

УДК 631.524/:535 + 630*176.322.6

ИЗУЧЕНИЕ РОСТРЕГУЛИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В ПОБЕГАХ, ИСХОДНЫХ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*, ДЕРЕВЬЕВ ДУБА КОЛОННОВИДНОГО И ЧЕРЕШЧАТОГО

¹Самсонова А.Е., ²Землянухина О.А., ³Карпеченко К.А., ³Калаев В.Н., ³Попов В.Н.¹ФГУП «Научно-исследовательский институт лесной генетики и селекции»,

Воронеж, e-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru;

²ВНИИ сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова,

Рамонь Воронежской обл., e-mail: oz54@mail.ru;

³ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж, e-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Проведено определение эндогенных регуляторов роста индольной (ауксины) и фенольной (ингибиторы роста) природы в побегах, исходных для культивирования *in vitro*, деревьев дуба черешчатого и колонновидного. Выявлены существенные различия между ними в динамике содержания и балансе рострегулирующих веществ. Физиолого-биохимические процессы (образование и распределение рострегулирующих веществ, их динамика), обуславливающие ростовую деятельность растений в годичном цикле роста и развития, у дуба колонновидного начинаются раньше, чем у дуба черешчатого. Для дуба колонновидного характерен более высокий уровень и удельный вес ауксинов в побегах первого прироста, для дуба черешчатого – в побегах второго, что может в определённой степени свидетельствовать о разной потенциальной способности их к ризогенезу при культивировании *in vitro*. Кроме того, клоны дуба черешчатого и колонновидного различаются между собой не только по количественному содержанию, но и по качественному составу рострегулирующих веществ. Высказано предположение, что для микроклонального размножения дуба колонновидного более целесообразно использовать побеги первого прироста, дуба черешчатого – второго.

Ключевые слова: дуб черешчатый, дуб колонновидный, исходные деревья, стимуляторы, ингибиторы, ауксины, рострегулирующие вещества

THE RESEARCH IN TO GROWTH REGULATING SUBSTANCES REQUIRING TO QUERCUS ROBUR L. AND Q. ROBUR VAR PYRAMIDALIS IN VITRO CULTIVATION

¹Samsonova A.E., ²Zemlianukhina O.A., ³Karpechenko K.A., ³Kalaev V.N., ³Popov V.N.¹Research Institute of Forest Genetics and Breeding, Voronezh, e-mail: leo-silva@rambler.ru;²AllRussia Research Institute of sugar sweet and sugar, Voronezh region, Ramon, e-mail: oz54@mail.ru;³Voronezh State University, Voronezh, e-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Determination of indole (auxine) and phenolic (growth inhibitors) endogenous growth regulators in initial to *in vitro* cultivation pedunculate oak and pedunculate oak var *pyramidalis* shoots was carried out. Precise differences between them during the process of growth regulating substances content and balance were revealed. Physiology-biochemical processes (growth regulating substances formation and their transformation) which cause plant growth activities in yearly growth cycle, and begin in column-like trees somewhat earlier than at *Quercus robur* L. A higher auxine level is noticed in column-like oak primary shoot growth, and the same phenomenon is noticed for pedunculate tree but in the secondary shoot growth. This may be a manifestation of the different in their rhizogenesis potential ability during *in vitro* cultivation. Furthermore, pedunculate and column-like oak clones differ from each other not only in the quantity but also in the quality of their growth regulating substances. It seems likely that for micropropagation it is more reasonable to use primary shoot growth of column-like oaks and secondary shoot growth of pedunculate oaks.

Keywords: pedunculate oak, column-like oak, stimulators, inhibitors, auxines, growth regulating substances, micropropagation

В процессе укоренения черенков (эксплантов) древесных растений большое значение наряду с другими факторами имеют: возрастное состояние, темпы развития маточного (исходного) растения и физиолого-биохимические особенности побегов, с которых берут черенок (эксплант) [4].

Известно, что органогенез в культуре тканей и клеток управляется с помощью определенных сочетаний фитогормонов (в том числе ауксинов и фенольных соединений) [1,7-8]. Рострегулирующие вещества играют важную роль в становлении организованной многоклеточной структуры растений, возникновении и развитии органов,

они обуславливают дифференциальное выражение признака в фенотипе [2, 4]. Под их контролем находятся физиологические процессы и генетические программы, отвечающие за деление, растяжение клеток, дифференциацию побегов, корней и т.д.

