

## ОСОБЕННОСТИ САМ МЕТАБОЛИЗМА У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМ. САСТАСЕАЕ JUSS.

В статье рассматриваются особенности процесса фотосинтеза при размножении растений в условиях *in vitro*. Применение биотехнологических подходов для размножения редких и декоративных видов сем. *Cactaceae* Juss. представляется весьма эффективным и перспективным. При таком способе размножения растений *Austrocylindropuntia subulata*, отмечено изменение значений pH и титруемой кислотности тканей в течение суток. Характерное изменение показателей в утренние часы, указывают на наличие САМ метаболизма у растений культивируемых *in vitro*. Показано, уменьшение количества ассимилирующих пигментов при адаптации растений *Austrocylindropuntia subulata* и *Chamaecereus silvestrii* cv. *Variegata* к условиям *in vivo*. Пластичность САМ метаболизма и лабильность пигментной системы, указывают на хорошую адаптивную способность растений, размножаемых в культуре *in vitro*.

В последнее время отмечено сокращение ареалов естественного произрастания растений сем. *Cactaceae* Juss. Вследствие усиления антропогенного воздействия, около 25% видов семейства находятся на грани исчезновения. Поэтому одной из приоритетных задач ботанических садов всего мира является сохранение редких и исчезающих растений в коллекциях [1].

Как известно, эволюция представителей сем. *Cactaceae* шла по пути высокой специализации, в условиях недостаточного увлажнения и высоких температур, и поэтому практически все виды этого семейства – суккулентные растения, характеризующиеся развитием запасающей паренхимы, плотными покровами, отсутствием листьев и метаболизмом органических кислот по типу толстянковых – *Crassuiaceae Acid Metabolism* (CAM) [2].

САМ метаболизм обуславливает морфофизиологические особенности этих растений, влияя на их репродуктивную способность. Многие редкие виды этого семейства имеют низкую репродуктивную способность и медленно растут. Весьма перспективным является использование новых биотехнологических подходов, в том числе размножение растений в культуре *in vitro* [3].

Культивирование растений в условиях *in vitro* сопряжено с изменением физиологических процессов в тканях. С одной стороны, внутри сосудов, где куль-

тивируются растения, формируются особые условия, характеризующиеся снижением концентрации  $\text{CO}_2$ , что приводит к уменьшению фотосинтетической активности. С другой стороны, в сосудах, как правило, повышенная влажность, которая позволяет растениям находиться с открытыми устьицами в течение суток. Существующая специфика газообмена и ассимиляции оказывает непосредственное воздействие на формирование структурно-функциональной системы растений с CAM метаболизмом.

Сложным периодом для растения, выращенного в условиях *in vitro*, является его адаптация к условиям *in vivo*. Следует отметить, что условия оранжереи имеют следующие отличия от условий культивирования *in vitro*: интенсивность света, продолжительность фотопериода, температурный режим, влажность и др. Весьма важным представляется пластичность CAM метаболизма для формирования нормального габитуса растений и быстрой адаптации к условиям оранжереи [4].

Еще одной особенностью, представляющей интерес для характеристики фотосинтетической активности, влияющей на нормальное развитие растений является изучение пигментного состава ассимилирующих тканей представителей сем. *Cactaceae*, выращенных в разных условиях.

Таким образом, целью исследования явилось изучение особенностей фотосинтеза и содержания пигментов, у растений, культивируемых *in vitro*, и при их адаптации к условиям *in vivo*.

**Методы и объекты исследования.** Объектами исследования являлись растения *Austrocylindropuntia subulata* (Muehlenpf.) Backeb. и *Chamaecereus silvestrii* (Spegg.) Britton et Rose cv. *Variegata*, выращенные в условиях оранжереи (*ex vitro*) и культивируемые в условиях *in vitro*.

О наличии CAM метаболизма судили по изменению характерной суточной динамики pH и титруемой кислотности клеточного сока. Образцы растительной ткани, отобранные через каждые два часа в течение суток взвешивались и быстро замораживались в жидком азоте при  $-20^\circ\text{C}$ . Затем образцы (1 г), растирали в ступке с добавлением воды, фильтровали и доводили раствор до объема 30 мл. Измеряли pH и титровали раствором 10 mM NaOH до  $7,0 \pm 0,05$  малыми порциями (10-50 мкл) [5].

