

Вывод

Комплексное применение 1 мг/л 2,4-Д и янтарной кислоты в концентрациях от 5 до 25 мг/л, как дешевого стимулятора деления клеток в культуре растительных тканей, можно рекомендовать для использования в технологиях *in vitro*.

Литература

1. Бутенко Р.Р. Культура изолированных клеток и тканей в селекции растений / Р.Р. Бутенко, Г.И. Тихонович и др. / Основы сельскохозяйственной биотехнологии, 1990.— С. 162–165.
2. Кучеренко Л.А. Каллусогенез, выход и характеристика регенерирующих растений риса в культуре тканей в зависимости от гормонального состава индукционной среды // Доклад РАСХН, 1993.— №4.— С. 3–6.
3. Круглова Н.Н. Морфогенетический потенциал спорогенных клеток пыльника злаков / Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина, О.А. Сельдиминова / 2008.— С. 21.
4. Либберт Э. Физиология растений // М.: Мир, 1976.— С. 353–370.
5. Шевелуха В.С. Морфогенез в каллусных тканях // Сельскохозяйственная биотехнология, 1996.— С. 29–35.
6. Murashige I. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / I. Murashige, F. Skoog // Plant Physiol.— 1962.— V.15.— P. 473–479.
7. Чупахина Г.Н. Янтарная кислота как результат ростовых процессов и биосинтеза аскорбиновой кислоты в растениях ячменя / Г.Н. Чупахина, А.Ю. Романчук / Тез. докл. конф. “Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях”, МСХА, 2001.— С. 73.

Резюме

Изучалось влияние комплексного использования 2,4-Д и янтарной кислоты на процессы каллусообразования и регенерации проростков из пыльников риса. Экспериментально установлено его положительное действие на процессы каллусогенеза и долгое сохранение регенерационных способностей у каллусов.

Influence of complex using of 2,4-D and succinic acid on processes of callus formation and regeneration of seedlings from rice anther was studied. Its positive effect on processes of callusogenesis and long storage of regenerative abilities of calluses was experimentally identified.

САМСОНОВА А.Е.¹, МАШКИНА О.С.^{1,2}, ТАБАЦКАЯ Т.М.¹, ИСАКОВ Ю.Н.¹

¹ФГУП НИИ лесной генетики и селекции

Россия, 394087, Воронеж, ул. Ломоносова, 105, e-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

²Воронежский государственный университет,

Россия, 394006, Университетская площадь, д.1, e-mail:

olga_mashkina@yahoo.com

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ БЕРЕЗЫ

Взаимодействие всех частей растительного организма на внутриклеточном и организменном уровнях осуществляется с участием метаболической, генной, гормональной, электрофизиологической и трофической систем регу-

ляции. Основной системой управления являются гормоны. Образование и взаимодействие эндогенных регуляторов роста (фитогормонов) — одна из важных составных частей того комплекса физиолого-биохимических изменений, который определяет ход процесса развития растений. Рострегулирующие вещества играют ключевую роль в становлении организованной многоклеточной структуры растений. Они обеспечивают дифференциальное выражение признака в фенотипе. Взаимодействуя (прямо или опосредовано) с геномом клетки, фитогормоны могут исполнять роль медиаторов (посредников) в развитии. Под их контролем находятся физиологические и генетические программы, отвечающие за деление, растяжение клеток, дифференциацию побегов, корней и т.д. [1, 2]. Определенный фитогормон [3] влияет на экспрессию определенной генетической программы, в соответствии с которой, наряду с белками, обеспечивающими функциональную активность клеток активизируются вещества, воспринимающие сигнал (рецепторы), необходимые для активации других фитогормонов [3].