Существует мнение, что изучение генетического контроля дифференцировки растений связано с идентификацией и характеристикой генов, обуславливающих фитогормональный статус [5]. Важным компонентом упорядочения, согласования и объединения структур и функций в целостном организме растений является индолилуксусная кислота (ИУК). Индолил-

уксусная кислота участвует в индукции и регуляции деления, растяжения, дифференциации, поляризации и питания клеток, в формировании базально-апикального рисунка в раннем эмбриогенезе, формировании корневых волосков, росте гипокотыля, тропизме, формировании листьев [1, 4, 6]. По мнению многих исследователей в процесс поддержания ауксинового гомеостаза вовлечено множество генов, что указывает на значимость этого гормона в развитии растений [5].

Большое значение в жизни растений имеют фенольные соединения, принимающие участие в окислительном метаболизме растений (в качестве доноров и акцепторов водорода), в биосинтезе индолилуксусной кислоты и в окисляющих её системах [9]. Некоторые из полифенолов и родственных им соединений – ингибиторы прорастания семян и роста растений.

Целью исследования являлось изучение физиолого-биохимических особенностей исходных для культивирования *in vitro* побегов деревьев дуба колонновидного (пирамидального) и черешчатого. В задачу исследований входило определение свободной (физиологически активной) фракции эндогенных регуляторов роста индольной (ауксины) и фенольной (ингибиторы роста) природы.

Материалы и методы исследования

Объектом исследований являлись клоны дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) (прививка 1978 г.) и колонновидного (*Quercus robur* var. *pyramidales* Gmelin) (прививка 1965 г.). Были исследованы три дерева (раметы): одно дерева дуба черешчатого (поздняя форма, дерево № 56, произрастающее в Семилукском питомнике (Воронежская область) на лесосеменной плантации, созданной Ю.П. Ефимовым в 1976 г.) и два дерева дуба колонновидного (поздняя форма, прививка проведена В.К. Ширниным), произрастающих в г. Воронеже (дерево № 1 – Кольцовский сквер, дерево № 2 – на ул. Карла Маркса).

Рострегулирующие вещества определяли в побегах текущего года. Для анализа использовали первый и второй приросты. Пробы отобраны в периоды: интенсивного роста в длину (24.05.2011 и 16.06.2011 г.), замедления линейного роста (14.07.2011 г.), интенсивного роста в ширину и накопления сухой массы растения (28.08.2011 г.).

Определение эндогенных регуляторов роста проводили биологическим методом (по росту отрезков coleoptiles пшеницы сорта «Мионовская 808» в длину) с предварительной хроматографической разгонкой эфирных экстрактов [3]. При разгонке хроматограмм использовали щелочную смесь н-бутиловый спирт:аммиак:вода в соотношении 100:3:18. В качестве биотеста служили coleoptiles пшеницы. Определяли свободную (физиологически активную) фракцию рострегулирующих веществ (ауксинов и ингибиторов) в материале (побеги дуба текущего года), фиксированном в парах кипящей смеси этанол:вода (1:1).

Результаты исследования и их обсуждение

Определение эндогенных регуляторов роста индольной (ауксины) и фенольной (ингибиторы роста) природы у клонов дуба черешчатого и колонновидного позволило выявить между ними существенные различия в содержании, динамике и балансе рострегулирующих веществ.

У обеих рамет (деревьев) в период интенсивных ростовых процессов в длину и по диаметру (май, июнь, август) выше уровень стимуляторов роста и их удельный вес (соотношение стимуляторы/ингибиторы) в общем балансе рострегулирующих веществ (табл. 1, рис. 1). У дуба черешчатого в этих побегах во все сроки исследования (май, июнь, июль, август) выше уровень и удельный вес ингибиторов роста.

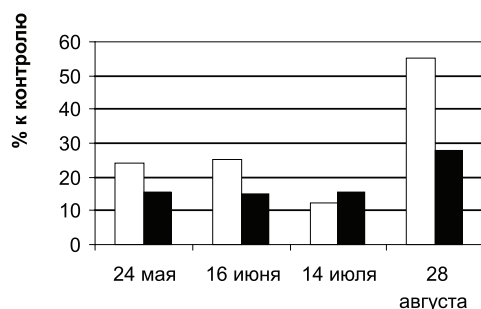
Таблица 1

Соотношение стимуляторы/ингибиторы в общем балансе рострегулирующих веществ исходных деревьев (рамет) дуба колонновидного и черешчатого (в 2011 г.)

