

## СОДЕРЖАНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА В ГЕНЕРАТИВНЫХ ПОЧКАХ ПЕРСИКА

Т.С. ЕЛМАНОВА, *кандидат биологических наук*

В длительном процессе эволюции древесные растения сформировались как обладатели многоступенчатой системы взаимосвязанных и взаимозависимых циклов жизнедеятельности, включающих рост и репродукцию. Важнейшим элементом дерева является почка. Ее жизненный цикл включает в себя рост органов, которые могут быть вегетативными или генеративными. Для плодового дерева особый интерес представляют генеративные почки, поскольку они являются основой будущего урожая. Особенности их морфогенеза у разных плодовых культур мы находим в ряде публикаций [1, 3, 9 и др.]. Однако для управления процессами дифференциации генеративных почек необходимо и знание эндогенной регуляции перехода от одного этапа к другому. Главное звено в механизме регуляции почки, как и дерева в целом, принадлежит фитогормонам и веществам, выступающим в роли их синергистов или антагонистов. На уровне целого растения в компетенции фитогормонов находится общая корреляция жизнедеятельности путем влияния на поступление минеральных веществ, процессы фотосинтеза, контролирования всех функций роста и развития [19]. На уровне клеток они ответственны за деление и растяжение клеток и их дифференцировку [10]. На ядерном уровне гормоны выполняют роль эффекторов и репрессоров генов [14].

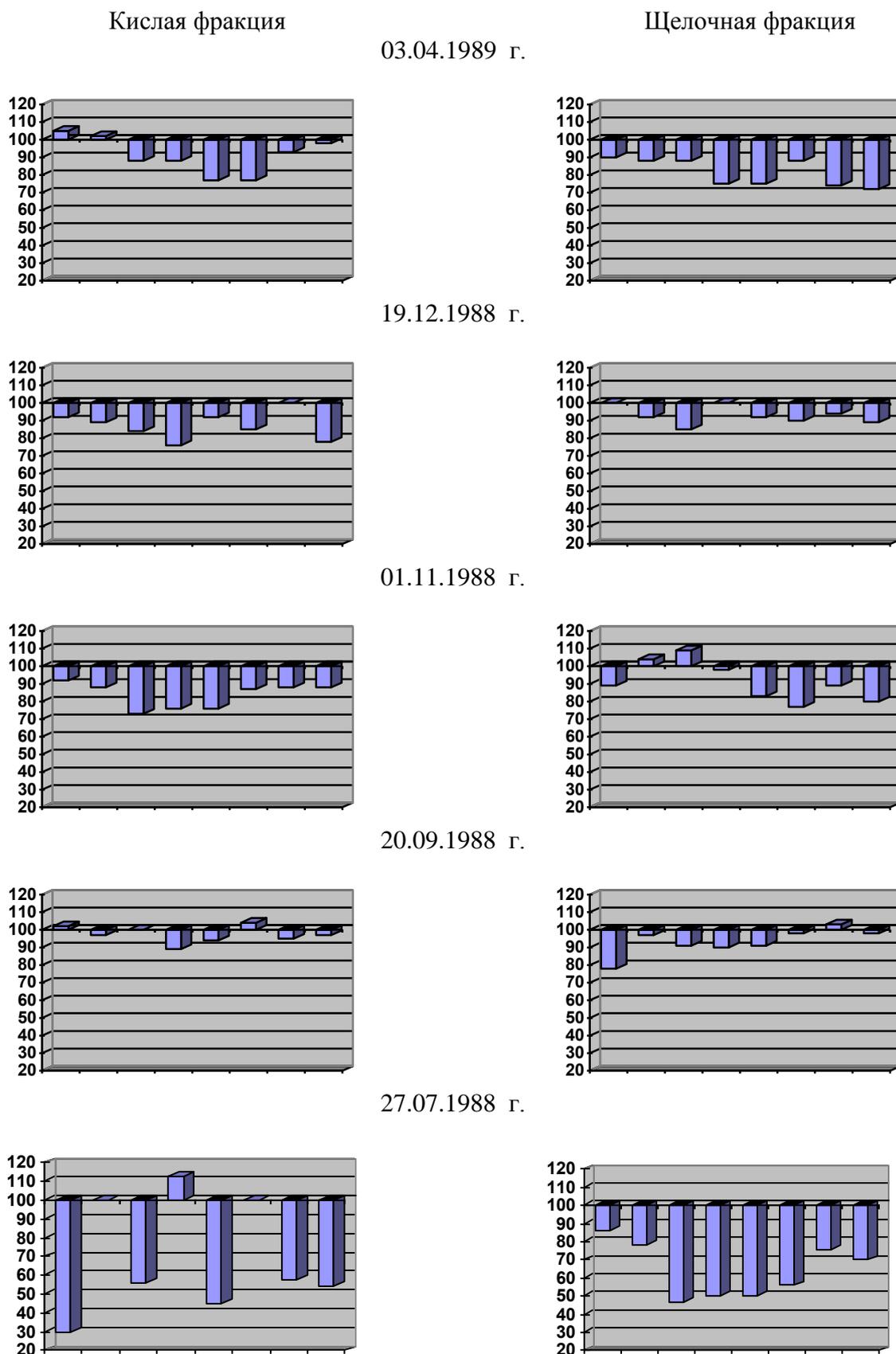
В данной работе мы попытались проследить динамику содержания гиббереллиноподобных веществ, соединений, обладающих ауксиновой или цитокининовой реакцией, и фенольных ингибиторов роста на различных этапах морфогенеза генеративных почек персика.