Количественное содержание фотосинтетических пигментов определяли спектрофотометрическим методом Годнева в модификации Шлыка [6]. Растительные образцы взвешивали, растирали с  $\text{CaCO}_3$  и 100%-м ацетоном. Гомогенат фильтровали, полученный экстракт пигментов доводили до 3 мл ацетоном. Спектры поглощения растворов регистрировали против 100% ацетона на спектрофотометре СФ-26 при 440,5 нм, 644 нм, 662 нм и 720 нм. Содержание фотосинтетических пигментов рассчитывали общепринятым способом.

Все опыты проводили не менее 3 раз на 3-4 растениях в каждом варианте. В таблицах и на графиках представлены средние значения и их среднеквадратичные отклонения. Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием методов параметрической статистики.

**Результаты и обсуждение.** Исследования растительных тканей *Austrocylindropuntia subulata* показали, что величина pH в течение суток варьировала в пределах 4,7 – 5,5 (рис. 1). Растения, культивируемые в условиях *in vitro*, имеют наиболее высокий показатель pH (5,7) в 17<sup>00</sup>. В ночное время значения снижаются и достигают минимального показателя (4,8) в 3<sup>00</sup>, то есть по окончании темнового периода. Для растений, адаптируемых к условиям *in vivo*, характерно изменение pH в течение суток, в пределах 5,25 в вечернее время и 4,7 в утренний

период. Показатели pH растений, выращенных в условиях оранжереи, имеют значения от 5,5 до 5,14. Для растений во всех трех вариантах условий отмечено увеличение показателя pH в вечернее время и уменьшение в утренние часы, что указывает на фотосинтезирование растений по CAM типу. При этом следует отметить, что у всех растений CAM тип выражен слабо, поскольку диапазон изменений pH варьирует в небольших пределах. При этом наиболее выраженные колебания pH в течение суток отмечены у растений, культивируемых *in vitro* (0,9). Минимальные колебания отмечены у растений *ex vitro* (0,36). Растения при переходе к условиям *in vivo* занимают промежуточное положение и имеют колебания показателя pH в течение суток – 0,55.

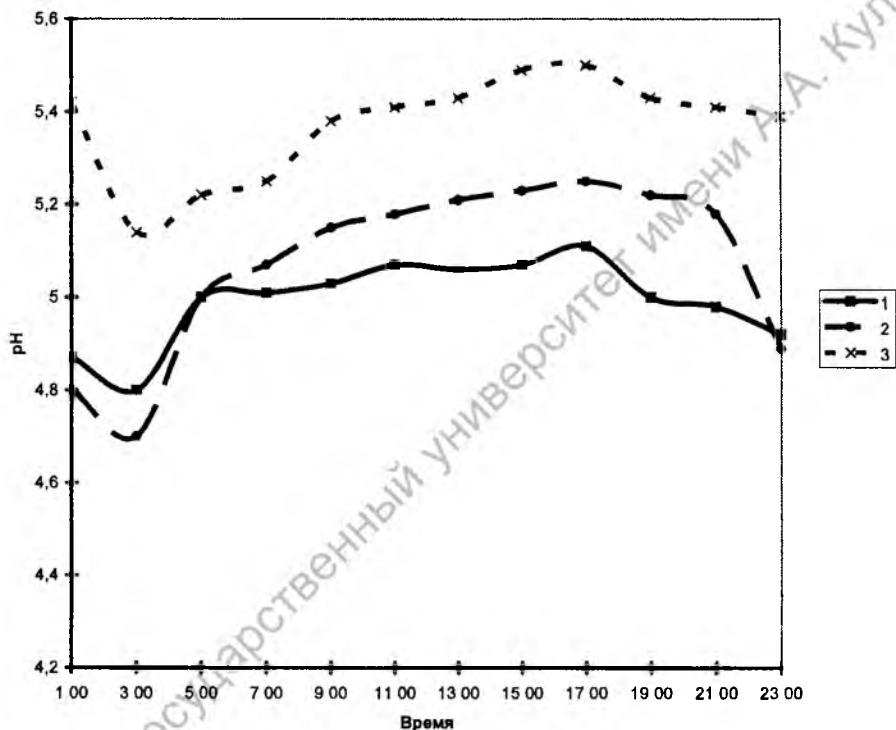


Рис. 1. Изменение pH в течение суток у растений *Austroclindropuntia subulata*, культивируемых *in vitro* (1), адаптируемых к условиям *in vivo* (2), выращенных в условиях *ex vitro* (3)