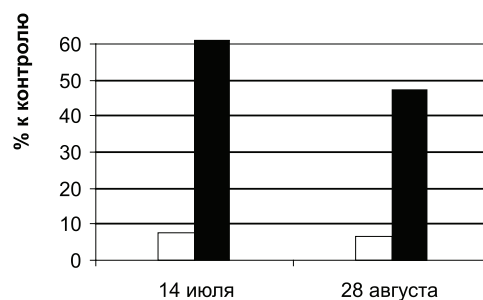
Дата взятия образца	Соотношение стимуляторы/ингибиторы	
	I-й прирост	II-й прирост
	Дуб колонновидный, Кольцовский сквер	
24.05	1,56 ± 0,05	–
16.06	1,66 ± 0,05	–
14.07	0,79 ± 0,02	0,12 ± 0,004
28.08	1,96 ± 0,06	0,14 ± 0,004
	Дуб колонновидный, улица Карла Маркса	
24.05	3,40 ± 0,10	–
16.06	1,31 ± 0,04	–
14.07	0,14 ± 0,004	0,42 ± 0,01
28.08	1,85 ± 0,06	0,83 ± 0,02
	Дуб черешчатый, Семилуки	
24.05	0,08 ± 0,002	–
16.06	0,08 ± 0,002	–
14.07	0,30 ± 0,009	10,5 ± 0,32
28.08	0,32 ± 0,009	1,91 ± 0,06

Суммарное содержание ауксинов и ингибиторов роста (табл. 2) за исследованный отрезок онтогенеза (24.05–28.06) чётко отражает отмеченную выше закономерность: побеги дуба колонновидного первого прироста преобладают по содержанию (в 3,3 раза) и удельному весу (соотношение стимуляторы/ингибиторы в 7,9–9,8 раз) ауксинов; дуба черешчатого – по содержанию (в 2,4–5,4 раза) и удельному весу (в 2,3–2,8 раз) ингибиторов роста.

Дуб колонновидный, Кольцовский сквер

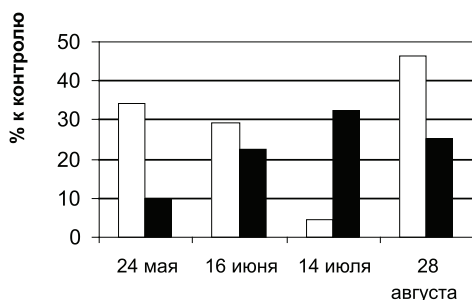


I прирост

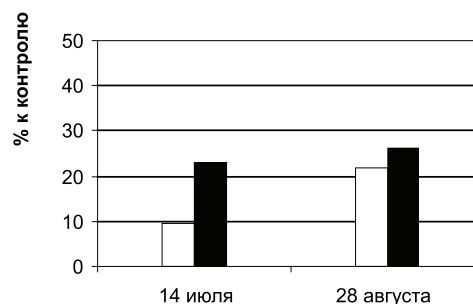


II прирост

Дуб колонновидный, ул. Карла Маркса

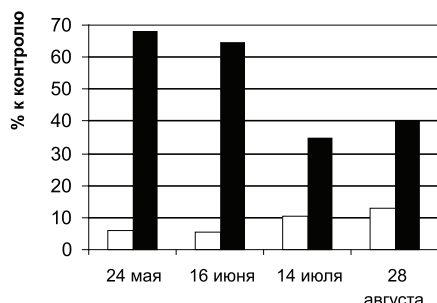


I прирост

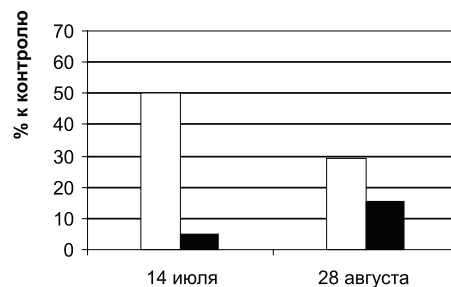


II прирост

Дуб черешчатый, Семилукский питомник



I прирост



II прирост

Рис. 1. Суммарное содержание рострегулирующих веществ в побегах исходных деревьев (рамет) дуба колонновидного и черешчатого, 2011 г.: белые столбики – стимуляторы, черные – ингибиторы

У побегов второго прироста наблюдается совершенно иная картина (табл. 1, 2, рис. 1): уровень стимуляторов и их удельный вес в общем балансе рострегулирующих веществ в побегах второго прироста выше у дуба черешчатого, а более высокий уровень и удельный вес ингибиторов отмечен у обоих рамет дуба колонновидного.