Установлено, что некоторые фитогормоны, влияя на экспрессию генов способны вызывать появление качественно новых белков. Существует мнение, что изучение генетического контроля дифференцировки растений связано с идентификацией и характеристикой генов, обуславливающих фитогормональный статус. Нарушение дифференцировки (в частности, образование опухоли) несут мутации в генах, контролирующих систему эндогенных регуляторов [3, 4]. Важным компонентом системы интеграции у растения является индолилуксусная кислота (ИУК), которая, полярно перемещаясь от верхушки побега к кончику корня, участвует в индукции и регуляции деления, растяжения, дифференциации, поляризации, питания клеток, в формировании базально-апикального рисунка в раннем эмбриогенезе, в формировании корневых волосков, росте гипокотыля, тропизме, индукции и формировании листьев [1, 2, 5]. По мнению многих исследователей [3], в процессе поддержания ауксинового гомеостаза вовлечено множество генов, что указывает на значимость этого гормона в развитии растений.

Немаловажное значение имеют и фенольные соединения. Они принимают участие в окислительном метаболизме растений в качестве доноров и активаторов водорода, в биосинтезе индолилуксусной кислоты и в окисляющих ее системах. Производные фенольных соединений фигурируют в качестве переносчиков в электронно-транспортной цепи. Некоторые из полифенолов и родственных им соединений — ингибиторы прорастания семян и роста растений [1, 6].

Целью наших исследований явилось изучение физиолого-биохимических аспектов культивирования *in vitro* ценных генотипов различных форм березы. В задачу исследований входило определение эндогенных рострегулирующих веществ индольной (ауксины) и фенольной (ингибиторы роста) природы.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись: 1. Исходные деревья березы повислой (форма далекарлийская) и их микроразмноженные клоны, контрастные по

стабильности проявления признака разрезнолистности при культивировании в условиях *in vitro*: а) сохраняющие в процессе микроразмножения признак “разрезнолистности” и б) ревертирующие к нормальному фенотипу; 2. Исходные деревья карельской березы (узорчатая форма) и их микроразмноженные клоны, контрастные по способности к укоренению в условиях *in vitro*: а) трудноразмножаемые, формирующие вместо корней на протяжении нескольких лет (12 лет) культивирования *in vitro* каллусоподобное образование; б) легкоукореняемые, формирующие *in vitro* хорошо развитые корни и побеги с нормальным ростом и развитием.

Определение свободной (физиологически активной) фракции эндогенных регуляторов роста проводили биологическим методом (по росту отрезков coleoptилей пшеницы в длину) с предварительной хроматографической разгонкой эфирных экстрактов [7]. При разгонке хроматограмм использовали щелочную смесь *n*-бутиловый спирт : аммиак : вода в соотношении 100:3:18. В качестве биотеста служили coleoptили пшеницы “Мионовская 808”. Определение ауксинов и ингибиторов проводили в материале (побеги, почки, листья, корни, каллус), фиксированном в парах кипящей смеси этанол : вода (1:1). Пробы для анализа у исходных для микрклонального размножения деревьев отбирали в период вынужденного покоя и в момент введения их эксплантов (узловых сегментов с одной пазушной почкой) в культуру. У регенерантов использовали для анализа 30, 40 и 50-дневные растения.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований выявлены различия в содержании и балансе рострегулирующих веществ индольной и фенольной природы у двух размноженных *in vitro* клонов березы повислой разрезнолистной формы, контрастных по стабильности проявления признака “разрезнолистности”. Отмечена большая лабильность баланса фенольно-индольного комплекса у клона, ревертирующего в процессе микрклонального размножения к норме, в отличие от клона со стабильным проявлением признака разрезнолистности. Это свидетельствует о более глубоких и динамичных изменениях регуляторных функций рострегулирующих веществ и связанных с ними ростовых и формообразовательных процессов у клона, ревертирующего к норме. Установлено, что стабильность проявления признака “разрезнолистности” березы повислой в культуре *in vitro* во многом зависит от особенностей динамики содержания и баланса рострегулирующих веществ фенольной и, особенно, индольной (ауксины) природы исходных деревьев. По мере подготовки растений к культивированию более резко возрастают содержание и удельный вес ауксинов (в 7,8 раз — содержание, в 5–8 раз — удельный вес) у “ревертанта”, чем у дерева, стабильно сохраняющего признак “разрезнолистности” (в 1,65 и в 2,02 соответственно).

