

БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕЯНЦЕВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ IN VITRO

Значительная часть дубовых насаждений юго-востока Украины представлена лесами порослевого происхождения (2-3-е поколения), что вызывает снижение деловых качеств древесины, увеличивает восприимчивость деревьев дуба к разнообразному воздействию биогенных и абиогенных факторов, на 30-40 лет раньше начинается усыхание деревьев, снижается их водоохранное и экологическое значение.

Учитывая большое экономическое и экологическое значение насаждений дуба, вопросам размножения лучших генотипов придается большое значение. Одним из широко распространенных является способ размножения древесных *in vitro*. Однако эта техника, часто используемая в плодководстве, оказалась трудно применимой к разным видам дуба, вследствие очень низкой морфогенетической активности эксплантов от взрослых деревьев (5).

Относительно просто могут быть микроклонированы 2-8-месячные сеянцы дуба, в связи с чем во многих странах для отработки методики микроклонирования используется ювенильный материал. Многолетнее изучение 3-8-месячных сеянцев дуба по признаку устойчивости и восприимчивости к такому широко распространенному заболеванию, как мучнистая роса (4), позволило нам выявить некоторые биохимические маркерные признаки (вещества вторичного обмена, фенольные соединения - ФС), которые позволяют еще до начала распространения инфекции дифференцировать сеянцы по их потенциальной устойчивости к вредителю. Далее микроклонально можно размножать сеянцы не просто в соответствии с их ростовой активностью, а с определенными показателями вторичного биохимического признака. В настоящее время известно, что вещества вторичного обмена связаны с ростовой активностью растений и могут влиять на синтез веществ первичного метаболизма (6). Учитывая эти данные, а также то, что в листьях дуба черешчатого синтезируется заметное количество ФС, в том числе такие функционально активные для растительной клетки соединения как кверцетин и его гликозиды (2), анализ сеянцев дополнили определением содержания некоторых веществ первичного обмена – белка и хлорофилла. Целью работы была оценка сеянцев по комплексу признаков, затрагивающих особенности первичных и вторичных метаболитов.

Материалы и методы

Материалом для анализа служили листья 3.5-месячных сеянцев, выращенных из желудей панмиктической популяции дуба черешчатого. Листья фиксировали в кипящем этаноле, высушивали до воздушно-сухого состояния.

Определение фенольных соединений.

20 мг сухих листьев гомогенизировали с 4 мл 70%-ного этанола, центрифугировали при 3000 об. в теч. 20 мин.. Надосадочную жидкость использовали для определения содержания фенолпропаноидной группы веществ – флавонолов в гликозилированной форме и свободных агликонов.

Определение флавонолов. Содержание этой группы проводили по реакции с ALCL3, калибровочная кривая построена по кверцетину (Chemapol), 425 нм, КФК-3 (7).

Содержание свободного кверцетина определяли после разбавления этанольного экстракта дист.водой до концентрации 20% этанола и перевода свободного кверцетина в хлороформно-спиртовую фазу после обработки раствора хлороформом, 374 нм, КФК-3.

Определение белка выполняли по методу (1). Количество хлорофилла определяли по методу (3). Микроклональное размножение сеянцев дуба выполнялось согласно ранее опубликованной методике (4).

Результаты и обсуждение

Листья взрослых деревьев дуба черешчатого накапливают значительное количество ФС, из которых около 3-5% составляют вещества структуры гидролизуемых танинов (ди- и пента-галлоилглюкоза), от 0.3 до 1% составляют вещества структуры флавонолов и 1-3% могут составлять вещества структуры флаван-3-ол и флаван-3,4-ди-ол (катехины и проантоцианидины). Последние три группы веществ относятся к фенилпропаноидам, из которых наиболее изученной является группа флавонолов в агликоновой и гликозилированной форме. В листьях дуба из этой группы веществ присутствует гликозид кверцетин-3-рамнозид (кверцитрин) и свободный кверцетин, а также в незначительном количестве производные кемпферола и мирицетина (8).

Так как свободный кверцетин является токсичным для самой растительной клетки, он достаточно быстро с помощью фермента гликозил-трансфераза превращается в нетоксичную гликозилированную форму. В связи с этим количество свободного кверцетина обычно незначительно и зависит от скорости работы этого фермента. В нашем случае при необходимости анализировать достаточно большую выборку особей, показатель относительной активности фермента заменили показателем степени гликозилирования флавонолов путем расчета пропорционального соотношения количества гликозилированной формы флавонолов (преимущественно кверцитрин) и свободной (кверцетин). Можно отметить также, что другие группы фенилпропаноидной структуры (катехины и проантоцианидины) начинают синтезироваться, начиная с 5-месячного возраста, поэтому в ранние сроки развития в сеянцах отмечается присутствие преимущественно группы флавонолов.