Клоны различаются по динамике содержания фитогормонов (рис. 2). Содержание ауксинов и их удельный вес в побегах первого прироста дуба колонновидного к моменту снижения интенсивности ростовых процессов в длину (июнь) падает и вновь резко возрастает к концу августа (период интенсивного роста по диаметру и накопле-

ния сухой массы). Направленность динамики содержания ауксинов обоих рамет практически идентична.

Динамика ингибиторов в побегах первого прироста дерева, растущего в Кольцовском сквере, аналогична в целом динамике их у дерева, растущего на улице Карла Маркса. Содержание ростингибирующих веществ резко возрастает к концу августа у первого дерева и уже к июлю – у второго, оставаясь практически на том же уровне в августе.

Динамика содержания регуляторов роста дуба черешчатого резко отличается от таковой дуба колонновидного. Содержание стимуляторов и их удельный вес в побегах первого прироста дуба черешчатого,

находясь практически на одном уровне в мае и июне, возрастает к июлю и августу. Следует особо отметить низкий уровень и удельный вес ауксинов в побегах первого прироста, наблюдаемый на протяжении всего периода исследований (май – август),

у этой формы дуба по сравнению с дубом колонновидным.

Уровень ингибиторов роста в мае и июне в побегах первого прироста дуба черешчатого представлен величинами, значительно превышающими уровень ауксинов.

Таблица 2

Суммарное содержание (средние данные) эндогенных рострегулирующих веществ в побегах дуба колонновидного и черешчатого за исследуемый отрезок онтогенеза (24.05–28.02.2011 г.) (% к контролю).

Место произрастания рамет	Стимуляторы		Ингибиторы		Соотношение стимуляторы/ингибиторы	
	I-й прирост	II-й прирост	I-й прирост	II-й прирост	I-й прирост	II-й прирост
<i>Дуб колонновидный</i>						
Кольцовский сквер, Воронеж	29,05 ± 0,87	7,00 ± 0,21	18,52 ± 0,56	54,20 ± 1,62	1,57 ± 0,05	0,13 ± 0,004
Улица Карла Маркса, Воронеж	28,56 ± 0,86	15,68 ± 0,47	22,43 ± 0,67	24,63 ± 0,74	1,27 ± 0,04	0,64 ± 0,02
<i>Дуб черешчатый</i>						
Семилукский питомник, Воронежская область	8,59 ± 0,26	39,80 ± 1,19	51,89 ± 1,56	10,07 ± 0,30	0,16 ± 0,005	3,96 ± 0,12

К июлю в отличие от дуба колонновидного содержание их резко снижается и снова возрастает в августе, оставаясь на протяжении всего периода исследований более высоким, чем уровень стимуляторов роста.

Определение фитогормонов в побегах второго прироста проведено в июле и августе (рис. 2). Выявлены изменения в их содержании во времени (от июля к августу) у обеих форм дуба. Как показывают данные, у побегов второго прироста разных рамет дуба колонновидного наблюдаются определённые различия в динамике рострегулирующих веществ. У дерева, растущего в Кольцовском сквере, количество стимуляторов роста остаётся в июле и августе на одном уровне и оно значительно ниже в оба срока, чем содержание ингибиторов, уровень которых к августу хотя и несколько снижается. У дерева, произрастающего на улице Карла Маркса, к августу повышается содержание и ингибиторов, и стимуляторов, но тем не менее уровень последних в оба срока также ниже, чем уровень ингибиторов роста.

У дуба черешчатого наблюдается противоположная картина: уровень стимуляторов и их удельный вес к августу падает, а ингибиторов возрастает. Причем, несмотря на то, что концентрация ауксинов снизилась к августу, их содержание в отличие от дуба колонновидного значительно превышает в оба периода уровень ингибиторов роста.

