



УДК 581.195.7

Н. П. Веденичова, академік НАН України К. М. Ситник

### Локалізація і динаміка цитокінінів у різних частинах рослин *Equisetum arvense* L.

*Досліджено розподіл цитокінінів в органах спорофітів і вегетативних пагонів хвоща польового на різних стадіях розвитку. Показано, що ця давня за походженням рослина має багато ознак подібності з вищими судинними рослинами, до яких належать якісний склад цитокінінів, динаміка їх вільних форм протягом онтогенезу, наявність локальних місць синтезу цитокінінів. До специфічних ознак належать підвищений вміст кон'югатів на ранніх стадіях розвитку і різний тип розподілу гормонів вздовж вертикальної осі вегетативних і генеративних пагонів.*

Фітогормони виявлено у представників практично всіх відділів і класів рослин від прокариотичних організмів до вищих. Проте механізми функціонування фітогормональної системи, роль фітогормонів у регуляції росту і розвитку вивчалися головним чином у квіткових, в основному культурних, рослин. Останнім часом увагу дослідників привертає еволюція гормональної системи, її формування в ході історичного розвитку живих організмів [1]. Було здійснено спробу прослідкувати еволюцію абсцизової кислоти (АБК) від продукту вторинного метаболізму до стресового гормону [2]. Проте через недостатню кількість фактичного матеріалу неможливо зробити конкретні висновки і навіть обґрунтовані припущення стосовно становлення і вдосконалення фітогормональних механізмів регуляції в процесі еволюції рослинного світу. Для більш повного розуміння ролі фітогормонів необхідним кроком є з'ясування їх наявності у представників рослин різного систематичного положення, зокрема у спорових, дослідження їх динаміки протягом життєвого циклу, локалізації у вегетативних і генеративних органах, зіставлення цих даних із швидкістю і напрямом ростових процесів.

Найменше досліджено гормональний статус судинних спорових рослин. Інформація про роль фітогормонів у цієї групи організмів обмежується незначною кількістю повідомлень щодо ідентифікації у них ауксинів, гіберелінів, цитокінінів та АБК або щодо впливу цих речовин на розвиток рослин у культурі *in vitro*.

Великий інтерес для вивчення еволюції гормональної системи становлять представники судинних спорових рослин — хвощі, одні з найдавніших рослин, які з'явилися в девоні

---

© Н. П. Веденичова, К. М. Ситник, 2013

палеозойської ери і досягли розквіту в кам'яновугільний період. До початку мезозойської ери майже всі вони вимерли. У наш час відділ хвощеподібних представлений одним родом Хвощ, який нараховує 25 видів. Механізми регуляції ростових процесів цих рослин майже не досліджено, хоча вони, безперечно, заслуговують на увагу, оскільки завдяки їм хвощі виживали протягом 300 млн років.

Важливим компонентом гормонального комплексу рослини є цитокініни — фітогормони, які відіграють істотну регуляторну роль у процесах росту і розвитку органів рослин. Вони стимулюють утворення та активність меристем пагонів, формують атрагуючу здатність тканин, затримують старіння листків, інгібують ріст та галуження кореня, а також беруть участь у регуляції проростання насіння та відповідях на стреси [3].

У літературі існують поодинокі повідомлення стосовно вмісту ендегенних цитокінінів у деяких видів судинних спорових, у тому числі й у хвощів, та про вплив екзогенних регуляторів росту на їх розвиток у культурі *in vitro*. Вперше хімічну ідентифікацію цитокінінів у *Equisetum arvense* L. методом газової хроматографії із селективним іон-моніторингом було здійснено в 1983 р.: було виявлено ізопентеніладенозин та ізопентеніладенін у стерильних та фертильних листках [4]. Пізніше було встановлено, що утворення спорофітних пагонів хвощів *E. arvense* індукується обробкою тканин гаметофіта бензиламінопурином [5]. Додавання бензиладеніну було абсолютно необхідне для ініціації розвитку спорофітних пагонів *E. arvense* L. при культивуванні *in vitro* [6]. Спори *E. arvense*, які культивували на середовищі без додавання цитокінінів, проростали через 2–3 доби після замочування і формували гаметофіт з нормальними вакуольованими клітинами, тоді як внесення в культуральне середовище цитокінінів призводило до утворення глобулярної клітинної маси, яка складалася з маленьких і щільних клітин. Подальше культивування призводило до розвитку спорофіта [7].