### Объекты и методы исследований

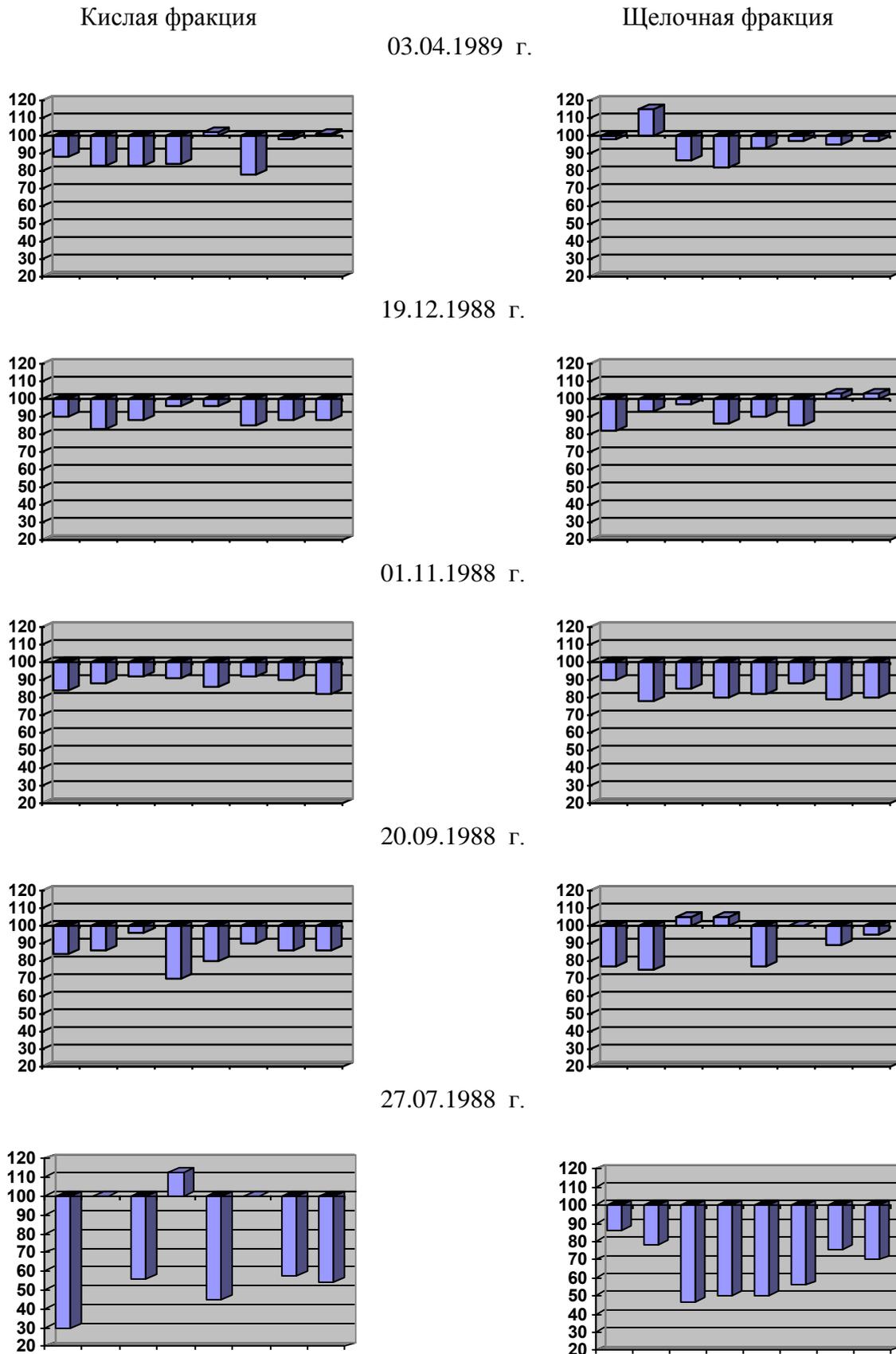
Исследования проводились на базе коллекционных насаждений Никитского ботанического сада на Южном берегу Крыма. Пробы для определения содержания ингибиторов и стимуляторов роста отбирались на определенных этапах морфогенеза (органогенез цветка, спорогенная ткань пыльника, микроспора, пыльца). Этапы морфогенеза почек устанавливали на давленных препаратах пыльников [3]. Выделение и очистку гиббереллинов, цитокининов, ауксинов и фенольных веществ проводили по известным методикам [15, 16, 18] или их модификациям, связанным с подбором навески для экстракции, выбором систем растворителей при бумажной хроматографии, идентификацией веществ, обладающих рострегулирующей активностью. Более подробно об этой стороне методического характера сказано в соответствующих разделах работы.