Полученные данные показывают, что физиолого-биохимические процессы, обуславливающие ростовую деятельность растения (в частности, образование и распределение ауксинов и ингибиторов) и выход его из состояния покоя, у дуба колонновидного начинаются несколько раньше, чем у дуба черешчатого.

Более высокий уровень и удельный вес рострегулирующих веществ, отмеченный выше в побегах первого прироста дуба колонновидного, может свидетельствовать о более высоком потенциале корнеобразования при культивировании их *in vitro*, в отличие от побегов второго прироста.

Высокий уровень и удельный вес ауксинов в общем балансе рострегулирующих веществ в побегах второго прироста дуба черешчатого свидетельствует о большей потенциальной способности к ризогенезу этих побегов.

Разгонка эфирных экстрактов рострегулирующих веществ, полученных из побегов клонов дуба колонновидного и черешчатого, на хроматограммах в смеси растворителей (н-бутиловый спирт:аммиак:вода) и просмотр их позволили отметить следующее.

Распределение зон стимулирования и ингибирования на хроматограммах у исследованных клонов различно. Для побегов первого прироста дуба колонновидного в целом характерен не только более высокий уровень, но и более широкий диапазон

стимулирования; для дуба черешчатого – более широкий диапазон ингибирования. Во все сроки исследования у дуба черешча-

того в этих побегах ингибиторы распределены практически почти по всему фронту хроматограмм.