У исследуемых растений *Austroclindropuntia subulata* отмечено изменение титруемой кислотности клеточного сока в течение суток (рис. 2). Растения, культивируемые в условиях *in vitro*, имеют характерное увеличение титруемой кислотности в утренние часы, которое составляет 39,66 мэкв/г сырой массы. В течение последующих двух часов, после достижения максимального значения, отмечено резкое понижение титруемой кислотности до 25 мэкв/г. В 17<sup>00</sup> отмечено максимально низкое значение – 17,34 мэкв/г. Перед наступлением темного периода отмечается повышение кислотности, которое затем продолжается в течение ночи.

Максимальное значение титруемой кислотности у растений *in vivo* совпадает с началом светового периода и составляет 54,84 мэкв/г. Минимальные значения (11,67 мэкв/г) отмечены в вечернее время. Растения, выращенные в оранжереи, имеют колебания титруемой кислотности от 40,35 мэкв/г в утренние часы, до 9,54 мэкв/г – в вечернее время.

Для растений *in vitro* отмечено быстрое уменьшение кислотности при наступлении светового периода и относительно низкие показания в течение дня. Растения, выращиваемые в условиях *ex vitro*, характеризуются постепенным уменьшением кислотности в течение светового периода. Для растений *in vivo* и *ex vitro* характерен небольшой пик повышения значений титруемой кислотности в начале темного периода. При этом показатели растений *ex vitro* более выражены, чем у *in vivo* растений.

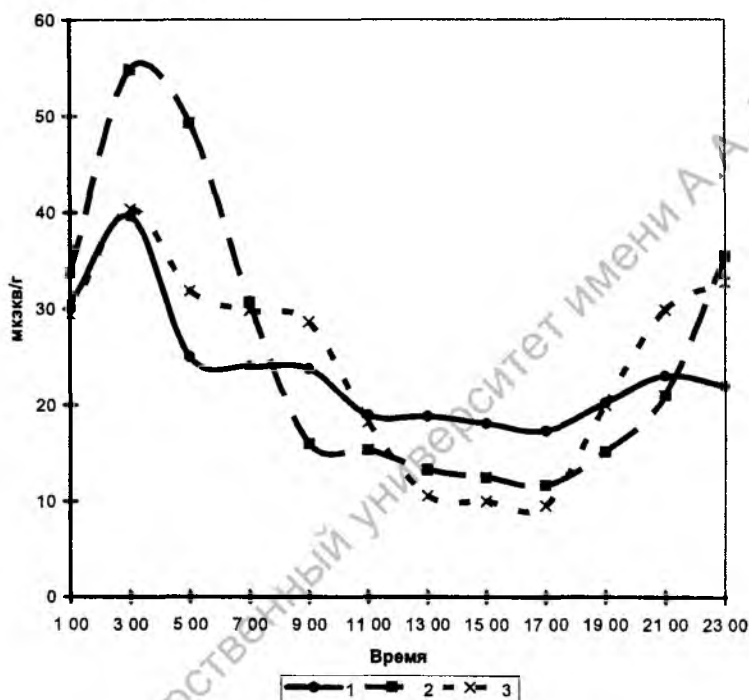


Рис. 2. Изменение титруемой кислотности клеточного сока в течение суток у растений *Austroclindropuntia subulata*, культивируемых *in vitro* (1), адаптируемых к условиям *in vivo* (2), выращенных в условиях *ex vitro* (3)

Таким образом, значения титруемой кислотности растений в течение суток показало, что резкое понижение значений в утренние часы, характерное для САМ метаболизма, отмечено у растений, культивируемых в условиях *in vitro*. Кроме того, установлено постепенное уменьшение кислотности в течение дня, характерное для растений *ex vitro*, что указывает на менее выраженный САМ фотосинтез, который может быть обусловлен более изменчивыми условиями среды. Показатели титруемой кислотности растений *in vivo* занимают промежуточное положение, что указывает на изменение метаболических процессов при переходе растения из условий *in vitro* к условиям *ex vitro*.