Враховуючи повну відсутність даних щодо динаміки цитокінінів в онтогенезі спорових, ми поставили за мету вивчення змін вмісту цитокінінів у вегетативних і генеративних пагонах хвоща польового (*Equisetum arvense* L.) на різних стадіях розвитку.

**Матеріали і методи досліджень.** Об'єктом дослідження були рослини хвоща польового *E. arvense*, які збирали протягом вегетаційних сезонів 2009–2011 рр. на лісових галявинах поблизу с. Підгірці Обухівського району Київської області. Рослини зростали на суглинкових ґрунтах, на добре освітлених ділянках. Температурний режим та вологість у періоди збору матеріалу відповідали середньостатистичним для кліматичної зони українського лісостепу.

Генеративні пагони збирали навесні у квітні. В процесі їх розвитку виділяли дві стадії. На першій стадії спорофіт характеризувався невеликими розмірами (7–9 см), стробіли були закриті, в них відбувався процес формування і дозрівання спор (табл. 1). Довжина міжвузів у цей період становила в середньому 12–15 мм. На другій стадії розмір спорофітних пагонів становив 12–14 см, міжвузля видовжувалися до 35–40 мм, стробіли були напіввідкриті, у них залишалася невелика кількість спор (див. табл. 1). 80% дозрілих спор висипалися назовні. Для аналізів відбирали кореневище, 1–6-й нижні та 7–13-й верхні міжвузля з листковими піхвами, стробіли.

Вегетативні пагони збирали влітку в червні–липні, орієнтуючись на розміри рослин. Відбирали кореневища, 1–6-й нижні та 7–13-й верхні міжвузля з гілками, коли розмір рослин становив 18, 21, 24, 33 та 40 см.

Рослини гомогенізували у 80%-му етиловому спирті. Цитокініни тричі екстрагували в такому ж розчині. З водного залишку після випарювання спирту їх виділяли водонасиченим

бутанолом при рН 8,0, потім додатково очищували за допомогою іонообмінної хроматографії на колонці зі смолою Dowex 50Wx8 (H<sup>+</sup>-форма, елюція аміаком) та тонкошарової хроматографії на пластинах Silufol UV-254 ("Kavalier", Чехія) у системі розчинників ізопропанол:аміак:вода (10 : 1 : 1). Як маркери використовували стандартні розчини зеатину, зеатинрибозиду та зеатин-О-глюкозиду ("Sigma", США). Більш детально методика виділення і очищення цитокінінів описана раніше [8]. Остаточний аналіз якісного і кількісного вмісту цитокінінів проводили методом високоефективної рідинної хроматографії на рідинному хроматографі Agilent 1200 LC з діодно-матричним детектором G 1315 B (США), колонка Eclipse XDB-C 18 2,1x150 мм, розмір частинок 5 мкм. Елюцію здійснювали в системі розчинників метанол : вода (37 : 63). Аналіз і обробку хроматограм виконували з програмним забезпеченням Chem Station, версія В.03.01 у режимі on line.

**Результати досліджень та їх обговорення.** У весняних генеративних пагонах (спорофітах) *E. arvense* виявлено основні цитокініни, наявність яких характерна для більшості вищих рослин, — зеатин, зеатинрибозид, зеатин-О-глюкозид, ізопентеніладенозин та ізопентеніладенін [9]. На початковій стадії розвитку спорофіта, коли стробіли закриті і в них відбувається активне формування спор, відмічено досить високий вміст зеатину і зеатин-О-глюкозиду саме в цьому органі. Високі концентрації зеатину і зеатинрибозиду притаманні також кореневищу і стеблу. Кількість ізопентенільних форм цитокінінів була незначною в усіх досліджених частинах спорофіта на цій стадії розвитку (див. табл. 1).

