РАН; редкол.: Ю.С. Смирнов [и др.]. – СПб., 2007. – С. 616–618.

10. **Сорока, А.В.** Коллекционный фонд растений семейства *Cactaceae* Juss. Центрального ботанического сада НАН Беларуси / А.В. Сорока // Теоретические и прикладные аспекты интродукции растений как перспективного направления развития науки и народного хозяйства: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 75-летию со дня образования Центрального ботанического сада НАН Беларуси, Минск, 12–15 июня 2007 г. / НАН Беларуси, Центральный ботанический сад; редкол.: В.Н. Решетников [и др.]. – Минск, 2007. – Т. 2. – С. 75–77.

11. **Сорока, А.В.** Длительное культивирование представителей сем. *Cactaceae* в культуре *in vitro* / А.В. Сорока, Т.И. Фоменко // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: материалы V Междунар. Науч. конф., Минск, 28–30 ноября 2007 г. / Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси; редкол.: Н.А. Ламан [и др.]. – Минск, 2007. – С. 189.

РЕЗЮМЕ

Сорока Александрина Витальевна

Репродуктивная способность представителей сем. *Cactaceae* Juss. в условиях оранжереи и культуры ткани *in vitro*

Ключевые слова: *Cactaceae* Juss., коллекционный фонд, классификация, вегетативное размножение, семенное размножение, физиологически активные вещества, культура *in vitro*, САМ-фотосинтез, пигменты.

Цель работы: разработка новых подходов к размножению представителей сем. *Cactaceae* на базе коллекционного фонда ЦБС НАН Беларуси для его омоложения и пополнения новыми видами, а также сравнительное изучение ряда физиологических признаков некоторых генотипов при культивировании *in vivo* и *in vitro*.

Методы исследования: морфологические, анатомические, физиологические, статистические.

Использованная аппаратура: микроскоп «AxioImager A1», спектрофотометр СФ-16, термостаты ТСО-1/80 МПУ, рН-метр НН 223.

Полученные результаты и их новизна. Проведенные комплексные исследования физиологических аспектов репродукции у 28 представителей сем. *Cactaceae*, включающие изучение влияния различных факторов на эффективность вегетативного и семенного размножения видов и разработку новых биотехнологических приемов репродукции позволили сформулировать ряд положений. Установлена видоспецифическая реакция растений на обработку ФАВ при вегетативном и семенном размножении и культивировании *in vitro*. Подобранное соотношение гормональных добавок в среде культивирования *in vitro* не нарушает формирования присущих генотипу анатомических и физиологических признаков, что обеспечивает в дальнейшем формирование нормального габитуса и быструю адаптацию растений при переносе их в условия *ex vitro*.

Рекомендации по использованию. Разработаны методы повышения эффективности вегетативного размножения для 7 видов, увеличения всхожести семян для 6 видов кактусов. Введены в культуру *in vitro* 15 видов, впервые для 4 видов разработаны схемы микроклонального размножения. Пополнен коллекционный фонд сем. *Cactaceae* ЦБС НАН Беларуси четырьмя новыми видами, а также размножены уже имеющиеся экземпляры 24 видов.

Область применения. Полученные данные вносят вклад в теорию и практику репродукции редких тропических и субтропических видов в условиях оранжерей умеренного климата и могут быть использованы специалистами в растениеводстве, а также при чтении спецкурсов в ВУЗ.

РЭЗІЮМЭ

Сарока Александрына Вітал'еўна

Рэпрадуктыўная здольнасць прадстаўнікоў сям. *Cactaceae* Juss. ва ўмовах аранжарэй і культуры ткані *in vitro*

Ключавыя словы: *Cactaceae* Juss., калекцыйны фонд, класіфікацыя, вегетатыўнае размнажэнне, размнажэнне насеннем, фізіялагічна актыўныя рэчывы, культура *in vitro*, САМ-фотасінтэз, пігменты.

Мэта работы: Распрацоўка новых падыходаў да размнажэння прадстаўнікоў сям. *Cactaceae* на базе калекцыйнага фонду ЦБС НАН Беларусі з мэтай яго амаладжэння і папаўнення новымі відамі, а таксама, параўнальнае вывучэнне фізіялагічных прыкметаў асаблівасцей некаторых генатыпаў пры культываванні *in vivo* і *in vitro*.