### Результаты и обсуждение

1. **Ауксиноподобные вещества в почках.** Из эфирных экстрактов генеративных почек персика на различных этапах морфогенеза были выделены кислая и щелочная фракции, обладающие ауксиновой реакцией (задержка опадания черешка колеуса, ускорение роста колеоптиля пшеницы, ингибирование роста корешка гороха). Хроматографическое разделение этих фракций, проведенное на бумаге *Filtrak* в системе растворителей изопропанол : аммиак : вода, в отношении 10:1:1, показало, что ауксиноподобных веществ несколько, и их активность различна в течение развития почек (гистограммы 1 и 2). Кислоторастворимые ауксиноподобные вещества наиболее



Гистограмма 1. Содержание ауксиноподобных веществ в генеративных почках персика. Биотест: подавление роста корешков гороха, % к контролю.



Гистограмма 2. Содержание ауксиноподобных веществ в вегетативных почках персика. Биотест: подавление роста корешков гороха, % к контролю.

широко представлены в летний период во время начала дифференциации почек на генеративные и вегетативные. В этот срок значительных количеств достигают вещества с  $R_f$  0,06; 0,30; 0,54; 0,78; 0,90 (гистограмма 1). Соединение с  $R_f$  0,54 идентифицировано нами как индолил-3-уксусная кислота (ИУК). В дальнейшем при переходе генеративных почек к осеннему развитию, когда отмечается резкое затухание ростовых процессов и листопад, а в почках уже заложены все элементы цветка, содержание кислых ауксинов резко снижено и накопление их снова отмечается при формировании спорогенной ткани пыльника. В это время обнаруживаются вещества с  $R_f$  0,30; 0,42; 0,54. В весенний период на этапе "пыльца" кислые ауксины представлены в основном индолил-3-уксусной кислотой.

Рассматривая динамику веществ с ауксиновой активностью щелочной фракции, следует отметить, что в целом прослеживается картина, описанная по кислым ауксином, а отличие состоит в количественном соотношении этих фракций: летом и весной в генеративных почках преобладают щелочные ауксиноподобные вещества, зимой – вещества кислой природы.