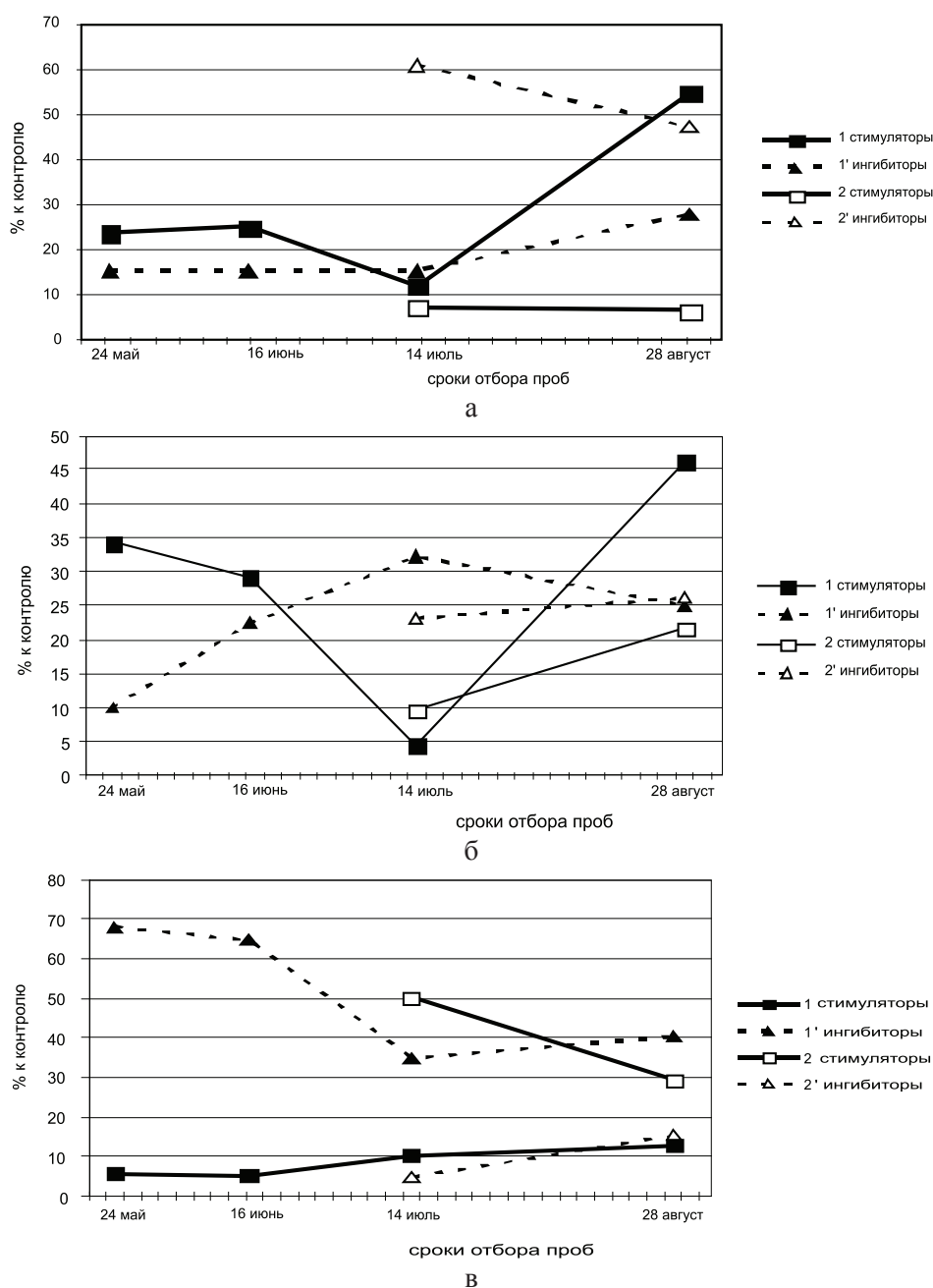


Рис. 2. Динамика содержания рострегулирующих веществ в побегах исходных деревьев (рамет) дуба колонновидного и черешчатого, 2011 г.:

а – дуб колонновидный, Кольцовский сквер; б – дуб колонновидный, ул. Карла Маркса; в – дуб черешчатый, Семилукский питомник; 1 – I прирост, 2 – II прирост

У дуба колонновидного ростингибирующий эффект в период интенсивного роста в длину и по диаметру (май, июнь, август) проявляется обычно в двух-трёх зонах. И только в июле (период затухания, замедления роста побегов в длину) и здесь инги-

биторы роста распределены практически по всему фронту хроматограмм.

В побегах второго прироста в оба срока исследований, наоборот, шире диапазон ингибирования у дуба колонновидного, а у дуба черешчатого – диапазон стимулиро-

вания. По всей видимости, клоны дуба черешчатого и колонновидного различаются между собой не только по количественному содержанию, но и по качественному составу рострегулирующих веществ.

Заключение

В результате проведенных исследований установлены различия в динамике и балансе эндогенных рострегулирующих веществ индольной (ауксины) и фенольной (ингибиторы роста) природы между клонами дуба черешчатого и колонновидного (пирамидального).

Физиолого-биохимические процессы (образование и распределение рострегулирующих веществ, их динамика), обуславливающие наряду с другими факторами ростовую деятельность растений в годичном цикле роста и его развития, у дуба колонновидного начинаются несколько раньше, чем у дуба черешчатого. Для дуба колонновидного характерен более высокий уровень и удельный вес ауксинов в побегах первого прироста, для дуба черешчатого – в побегах второго, что может в определённой степени свидетельствовать о разной потенциальной способности их к ризогенезу при культивировании *in vitro*. Кроме того, клоны дуба черешчатого и колонновидного различаются, по всей видимости, между собой не только по количественному содержанию, но и по качественному составу рострегулирующих веществ. Можно предположить, что при микроклональном размножении дуба колонновидного более целесообразно использовать побеги первого прироста, а дуба черешчатого – второго.

Список литературы

1. Гамбург К.З. Ауксины в культуре тканей и клеток растений. – Новосибирск: Наука, 1990. – 150 с.
2. Демкив О.П. Общие аспекты морфогенеза и его специфика у растений различной сложности // Рост растений и дифференцировка. – М.: Наука, 1981. – С. 206–225.
3. Определение биологической активности свободных ауксинов и ингибиторов роста в растительном материале / В.И. Кефели, Р.Х. Турецкая, Э.М. Коф, П.В. Власов // Методы определения фитогормонов, ингибиторов роста, дефолиантов и гербицидов. – М.: Наука, 1973. – С. 20–44.
4. Лихолат Т.В. Регуляторы роста древесных растений. – М.: Лесная промышленность, 1983. – 240 с.
5. Генетика развития растений / Л.А. Лутова, Н.А. Проворов, О.Н. Тиходеев, И.А. Тихонович, Л.Т. Ходжайова, С.О. Шишкова; под ред. С.Г. Инге-Вехтомова. СПб.: Наука, 2000. – 539 с.
6. Полевой В.В. Роль ауксина в системах регуляции у растений. – Л.: Наука, 1986. – 80 с.
7. Эндогенные регуляторы роста и укореняемость различных генотипов карельской берёзы при микроклональном размножении / А.Е. Самсонова, О.С. Машкина, Т.М. Табацкая, Ю.Н. Исаков // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. – Воронеж, 2001 – Вып. 3. – С. 97–101.
8. Физиолого-биохимические аспекты морфогенеза у контрастных по стабильности проявления признака разрезности берёзы повислой в процессе микрокло-