Метады даследавання: марфалагічныя, анатамічныя, фізіялагічныя, статыстычныя.

Выкарыстаная апаратура: мікраскоп «AxioImager A1», спектрафатометр СФ-16, тэрмастаты ТСО-1/80 МПУ, рН-метр НІ 223.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Комплексныя даследаванні фізіялагічных аспектаў рэпрадукцыі ў 28 прадстаўнікоў сям. *Cactaceae*, якія ўключаюць вывучэнне ўплыву розных фактараў на эфектыўнасць вегетатыўнага размнажэння і размнажэння насеннем відаў, а таксама распрацоўку новых біятэхналагічных прыёмаў рэпрадукцыі, дазволілі сфармуляваць шэраг палажэнняў. Устаноўлена відаспецыфічная рэакцыя раслін на апрацоўку БАР пры вегетатыўным размнажэнні, размнажэнні насеннем і культываванні *in vitro*. Падабраныя суадносіны гарманальных дабавак у культуральным асяроддзі для культывавання *in vitro* не парушаюць фарміравання ўласцівых генатыпу анатамічных і фізіялагічных прыкмет, забяспечваюць у далейшым фарміраванне нармальнага габітусу і хуткую адаптацыю пры пераносе іх да ўмоў *ex vitro*.

Рэкамендацыі па выкарыстанню. Разпрацаваны метады павышэння эфектыўнасці вегетатыўнага размнажэння для 7 відаў, павелічэння ўсходжасці насення для 6 відаў кактусаў. Уведзены ў культуру *in vitro* 15 відаў, упершыню для 4 відаў распрацаваны схемы мікракланальнага размнажэння. Павялічаны калекцыйны фонд сям. *Cactaceae* ЦБС НАН Беларусі на 4 новых віда, а таксама размножаны экзэмпляры 24 відаў, якія ўжо былі ў наяўнасці.

Галіна выкарыстання. Атрыманыя дадзеныя робяць уклад у тэорыю і практыку рэпрадукцыі рэдкіх трапічных і субтрапічных відаў ва ўмовах аранжарэй умеранага клімату, і могуць быць выкарыстаны спецыялістамі ў раслінаводстве, а таксама пры чытанні спецкурсаў у ВНУ.

SUMMARY

Saroka Aleksandryna Vitalievna

Reproductive ability of representatives of *Cactaceae* Juss. family in conditions of a greenhouse and culture *in vitro*

Key words: *Cactaceae* Juss., collection fund, classification, vegetative propagation, seed propagation, biologically active substances, culture *in vitro*, -CAM-photosynthesis, pigments.

The aim of research: development of new approaches to propagation of representatives of *Cactaceae* family on the basis of the collection fund of the Central Botanical Gardens of the NAS of Belarus with the purpose of rejuvenation and addition of new species to it and also comparative studying of some physiological attributes of some genotypes are cultivated at *in vivo* and *in vitro*.

The methods of research: morphological, anatomical, physiological and statistical methods.

The used equipments: «AxioImager A1» microscope, CФ-16 spectrophotometr, TCO-1/80 MIY thermostats, HI 223 pH meter.

The received results and their novelty. Researches of the influence of various factors on both vegetative and seed propagation of species and development of new biotechnological receptions to a reproduction of 28 representatives *Cactaceae* family, have allowed us to come to a conclusion. Species-specific reaction of plants to BAS processing at vegetative and seed propagation and cultivation *in vitro* is established. The picked up ratio of hormonal additives in cultivating medium *in vitro* does not break anatomic and physiological attributes of genotype and it provides further formation of normal habitus and fast adaptation of plants to conditions *ex vitro*.

Recommendation on using. Methods of increase of efficiency of vegetative propagation for 7 specimens, increases of seeds germination for 6 species of cactuses are developed. 15 species are entered into culture *in vitro*. For the first time schemes of microclonal propagation for 4 species are developed. The collection fund of *Cactaceae* family in the Central Botanical Gardens of the NAS of Belarus is filled with four new species, and also propagation already available 24 species.

The fields of application. The data obtained contribute to theory and practice of a propagation of rare tropical and subtropical species in conditions of greenhouses of a temperate climate and can be used in selection as well as special courses on physiology of plants and botany in higher educational institutions.