Оценивая в сумме по пятибалльной системе ауксиновую активность обеих фракций, мы приходим к выводу о том, что существенную роль в морфогенезе генеративных почек ауксины играют в начальный период дифференциации (см. далее табл.4). Динамика ауксинов в вегетативных почках обнаруживает тенденцию постепенного снижения их содержания к весне по сравнению с осенним их количеством (гистограмма 2).

**2. Цитокининовые вещества в почках.** Очищенные этанольные экстракты из генеративных почек подвергли разделению на четыре фракции: эфирную ( $pH$  9,0), этилацетатную ( $pH$  2,5), бутанольную ( $pH$  7,0) и водную ( $pH$  7,0). Упаренные остатки каждой фракции растворяли в этаноле и хроматографировали на бумаге в системе растворителей изопропанол : аммиак : вода (10:1:1). Определение цитокининовой активности проводили с помощью биотестов (старение листьев редиса и ячменя, рост семядолей и др.). Наиболее чувствительным в наших опытах оказался тест с семядолями тыквы крупноплодной [15]. Результаты исследований приведены в табл. 1.

Как видим, выраженной цитокининовой активностью в генеративных почках обладает этилацетатная фракция, особенно вещества с  $R_f$  0,40-1,0. В вегетативных почках цитокининовой активностью обладали вещества эфирной фракции. Сравнение величины цитокининовой активности у вегетативных и генеративных почек и анализ динамики у последних явно свидетельствуют об участии цитокининов в регуляции процессов морфогенеза, особенно на поздних его этапах ("микроспора", "пыльца"), очевидно, путем повышения функциональной активности рибосом, влияя тем самым на белковый обмен [13]. Подтверждением этого служат наши данные об увеличении белкового азота в генеративных почках на этапе "пыльца" [4].

**3. Гиббереллиноподобные вещества в почках.** Хроматографирование гиббереллиноподобных веществ из генеративных почек персика в системе растворителей изопропанол : аммиак : вода (80:5:15) показало, что этилацетатные экстракты содержат два вещества - с  $R_f$  0,41 и 0,71. Последнее соединение нами идентифицировано как гибберелловая кислота [6].

В таблице 2 приведены данные о содержании гиббереллинов в генеративных и вегетативных почках. Количественная их оценка проводилась по площади пятен, окрашенных и флуоресцирующих в УФ-свете после обработки хроматограмм серной кислотой [18]. Как видим, в количественном отношении вещество с  $R_f$  0,71 превалирует над веществом с  $R_f$  0,4 и больше варьирует в зависимости от этапа развития. У генеративных почек на начальном этапе морфогенеза (закладка органов

Таблица 1

Характеристика цитокининовой активности (рост семядолей тыквы, % к контролю) в различных фракциях из почек персика сорта Спартак

Rf	Петролейный эфир рН 9,0				Этилацетат рН 2,5				Бутанол рН 7,0			
	01.10	03.01	19.02	19.04	01.10	03.01	19.02	19.04	01.10	03.01	19.02	19.04
Генеративные почки												
0,20	99	98	99	95	107	115	111	106	86	88	94	90
0,40	104	94	101		98	107	114	108	90	89	92	88
0,60	99	97	99	99	103	111	112	108	90	92	88	94
0,80	94	95	100	94	99	100	111	120	88	83	88	85
1,00	102	92	99	97	96	113	109	116	88	82	86	73
Вегетативные почки												
0,2	95	97	100	102	87	90	100	100	77	78	98	100
0,4	102	103	112	103	95	93	103	98	87	87	99	101
0,6	100	106	106	106	91	91	91	100	74	85	90	99
0,8	104	100	101	100	91	94	88	95	76	86	95	100
1,0	93	102	98	107	87	102	100	101	67	66	99	83

Примечание. В указанные сроки отбора проб генеративные почки были 01.10 на этапе "формирование спорогенной ткани пыльника", 03.01 - "тетрады микроспор", 19.02 - "микроспора", 19.04 - "пыльца".

цветка) уровень гиббереллинов низкий, затем в период листопада и вхождения почек в глубокий покой количество гиббереллинов повышается, достигая максимума после выхода из покоя на этапе "микроспора". Динамика гиббереллинов в вегетативных почках также связана с периодом покоя. После окончания покоя (декабрь - январь) их количество возрастает, но в отличие от генеративных почек весной, в период активизации ростовых процессов снова падает, тогда как в генеративных почках количество гиббереллинов сохраняется на достаточно высоком уровне.