Коли спорофіти досягають стадії зрілості, відбувається розкриття стробілів і висипання спор, баланс ендогенних цитокінінів дещо змінюється. У стробілах значно зменшується кількість зеатину і зеатин-О-глюкозиду, натомість у 10 разів збільшується концентрація зеатинрибозиду. Як і на початку розвитку, у зрілого спорофіта найбільший сумарний вміст цитокінінів визначено у кореневищі.

На першій стадії розвитку спорофітів можна говорити про наявність акропетального концентраційного градієнта зеатин-О-глюкозиду, тоді як зростання рівня зеатинрибозиду відмічено в базипетальному напрямку. На другій стадії напрямки градієнтів цих цитокінінів змінюються в протилежний бік.

Дослідження молодих літніх вегетативних пагонів *E. arvense* (розмір рослин 18–24 см) показало наявність у них тих самих форм цитокінінів приблизно у таких самих кількостях, що і у весняних спорофітів (табл. 2). Переважали зеатинподібні цитокініни, рівень

Таблиця 1. Вміст цитокінінів у спорофітах *Equisetum arvense* L. на різних етапах розвитку, нг/г сирової речовини

Рослинний матеріал	Z	ZR	iPa	iP	ZG
<b>Стадія I</b>					
Стробіл	83,5 ± 4,0	11,8 ± 0,4	1,7 ± 0,09	10,2 ± 0,5	124,9 ± 5,1
7–13 верхні міжвузля з листковими піхвами	14,5 ± 0,6	72,1 ± 3,7	0	4,1 ± 0,2	66,4 ± 3,3
1–6 нижні міжвузля з листковими піхвами	57,5 ± 2,5	73,9 ± 3,2	0	7,1 ± 0,3	47,8 ± 2,2
Кореневище	63,4 ± 2,9	86,2 ± 3,9	2,2 ± 0,1	11,9 ± 0,4	23,5 ± 1,6
<b>Стадія II</b>					
Стробіл	12,6 ± 0,5	131,9 ± 5,9	0	7,22 ± 0,3	13,8 ± 0,7
7–13 верхні міжвузля з листковими піхвами	14,8 ± 0,7	35,5 ± 1,6	2,9 ± 0,2	4,0 ± 0,2	17,3 ± 0,8
1–6 нижні міжвузля з листковими піхвами	15,7 ± 0,7	14,6 ± 0,7	36,5 ± 1,7	7,8 ± 0,3	40,6 ± 2,0
Кореневище	82,6 ± 4,0	16,1 ± 0,7	19,7 ± 0,9	17,9 ± 0,8	37,3 ± 1,8

Примітка. Z — зеатин, ZR — зеатинрибозид, iPa — ізопентеніладенозин, iP — ізопентеніладенін, ZG — зеатин-О-глюкозид.

ізопентенільних форм був невисоким. Значний сумарний рівень цитокінінів був притаманний кореневищам. Надземна частина молодих рослин характеризувалася накопиченням кон'югованої форми цитокінінів — зеатин-О-глюкозиду. У вегетативних пагонах, які досягли розміру 33 см, вміст цитокінінів був істотно нижчим (у десятки разів), ніж на початку розвитку. У зрілих пагонах (40 см) рівень цитокінінів був вельми незначним, за винятком кореневища, де накопичувалися ізопентенільні форми. У вегетативних пагонах концентраційних градієнтів по довжині рослини не виявлено. Навпаки, рівень цитокінінів у кореневищах і верхній частині пагона був вищим, ніж у нижніх міжвузлях. Це свідчить про те, що верхівки вегетативних пагонів можуть продукувати певну кількість цитокінінів.