В процессе развития растений важным остается вопрос о детерминации дифференцировки. Как правило, основное разделение на органы и ткани происходит практически сразу и сохраняется при нормальном развитии растений вплоть до его естественной гибели, что говорит в пользу существования

детерминации. Однако, как показали наши исследования, имеются и исключения из этого правила. Под влиянием стресса, например, введения экспланта в культуру *in vitro* и микроклонального размножения (особенно через каллусные культуры), клетки способны возвращаться в недифференцированное состояние и повторно проводить дифференцировку в направлении, кардинально отличающемся от первичного. При всем разнообразии регуляторных систем, ответственных за развитие, важную роль в дифференцировке растений играют фитогормоны, в частности, ауксины и ингибиторы роста фенольной природы. Особенно наглядно это демонстрируют эксперименты в культуре изолированных органов и тканей.

Определение эндогенных регуляторов роста у микроразмноженных клонов карельской березы с нормальным побегообразованием и ризогенезом и у соматоклонального варианта, образующего вместо корней каллусоподобную структуру (“каллус”) позволило выявить существенные различия в динамике и балансе рострегулирующих веществ. Отмечено резкое повышение содержания ингибиторов фенольной природы и исчезновение ауксинов в побегах регенерантов мутантного клона по мере увеличения времени культивирования и сдвиг баланса регуляторов роста в “каллусе в сторону большего образования ауксинов.

Для корней регенерантов “нормального” клона характерен более широкий диапазон (4–6 зон против 2) ингибирования на хроматограммах, а для “каллуса” регенерантов мутантного клона более широкий диапазон (8 зон против 6) стимулирования. В побегах регенерантов мутантного клона содержание ауксинов, очевидно, не достигает той пороговой концентрации, которая необходима для появления корней, а наличие большого количества ингибиторов в почках, в свою очередь, тормозит ризогенез. Кроме того, больший удельный вес ауксинов в “каллусе” регенерантов мутантного клона одновременно с относительно более низким в нем уровнем ингибиторов, стимулируя интенсивный рост каллусной ткани, в целом, препятствует образованию корневых зачатков, т.к. для их закладки и роста тканей вообще и корней, в частности, необходимы различные концентрации и удельный вес ауксинов в общем балансе рострегулирующих веществ.

У исходных для микроклонального размножения деревьев карельской березы, контрастных по способности к укоренению в условиях *in vitro* (хорошо укореняющиеся, плохо или совсем не укореняющиеся) выявлены существенные различия между ними по индольно-фенольному комплексу веществ. Направленность баланса эндогенных регуляторов роста в сторону большего (в 2–3 раза) образования ауксинов и меньшего (в 4–5 раз) — ингибиторов четко прослеживается у большей части исследованных трудноразмножаемых *in vitro* деревьев. Однако, выявленная низкая способность к образованию корней у микропобегов различных деревьев, как показали наши исследования, может быть обусловлена и связана как с высоким (избыток), так и с низким (недостаток) содержанием ауксинов. Для инициации корнеобразования необходимы, по всей видимости, определенная концентрация

и, особенно, определенное соотношение эндогенных регуляторов роста индольной и фенольной природы, носящих индивидуальный характер, присущий тому или иному индивидууму, его органу или его части.

В культуре *in vitro* предшествующая онтогенетическая вариация клеточных популяций у исходных деревьев карельской березы, добавление экзогенных регуляторов роста в питательные среды, стресс (отсутствие регулирующего влияния со стороны целостного организма в результате изоляции экспланта) приводит к снижению органогенного потенциала клеток, нарушению гормонального равновесия в тканях эксплантов, нарушению контроля процесса ризогенеза и формированию аномальных структур (каллусоподобного образования вместо корней) у рамет клона.