Таблица.

Характеристика 3.5-месячных сеянцев дуба черешчатого по ряду признаков первичного и вторичного обмена (% сухой массы листьев).

Биохимические группы в параметрах нормального распределения признака	Показатели степени гликозилирования комплекса флавонолов	Содержание белка $X \pm m$	Содержание хлорофилла $X \pm m$	Высота сеянцев, см $X \pm m$
1-я группа <(x-1σ)	< 4	11.4 ± 0.58	7.8 ± 0.13	22.3 ± 0.4
2-я группа (x - 1σ)	4.1 – 9.0	12.2 ± 0.3	8.0 ± 0.8	19.7 ± 2.0
3-я группа (x + 1σ)	9.1 – 13.9	12.7 ± 0.24	9.8 ± 0.5	20.0 ± 2.05
4-я группа >(x+1σ)	> 14.0	13.1 ± 0.82	9.6 ± 0.8	19.0 ± 2.9

Различия показателя степени гликозилирования флавонолов указывают на разную скорость превращения свободного кверцетина в гликозилированную форму. Исходя из вариационного распределения, 2-я и 3-я группы ($x \pm 1\sigma$) соответствуют норме реакции признака, то есть отражают наиболее адаптивный диапазон изменчивости. Сеянцы 1-й и 4-й групп выходят за пределы оптимального диапазона значений признака.

Согласно литературным данным, первичным местом синтеза флавонолов и, соответственно, кверцетина, являются хлоропласты, причем кверцетин (и некоторые

другие свободные агликоны) является эффективным природным ингибитором окислительного и фотосинтетического фосфорилирования (3). В свете этих данных наиболее низкий уровень содержания хлорофилла и белка в 1-й биохимической группе совпадает с наблюдаемой низкой степенью гликозилирования флавонолов и соответственно повышенной концентрацией свободного кверцетина. В 3-й и 4-й группах существенно возрастает содержание хлорофилла и белка. В этих группах при высокой степени гликозилирования, видимо, значительно снижается уровень свободного кверцетина, что отражается на заметно более высоком содержании, как хлорофилла, так и белка. Промежуточное положение занимает 2-я биохимическая группа, однако, благодаря более низкой степени гликозилирования флавонолов, эта группа потенциально проявляет более высокую устойчивость к мучнистой росе (4).

Четкой связи с высотой сеянцев не выявляется, что подтверждает ненадежность ориентации в оценке ювенильного материала для микроклонирования только на их ростовую активность.

При микроклональном размножении разных биохимических групп оказывается, что в условиях *in vitro* они проявляют разную ростовую активность, причем заметно отстают в скорости вытягивания побегов и разворачивания листы экспланты 1-й биохимической группы, наиболее активными в этом плане оказываются экспланты 2-й и 3-й биохимических групп, несколько уступает по этому показателю 4-я группа. Однако 3-я и 4-я группы отличаются образованием большего числа листьев на побег и более развернутой листовой пластиной. Подобная тенденция наблюдалась ранее (4), а также при микроклонировании сеянцев проанализированной выше группы (рис.).

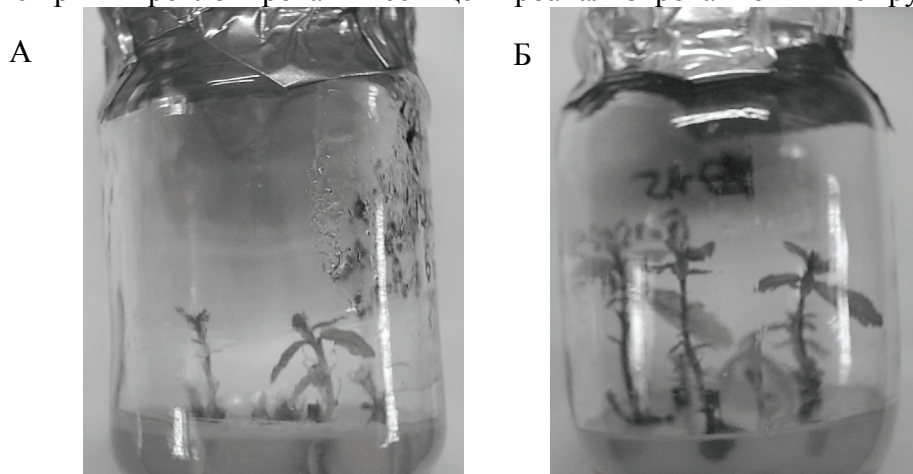


Рис. 1-мес. экспланты сеянцев дуба черешчатого
А- 1-я биохимическая группа, Б – 3-я биохимическая группа