Таким чином, вегетативні та генеративні тканини хвоща польового містять цитокініни у кількостях, які порівнянні з вмістом їх у вищих квіткових рослинах [10]. Найвищий сумарний рівень цитокінінів визначено в кореневищі, що свідчить про можливість локалізації їх біосинтезу в цьому органі. Як відомо, коренева система, а особливо кінчики коренів рослин, є одним з місць синтезу цитокінінів. Важливу роль відіграють ці гормони у розвитку й самого кореня [11]. Можна припустити, що функції кореня як продуцента цитокінінів виникли у рослин на початку еволюційного розвитку і збереглися до сьогодні.

У кореневищі визначено найвищий рівень зеатину і зеатинрибозиду. Це вказує на можливість того, що ці форми є первинними продуктами синтезу цитокінінів, що також характерно для більшості вищих судинних рослин [12]. У вегетативних пагонах на стадії зрілості рівень цитокінінів знижується, що свідчить про припинення синтезу цих гормо-

Таблиця 2. Вміст цитокінінів у вегетативних пагонах *Equisetum arvense* L. на різних етапах розвитку, нг/г сирової речовини

Рослинний матеріал	Z	ZR	iPa	iP	ZG
<b>Висота рослин — 18 см</b>					
7–13 верхні міжвузля з гілками	46,1 ± 2,1	25,3 ± 1,2	0	9,8 ± 0,4	116,9 ± 5,8
1–6 нижні міжвузля з гілками	34,3 ± 1,5	20,1 ± 0,9	9,7 ± 0,4	1,1 ± 0,05	92,1 ± 4,7
Кореневище	72,4 ± 0,7	56,2 ± 0,7	8,6 ± 0,4	4,5 ± 0,2	51,4 ± 2,4
<b>Висота рослин 21 см</b>					
7–13 верхні міжвузля з гілками	9,8 ± 0,4	71,4 ± 2,9	23,7 ± 1,7	7,3 ± 0,3	48,6 ± 2,3
1–6 нижні міжвузля з гілками	12,5 ± 0,6	29,7 ± 1,4	10,0 ± 0,4	10,8 ± 0,5	102,9 ± 4,9
Кореневище	59,8 ± 2,7	21,3 ± 1,1	7,6 ± 0,3	12,1 ± 0,6	96,7 ± 4,7
<b>Висота рослин 24 см</b>					
7–13 верхні міжвузля з гілками	28,2 ± 1,3	80,5 ± 3,9	11,5 ± 0,4	5,8 ± 0,2	214,2 ± 10,7
1–6 нижні міжвузля з гілками	31,5 ± 1,4	14,4 ± 0,7	21,8 ± 1,0	12,4 ± 0,4	163,9 ± 8,1
Кореневище	67,8 ± 3,2	32,6 ± 1,5	24,8 ± 1,1	11,1 ± 0,4	79,1 ± 3,7
<b>Висота рослин 33 см</b>					
7–13 верхні міжвузля з гілками	13,5 ± 0,7	2,2 ± 0,1	1,6 ± 0,08	Сліди	0
1–6 нижні міжвузля з гілками	14,7 ± 0,7	0	8,2 ± 0,4	4,0 ± 0,2	0
Кореневище	1,2 ± 0,05	2,4 ± 0,1	7,1 ± 0,3	2,5 ± 0,1	4,5 ± 0,2
<b>Висота рослин 40 см</b>					
7–13 верхні міжвузля з гілками	0	0,7 ± 0,04	3,5 ± 0,2	1,7 ± 0,08	0
1–6 нижні міжвузля з гілками	0	0	2,1 ± 0,1	0,8 ± 0,04	0
Кореневище	2,5 ± 0,1	2,8 ± 0,1	10,8 ± 0,5	44,7 ± 2,2	7,0 ± 0,3

Примітка. Z — зеатин, ZR — зеатинрибозид, iPa — ізопентеніладенозин, iP — ізопентеніладенін, ZG — зеатин-О-глюкозид.

нів (див. табл. 2). Таким чином, закономірності динаміки активних форм цитокінінів, які спостерігаються в онтогенезі вищих рослин, а саме підвищений їх вміст у молодих тканинах з високим мітотичним індексом і знижений у старіючих, притаманні і хвощу польовому.