нального размножения / А.Е. Самсонова, Т.М. Табацкая, О.С. Машкина, Ю.Н. Исаков // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. – Воронеж, 2003. – Вып. 5. – С. 134–148.

9. Сарпуу Л.П., Кефели В.И. Фенольные соединения и рост растений // Фенольные соединения и их биологическая функция. – М., 1969. – С. 129–135.

References

1. Gamburg K.Z. Aukliny v culture tkaney i kletok rasteniy (Auxins in tissue culture and plant cells). Novosibirsk: Nauka, 1990. 150 p.
2. Demkiv O.P. Obschie aspekty morfogeneza i ego spetsifika u rasteniy razlichnoy slozhnosti. Rost rasteniy i differentsirovka (General aspects of morphogenesis and its specificity in plants of varying difficulty. Plant Growth and Differentiation). Moscow, Nauka, 1981, pp. 206–225.
3. Kefeli V.I., Turetskaya R.Kh., Kof E.M., Vlasov P.V. Opredelenie biologicheskoy aktivnosti svobodnykh auksinov i ingibitorov rosta v rastitelnom materiale. Metody opredeleniya fitogormonov, ingibitorov rosta, defoliantov i gerbitsidov (Bioassay free auxins and growth inhibitors in plant material. Methods of plant hormones, growth inhibitors, defoliant and herbicides). Moscow, Nauka, 1973, pp. 20–44.
4. Likholat T.V. Regulatory rosta drevesnykh rasteniy (Growth regulators of woody plants). Moscow, Lesnaya promyshlennost, 1983, 240 p.
5. Lutova L.A. Genetika razvitiya rasteniy. Pod red. S.G. Inge-Vechtomova (The genetics of plant development. Ed. S.G. Inge-Vechtomova). Sankt-Petersburg, Nauka, 2000, 539 p.
6. Polevoy V.V. Rol auklina v sistemakh regulatsii u rasteniy (The role of auxin in the regulation of plant). Leningrad, Nauka, 1986, 80 p.
7. Samsonova A.E., Mashkina O.S., Tabatskaya T.M., Isakov Yu.N. Endogennye regulatory rosta i ukorenyaemost raslichnykh genotipov karelskoy breezy pri mikroklonalnom razmnzhenii. Organizatsia i regulatsia fiziologo-biokhimicheskikh protsessov (Endogenous growth regulators and rooting of different genotypes of birch wood with micropropagation. Organization and regulation of physiological and biochemical processes.). Voronezh, 2001, Issue 3, pp. 97–101.
8. Samsonova A.E., Tabatskaya T.M., Mashkina O.S., Isakov Yu.N. Fiziologo-biokhimicheskie aspekty morfogeneza u kontrastnykh po stabilnosti proyavleniya priznaka razreznolistnosti breezy povisloy v protsesse mikroklonalnogo razmnzheniya. Organizatsia i regulatsia fiziologo-biokhimicheskikh protsessov (Physiological and biochemical aspects of morphogenesis in contrast to the stability of symptoms characteristic razreznolistnosti birch during micropropagation. Organization and regulation of physiological and biochemical processes). Voronezh, 2003, Issue 5, pp. 134–148.
9. Sarapuu L.P., Kefeli V.I. Fenolnye soedineniya i rost rasteniy. Fenolnye soedineniya i ikh biologicheskaya funktsiya (Phenolic compounds and plant growth. Phenolic compounds and their biological function). Moscow, 1969, pp. 129–135.

Рецензенты:

Свистова И.Д., д.б.н., профессор кафедры биологии растений и животных естественно-географического факультета ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный педагогический университет», г. Воронеж;

Мелькумова Е.А., д.б.н., профессор кафедры ботаники, защиты растений, биохимии, микробиологии ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», г. Воронеж.

Работа поступила в редакцию 08.02.2013.