Таким образом, было показано, что растения, характеризующиеся пластичным САМ метаболизмом, хорошо адаптируются к изменяющимся условиям *in vitro* и *ex vitro*. При этом в условиях культуры *in vitro* идет более выраженный САМ метаболизм, что возможно обусловлено более постоянными условиями среды, а также более низкими концентрациями  $\text{CO}_2$  в закрытых сосудах.

Одним из важных показателей процессов фотосинтеза является содержание пигментов в ассимилирующих тканях растения. Анализ пигментного фонда

фотосинтезирующих частей *Austrociindropuntia subulata* показал, что количество хлорофилла *a* у растений колеблется от 0,4779 мг/г до 0,2661 мг/г; количество хлорофилла *b* варьирует от 0,0504 мг/г до 0,3299 мг/г, а их суммарное содержание – от 0,3165 мг/г до 0,3299 мг/г сырой массы. Эти данные свидетельствуют о том, что этот вид можно отнести к группе растений с низким содержанием фотосинтезирующих пигментов (см. таблицу).

№	Образец	Хлорофиллы				Карати- ноиды	Хлорофиллы каратиноиды
		a	b	a+b	a/b		
	Austrocilindropuntia subulata						
1	In vitro	0,5135 ±0,0053	0,3299 ±0,0040	0,8435 ±0,0032	1,5565 ±0,0332	0,05181 ±0,059	16,4695 ±2,945
2	In vivo	0,4779 ±0,0257	0,2808 ±0,0024	0,7587 ±0,023	1,7026 ±0,1052	0,0566 ±0,0107	13,8396 ±2,9658
3	Ex vitro	0,2661 ±0,0001	0,0504 ±0,0008	0,3165 ±0,0008	5,2806 ±0,0948	0,1368 ±0,0004	2,3125 ±0,0122
	Chamaecereus silvestrii cv. Variegata						
4	In vitro	0,0329 ±0,001	0,0208 ±0,003	0,0537 ±0,003	1,6201 ±0,332	0,0324 ±0,001	1,6624 ±0,110
5	Ex vitro	0,0003 ±0,0001	0,0005 ±0,0001	0,0008 ±0,0001	0,5242 ±0,0001	0,0092 ±0,0004	0,0832 ±0,003

Содержание хлорофилла *a* у растений *Austrociindropuntia subulata*, культивируемых в условиях *in vitro*, составляет 0,5135 мг/г, у растений *in vivo* этот показатель ниже и составляет 0,4779 мг/г. Наименьшие значения хлорофилла *a* отмечены у растений, выращенных в условиях оранжереи – 0,2661 мг/г.

Тенденция в содержании хлорофилла *b* у растений *Austrociindropuntia subulata* подобна хлорофиллу *a*. Наибольшее содержание, а именно 0,3299 мг/г отмечено у растений, культивируемых в условиях *in vitro*. Минимальное значение хлорофилла *b* отмечено в группе растений, выращенных в условиях *ex vitro* – 0,0504 мг/г. Растения при переходе к условиям *in vivo* имеют среднее значение – 0,2808 мг/г.

Наибольшее значение суммарного содержания хлорофилла *a* и *b* наблюдается у растений *in vitro* 0,8435 мг/г. У растений *in vivo* и *ex vitro* эти показатели ниже, 0,7587 мг/г и 0,3165 мг/г, соответственно.

Соотношение хлорофилла *a* и *b* составляет 1,5565 у растений культивируемых в условиях *in vitro*. У растений *in vivo* этот показатель равен 1,7026. У растений, выращенных в оранжереи, соотношение пигментов равно 5,2806.

Содержание каратиноидов у *Austrociindropuntia subulata* колеблется в пределах: 0,05181 мг/г у растений *in vitro*, 0,0566 мг/г экземпляров *in vivo* и 0,1368 мг/г у оранжерейных растений.

Анализ соотношения каратиноидов и хлорофиллов показал, что наиболее высокие значения отмечены у растений *in vitro* – 16,4695. Наименьшее значение зарегистрировано у растений *ex vitro* 2,3125. Растения *in vivo* имели показатель 13,8396.