Слід відзначити наявність досить значного рівня зеатин-О-глюкозиду у молодих активно ростучих спорофітах та вегетативних пагонах. Відомо, що кон'югована із глюкозним залишком форма зеатину є неактивною біологічно, але значно стабільнішою і менш вразливою до дії окиснювальних ферментів сполукою, яка виконує функції запасної форми цитокінінів, здатної у разі необхідності легко гідролізуватися зі звільненням зеатину. У вищих рослин зеатин-О-глюкозид накопичується зазвичай у старіючих тканинах і дозрілому насінні [9]. Як показали наші дослідження, у хвоща польового спостерігається протилежна картина: високі кількості зв'язаної форми зеатину присутні в тканинах ростучих органів на ранніх стадіях розвитку, а у старіючих його вміст дуже незначний. Можна припустити, що молодим пагонам притаманний гіперсинтез цитокінінів і шляхом кон'югації відбувається нейтралізація їх надлишку. Відомо, що катаболізм цитокінінів у рослині визначається експресією двох родин генів — *IPT* та *CKX*, активність яких змінюється протягом онтогенезу рослин, зокрема вона вища в ділянках меристематичного росту [13]. Значно менше відомостей стосовно генів, відповідальних за перетворення кон'югатів цитокінінів. Очевидно, накопичення зеатин-О-глюкозиду в молодих тканинах хвоща є проявом підвищеної експресії генів родини *ZOG*, які кодуєть фермент О-глюкозилтрансферазу, що каталізує утворення О-глюкозидів цитокінінів [14]. Вірогідно, активність цих генів у хвоща польового з віком знижується. Фізіологічне значення таких особливостей метаболізму цитокінінів у *E. arvense*, які відрізняють його від вищих судинних рослин, поки що неможливо пояснити. Враховуючи нещодавнє повідомлення, що оверекспресія гена *ZOG* у кукурудзи призводить до дуже істотної затримки росту рослин і значного зменшення їх розмірів [15], можна дещо спекулятивно припустити, що значне зменшення розмірів рослин хвоща відносно тих, які були їм притаманні у кам'яновугільний період, пов'язане з мутаціями, що привели до домінування гена *ZOG* і, як наслідок, до кон'югації цитокінінів у формі О-глюкозидів та переважання вмісту зв'язаних форм над активними.

Певний інтерес становить розподіл цитокінінів вздовж вертикальної осі *E. arvense*. Якщо у спорофіта простежуються концентраційні градієнти окремих цитокінінів, то для вегетативних пагонів характерна наявність локальних зон синтезу. Вважається, що саме завдяки концентраційному градієнту цитокінінів у рослин відбувається інформаційне сполучення між підземною і надземною частинами рослини, а формування локальних ділянок біосинтезу підвищує надійність функціонування системи цитокінінової регуляції [3]. Отже, у хвоща польового ендокринна (тобто далекодистанційна) дія цитокінінів поєднується з паракринною (тобто локальною у місці їх біосинтезу) лише у вегетативних пагонах, тоді як у спорофітах функціонує лише один, менш надійний, тип регуляції. Вірогідно, що останній поступово замінювався на більш досконалий у процесі еволюційного розвитку рослин.

Таким чином, дослідження цитокінінового статусу різних за функціональним призначенням пагонах хвоща польового показало, що ця давня за походженням рослина має багато ознак, спільних з вищими судинними рослинами. Це якісний склад цитокінінів, динаміка активних форм протягом онтогенезу, наявність локальних місць синтезу цитокінінів. Проте існують і специфічні ознаки, до яких належить підвищений вміст кон'югатів на ранніх стадіях розвитку та різний тип розподілу гормонів вздовж вертикальної осі у вегетативних та генеративних пагонах.