Выявленная специфика образования и распределения рострегулирующих веществ у исходных деревьев, обуславливает в определенной степени специфику синтеза и распределения фитогормонов у микроразмноженных клонов, у которых отмечена тенденция к сохранению гормональной ситуации, наблюдаемой у исходных деревьев. Это может, наряду с другими факторами, определять способность клонов к корнеобразованию или определять характер образования корней (например, через апикальную меристему или “каллус”) при культивировании *in vitro*.

Выявлена ярусная изменчивость содержания ауксинов и ингибиторов фенольной природы в побегах трудноразмножаемых в условиях *in vitro* генотипов карельской березы. Направленность баланса фитогормонов в сторону уменьшения содержания ауксинов и увеличения ингибиторов (что коррелирует с гормональной ситуацией легкоукореняемых деревьев) четко прослеживается в побегах верхнего яруса кроны по сравнению со средним и, особенно, нижним ярусами. Показатели соотношения стимуляторы/ингибиторы равны: 0,29 — верхний, 2,36 — средний, 3,20 — нижний ярусы, что, в основном, и обуславливает наблюдаемый в условиях *in vitro* более высокий потенциал их к морфогенезу. В этой связи, при отборе “трудных” для культивирования *in vitro* деревьев ценных генотипов карельской березы необходимо учитывать, с целью повышения эффективности их клонального микроразмножения, ярусную изменчивость в содержании и балансе эндогенных регуляторов роста индольной и фенольной природы, обуславливающих, в конечном итоге, жизненный потенциал регенерантов и играющих, как отмечено выше, существенную роль в регенерации и морфогенезе растений в целом.

Выводы

Изучение эндогенных регуляторов роста у ценных генотипов березы повислой (форма разрезнолистная далекарлийская) и карельской (узорчатая форма), контрастных по стабильности проявления признака “разрезнолистности” и способности к корнеобразованию при культивировании *in vitro* позволило выявить различия в динамике содержания и балансе рострегулирующих веществ индольной (ауксины) и фенольной (ингибиторы роста) природы. На примере древесных показана и подтверждена их роль в

морфогенезе и регенерации растений с нормальным ростом и развитием в условиях *in vitro*.

Литература

1. Лихолат Т.В. Регуляторы роста древесных растений.— М.: Лесная промышленность, 1983.— 240 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. Лутова Л.А., Проворов Н.А., Тиходеев О.Н. и др. Генетика развития растений.— СПб.: Наука, 2000.— 539 с.
4. Лутова Л.А., Бузовкина И.С., Осипова М.А. и др. Коллекция инбредных линий редиса (*Raphanus sativus* var. *Radicula* Pers.) — модель для изучения генетики морфогенеза высших растений / Материалы съезда генетиков и селекционеров, посвященного 200-летию со дня рождения Ч. Дарвина, V съезд ВОГиС, ч. I.— М., 2009.— С. 149.
5. Полевой В.В. Роль ауксина в системах регуляции у растений.— Л.: Наука, 1986.— 80 с.
6. Сарану Л.П., Кефели В.И. Фенольные соединения и рост растений / Фенольные соединения и их биологическая функция.— М., 1969.— С. 129–135.
7. Кефели В.И., Турецкая Р.Х., Коф Э.М., Власов П.В. Определение биологической активности свободных ауксинов и ингибиторов роста в растительном материале / Методы определения фитогормонов, ингибиторов роста, дефолиантов и гербицидов.— М.: Наука, 1973.— С. 20–44.

Резюме

Проведено изучение эндогенных регуляторов роста у ценных генотипов березы повислой (форма разрезнолистная далекарлийская) и карельской (узорчатая форма), контрастных по стабильности проявления признака “разрезнолистности” и способности к корнеобразованию при культивировании *in vitro*. Выявлены различия в динамике содержания и балансе рострегулирующих веществ индольной и фенольной природы. Показана и подтверждена их роль в морфогенезе и регенерации растений с нормальным ростом и развитием в условиях *in vitro*.