Таким образом, анализ содержания зеленых и желтых пигментов в *Austrociindropuntia subulata* позволил установить, что наибольшие значения отмечены у растений, культивированных *in vitro*, а при переходе к условиям *in vivo* содержание пигментов уменьшается. Наименьшие значения содержания пигментов отмечены у растений, выращенных в условиях *ex vitro*, что возможно связано с более интенсивным освещением в оранжереи. Содержание хлорофилла *a* и *b* у растений *Chamaecereus silvestrii*, выращенных в условиях оранже-

реи, 0,0003 мг/г и 0,0005 мг/г, соответственно (см. таблицу). Общее содержание зеленых пигментов 0,0008 мг/г. При культивировании *in vitro* у растений отмечено увеличение хлорофилла *a* до 0,0329 мг/г, хлорофилла *b* до 0,0208 мг/г, общей суммы хлорофиллов до 0,0537 мг/г. Увеличилось также и соотношение хлорофилла *a* и *b* в условиях *in vitro* в сравнении с условиями *ex vitro* от 0,5242 до 1,6201. Содержание каротиноидов, а также соотношение хлорофиллов и каротиноидов, выше у растений, культивируемых *in vitro* – 0,0324 мг/г и 1,6624, в сравнении с растениями *ex vitro* – 0,0092 мг/г и 0,0832.

Вариегатные растения *Chamaecereus silvestrii* и в условиях *ex vitro*, и в условиях *in vitro* имеют гетеротрофный тип питания, поэтому увеличение ассимиляционных пигментов вероятно связано с изменением условий освещения. При этом нами установлено, что при прививании растений, выращенных в условиях *in vitro*, на зеленые подвои и дальнейшем выращивании их в оранжерее происходит восстановление исходного содержания пигментов, и растения приобретают декоративные качества.

Таким образом, в условиях *in vitro* отмечается увеличение количества ассимиляционных пигментов у нормальных и вариегатных видов. При переносе растений в условия *in vivo* отмечается уменьшение содержания пигментов, что связано с изменением световых условий.

В заключение следует отметить, что у растений *Austrocylindropuntia subulata*, размножаемых в культуре *in vitro*, отмечен САМ тип фотосинтеза, что весьма важно для формирования нормального габитуса данного вида. Пластичность САМ фотосинтеза позволяет адаптироваться растениям к изменяющимся условиям при переносе их *in vitro*. Успешной адаптации растений к условиям *in vivo* способствует лабильность пигментной системы *Austrocylindropuntia subulata* и *Chamaecereus silvestrii*.

В экспериментах установлено увеличение ассимиляционных пигментов при культивировании растений *Austrocylindropuntia subulata* и *Chamaecereus silvestrii* в условиях *in vitro*. Отмечена способность растений *Chamaecereus silvestrii*, полученных в культуре *in vitro*, восстанавливать содержание пигментов, характерное для материнского растения, указывает на генетическую стабильность клонов, что представляется весьма важным для размножения ценных декоративных форм представителей сем. *Cactaceae*.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Hunt, D. CITES. *Cactaceae* Checklist. / D. Hunt // U. K. Royal Botanic Gardens Kew and International Organization for Succulent Plant Study. – 1999. – 315 с.
2. Patten, D. Carbon dioxide exchange patterns of cacti from different environments / D. Patten, B. Dinger // Ecology. – 1969. – Vol. 50. – P. 536-542.
3. Guadalupe, M. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism / M. Guadalupe, S. Humberto, B. Ralph // Scientia Horticulturae. – 1999. – Vol. 81. – P. 71-87.
4. Dodd, A.N. Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic / A.N. Dodd, A.M. Borland, R.P. Haslam // Journal of Experimental Botany. – 2002. – Vol. 53. – P. 569-580.
5. Rayder, L. Carbon Metabolism in Two Species of *Pereskia* (*Cactaceae*) / L. Rayder, I.P. Ting // Plant Physiol. – 1981. – Vol. 68. – P. 139-142.
6. Шульгин И.А. Расчет содержания пигментов с помощью номограмм / И.А. Шульгин, А.А. Ничипорович // Хлорофилл: сб. ст. / А.А. Шлык. – Мн., 1974. – С. 127-136.