1. Ross J. J., Reid J. B. Evolution of growth-promoting plant hormones // *Functional Plant Biology*. – 2010. – **37**, No 9. – P. 795–805.
2. Hartung W. The evolution of abscisic acid (ABA) and ABA function in lower plants, fungi and lichen // *Ibid.* – 2010. – **37**, No 9. – P. 806–812.
3. Романов Г. А. Как цитокинины действуют на клетку // *Физиология растений*. – 2009. – **56**, № 2. – С. 295–319.
4. Yamane H., Watanabe M., Satoh Y. et al. Identification of cytokinins in two species of Pteridophyte sporophytes // *Plant and Cell Physiol.* – 1983. – **24**, No 6. – P. 1027–1031.
5. Kuriyama A., Takeuchi M., Kawai F., Kanamori M. Roles of inorganic nitrogen in gametophytic growth and in initiation and development of sporophytic shoots of *Equisetum arvense* // *Ibid.* – 1992. – **33**, No 5. – P. 647–650.
6. Kuriyama A., Kawai F., Kanamori M., Dathe W. Inhibitory effect of jasmonic acid on gametophytic growth, initiation and development of sporophytic shoots in *Equisetum arvense* // *J. Plant Physiol.* – 1993. – **141**, No 6. – P. 694–697.
7. Kuriyama A., Maeda M. Direct production of sporophytic plants from spores of *Equisetum arvense* // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1999. – **58**, No 1. – P. 77–79.
8. Мусатенко Л. И., Веденичева Н. П., Васюк В. А. и др. Комплекс фитогормонов в проростках различных по устойчивости к повышенным температурам гибридов кукурузы // *Физиология растений*. – 2003. – **50**, № 4. – С. 499–504.
9. Sakakibara H. Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation // *Ann. Rev. Plant Biol.* – 2006. – **57**. – P. 431–449.
10. Сытник К. М., Мусатенко Л. И., Васюк В. А. та ін. Гормональний комплекс рослин і грибів. – Київ: ВД “Академперіодика”, 2003. – 186 с.
11. Higuchi M., Pischke M. S., Mahonen A. P. et al. In planta functions of the Arabidopsis receptor family // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – **10**. – P. 8821–8826.
12. Kamada-Nobusada T., Sakakibara H. Molecular basis for cytokinin biosynthesis // *Phytochemistry*. – 2009. – **70**. – P. 444–449.
13. Perilli S., Moubayidin L., Sabatini S. The molecular basis of cytokinin function // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2010. – **13**. – P. 21–26.
14. Martin R. C., Mok M. C., Mok D. W. S. Isolation of a cytokinin gene, *ZOG1*, encoding zeatin *O*-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1999. – **96**, No 1. – P. 284–289.
15. Rodó A. P., Brugièrè N., Vankova R. et al. Over-expression of a zeatin *O*-glucosylation gene in maize leads to growth retardation and tasselseed formation // *J. Exp. Bot.* – 2008. – **59**, No 10. – P. 2673–2686.

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного  
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 05.06.2013

**Н. П. Веденичева, академик НАН України К. М. Сытник**

### **Локализация и динамика цитокининов в различных частях растений *Equisetum arvense* L.**

*Изучено распределение цитокининов в органах спорофитов и вегетативных побегов хвоща полевого на разных стадиях развития. Показано, что это древнее по происхождению растение имеет много признаков сходства с высшими сосудистыми растениями, к которым относятся качественный состав цитокининов, динамика их свободных форм на протяжении онтогенеза, наличие локальных мест синтеза цитокининов. К специфическим признакам относятся повышенное содержание конъюгатов на ранних стадиях развития и различный тип распределения гормонов вдоль вертикальной оси вегетативных и генеративных побегов.*

N. P. Vedenicheva, Academician of the NAS of Ukraine K. M. Sytnik

**Localization and dynamics of cytokinins in different parts of *Equisetum arvense* L.**

*The distribution of cytokinins in organs of Equisetum arvense L. sporophytes and vegetative shoots at different developmental stages is studied. There are some similarities in the cytokinin status between this ancient plant and higher vascular plants, namely the qualitative composition of cytokinins, dynamics of free forms during ontogenesis, and presence of the local places of cytokinin biosynthesis. The specificity of E. arvense includes a higher conjugates content at earlier developmental stages and different types of cytokinin distributions along the vertical axis of vegetative and generative shoots.*