Проведено вивчення ендогенних регуляторів росту цінних генотипів берези повислої (форма розрізнолиста далекарлійська) і карельської (узорчата форма), контрастних за стабільністю прояву ознаки “розрізнолистності” та здатності до укорінення при культивуванні *in vitro*. Виявлена різниця в динаміці вмісту і балансі ріст регулюючих речовин індольної та фенольної природи. Показана і підтверджена їх роль в морфогенезі та регенерації рослин з нормальним ростом і розвитком в умовах *in vitro*.

The study of endogenous growth regulators in valuable genotypes of *Betula pendula* ‘dalekarlika’ and Karelian birch (patterned form) was carried out. The birches are contrast as to stability in development of the character of “dissected leaves” and ability for root formation during *in vitro* cultivation. There were revealed some differences in the content dynamics and balance of substances regulating growth of both indole and phenol nature. Their role in morphogenesis and plant regeneration with normal growth and development *in vitro* conditions was shown and verified.

СЕРГЕЕВА Л.Е.¹, МИХАЛЬСКАЯ С.И.,¹ БРОННИКОВА Л.И.,¹
ГАМАЛЕЙ В.И.²

¹Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17; e-mail: Zlenko_lora@ukr.net

²Институт земледелия НААНУ України

Украина, Киевская обл., 08162, пгт Чабаны, ул. Машиностроительная, 2Б

ДЕЙСТВИЕ ОКСИАНИОНОВ ВОЛЬФРАМА И ВАНАДИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ НИТРАТОВ И РОСТ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР СОИ

Ассимиляция нитратов — это фундаментальный процесс, присущий любому растительному организму, включая тех, которые способны усваивать атмосферный азот используя симбиоз с почвенными микроорганизмами. В усвоении нитратов задействованы как системы их поглощения/переноса, так и редукции. Абсорбция NO_3^- осуществляется посредством высокоаффинной транспортной системы (НАТС). Она характеризуется субстратной индуцибельностью, а также является мишенью отрицательного обратного ингибирования внутриклеточными соединениями [11, 12]. Абсорбированные клеткой нитраты метаболизируются ферментами цепи усвоения азота. Так непосредственно NO_3^- является субстратом нитратредуктазы (НР; К.Ф. 1.6.6.1) катализирующей реакцию $\text{N}^{5+} \rightarrow \text{N}^{3+}$. Таким образом, интегральные показатели: рост, продуктивность, качественные параметры зависят от стабильности всего процесса азотного метаболизма.

С другой стороны, установлены факторы, влияющие на отдельные звенья этого процесса. Так хлораты, попадая в клетку вследствие большой химической аналогии с нитратами, становятся субстратом для НР и восстанавливаются в хлорит. Токсичность последнего при достаточно продолжительном воздействии приводит к гибели растения. (Ранее, благодаря такому эффекту, хлораты широко использовались в качестве гербицидов [9]). Анион ClO_3^- переносится с помощью того же транспортера, что и NO_3^- и выступает лишь слабым неконкурентным ингибитором поглощения нитратов [6, 13]. *In vitro* хлорат постоянно используется для исследования активности НР; с его помощью отобрано большое количество мутантных клеточных линий и растений с низкой активностью НР, дефектных по НР — устойчивых к ClO_3^- [5, 8].

Влияют на нитратредуктазную активность и ионы тяжелых металлов (ИТМ), в частности вольфраматы и ванадаты. Так добавление вольфрамата к культуральной среде снижало активность НР и содержание нитратов в листьях сои [10]. Внесение 150 мкМ ванадата в питательный раствор вызвало быстрое снижение активности НР в листьях табака, которая после 24 часов воздействия составляла всего 5% от контроля. Падение активности фермента сопровождалось убылью содержания белка и увеличением уровня нитратов [7].

В наших экспериментах были получены клеточные линии сои (сорта Киевская — 27; КС — 27 №3; КС — 27 №5), устойчивые к летальным для