Дифференциация сеянцев дуба по биохимическим группам позволяет выделить особи с признаками, указывающими на их возможное потенциальное развитие в будущем. Если 2-я биохимическая группа является потенциально более устойчивой к патогену мучнистой росы (4), то 3-я группа может составить основу для наиболее конкурентно-активных и продуктивных растений за счет наблюдаемого повышенного в листьях уровня таких важных первичных метаболитов, как содержание белка и хлорофилла.

Выводы

1. При анализе листьев сеянцев дуба черешчатого по признаку вторичного обмена - степени гликозилирования флавонолов - обнаруживается связь с такими показателями первичного обмена, как содержание хлорофилла и общее содержание белка.

2. В соответствии со статистическими параметрами нормального распределения признака (степень гликозилирования флавонолов) возможно дифференцировать

ювенильный материал по комплексу биохимических показателей до начала микрорепродукции, что позволяет ориентироваться не только на ростовую активность, отмечаемую визуально.

Литература

1. Бузун Г.А., Джемухадзе К.М., Милешко Л.Ф. Определение белка в растения с помощью амидо-черного // Физиол. раст.-1982.-Т.29.-В.-С.198-204.

2. Жесткова И.М., Молотковский Ю.Г. Регулирование фотосинтеза в интактных хлоропластах шпината и клетках эвглены кверцетином и бикарбонатом // Физиол. раст.- 1984.-Т.31.-В.2.-С.266-272.

3. Карначук Р.А., Венгеровская Е.И., Постовалова В.М., Ревина Т.А. Об активности фотосинтетического аппарата некоторых видов *Sedum L.*, адаптированных к свету разного качества // Физиол. раст.- 1981.-Т.28.-В.1.-С.66-72.

4. Полякова Л.В. Особливості мікрорепродукції розмноження сіяньців дуба звичайного (*Quercus robur L.*) *in vitro* залежно від показників вторинного обміну // Лісівництво і агролісомеліорація.-2006.-В.109.-С.236-243.

5. Ewald D., Naujoks G. Large scale testing of tissue culture of several adult larch clones and of factors influencing the growth behavior of adult oak clones and after transfer to soil // Cost Action 822.-2000.- P.333-336.

6. Haukioja E., Ossypov V., Koricheva J., Hankanen T., Larsson S., Lempa K. Biosynthetic origin of carbon-based secondary compounds: cause of variable responses of woody plants to fertilization? // J.Chemoecology.-1998.-N3.-P.133-139.

7. Julkunen-Tiitto R. Phenolic constituents in leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics // J.Agric.Food Chem.-1985.-V.33.-P.213-217.

8. Parker J. Phenolics in black oak bark and leaves // J.Chem.Ecol.-1977.-V.33.-N5.- P.871-880.

Резюме

Листья сеянцев дуба черешчатого анализировали на содержание некоторых групп веществ первичного и вторичного обмена. Из вторичных биохимических признаков определяли степень гликозилирования флавонолов. Определенное сочетание этого признака с уровнем содержания хлорофилла и белка позволяет оценить и дифференцировать сеянцы в плане их потенциальной продуктивности и устойчивости к мучнистой росе.

Листя сіяньців дуба звичайного аналізували на вміст деяких сполук первинного та вторинного обміну. Певне відношення такого показника, як ступінь гликозилування флавонолів, до вмісту хлорофілу і білка дозволяє оцінити і диференціювати сіяньці у плані їх потенційної продуктивності та стійкості до борошнистої роси.

Biochemical characters of oak seedlings for purpose of micropropagation *in vitro*. Some traits of first and second metabolites were analysed in oak (*Quercus robur L.*) seedlings leaves. Defined meaning of flavonol glucosylation grade and level of chlorophyll and protein is possible to use for estimation of potential properties of productivity and resistance to mildew (*Microspora albidoides*).

СОРОКА А.И.

Институт масличных культур УААН

Украина, 70417, г. Запорожье, ул. Весенняя 1, e-mail: oilseed@mail.zp.ua

ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА ЗАРОДЫШЕЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА ПРИ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO* НА ЧАСТОТУ И НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НИХ РАСТЕНИЙ

Подсолнечник как основная масличная культура Украины требует к себе