4. **Фенольные соединения в почках.** Содержание фенольных соединений в генеративных почках персика максимальное в период начала дифференциации (вторая половина июля) и минимальное весной в период цветения (табл. 3.). Вегетативные почки имеют свои отличительные особенности. Уровень фенолов в зимнее время в этих органах выше, чем в генеративных, и снижение наблюдается только весной (март - апрель), что, по-нашему мнению, связано с меньшей интенсивностью ростовых

Таблица 2

## Содержание гиббереллинов (баллы) в почках персика сорта Спартак

Почки	Август	Сентябрь	Октябрь	Ноябрь	Декабрь	Январь	Февраль	Март	Апрель
Генеративные	$\frac{1}{1}$	$\frac{2}{1}$	$\frac{2}{2}$	$\frac{2}{1}$	$\frac{3}{2}$	$\frac{4^*}{\text{след}}$	$\frac{5}{2}$	$\frac{3}{0}$	$\frac{5}{0}$
Вегетативные	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{2}{2}$	$\frac{\text{след}}{\text{след}}$	$\frac{2}{1}$	$\frac{4^*}{1}$	$\frac{4}{2}$	$\frac{2.5}{1}$	$\frac{1.5}{0}$

Примечание. Над чертой содержание гиббереллиноподобного вещества с  $Rf$  0.71, под чертой – с  $Rf$  0.41. В указанные сроки отбора проб генеративные почки были в августе-сентябре на этапе "закладка органов цветка", в октябре-декабре - "формирование спорогенной ткани пыльника", в январе - "тетрады микроспор", в феврале - "микроспора", в марте-апреле - "пыльца", \* - почки вышли из глубокого покоя.

процессов. Коэффициент корреляции между накоплением сухой массы почки и содержанием в ней фенолов для генеративных почек составил  $r = 0,90$ , для вегетативных -  $r = 0,92$ .

Биосинтез фенолов обусловлен деятельностью определенных компартментов клетки: эндоплазматический ретикулум, митохондрии, микротельца и хлоропласты, причем доля участия последних превалирует [8]. А так как в зимне-весеннее время погодные условия не благоприятствуют процессам фотосинтеза, то, естественно, синтез фенолов в хлоропластах ограничен, и для поддержания определенного уровня фенолов в увеличивающихся в размерах клетках зачатков цветка идет дополнительное перераспределение имеющихся фенолов, поскольку они являются необходимыми компонентами биосинтеза клеточных структур.

Таблица 3

## Содержание фенольных веществ в генеративных почках персика сорта Спартак

Дата	Этап морфогенеза	Количество фенолов		
		в % на сырое вещество	в % на сухое вещество	в мг на 10 почек
8.IX	Закладка органов цветка	8,7	17,0	7,8
30.IX		7,9	15,0	12,7
27.X	Формирование спорогенной ткани пыльника	7,4	14,5	11,9
16.XI		6,0	12,4	12,1
2.XII		6,4	12,9	14,5
17.XII		7,6	14,8	17,3
6.I	Тетрады микроспор	5,1	10,8	11,9
20.I	Микроспора	5,4	11,4	13,3
4.II	Микроспора	4,4	9,9	13,0
23.II	Пыльца	4,0	9,5	11,8
16.III	Пыльца	2,0	6,6	12,2
9.IV	Пыльца	1,5	6,6	24,4

В период органогенеза цветка, когда цветковые зачатки очень малы, основное количество фенолов приходится на долю кроющих чешуй, выполняющих защитную и трофическую роль. Очевидно, к этому следует добавить еще и регуляторную роль, так как кроющие чешуи непосредственно взаимодействуют с окружающей средой, и через них идет информация в зачатки цветка. По мере роста элементов цветка изменяется весовое соотношение чешуи / цветковый зачаток и в последнем увеличивается содержание фенолов. Например, концентрация полифенолов у сорта Спартак в январе на этапе "тетрады микроспор" в чешуях была 11,9%, в цветковых зачатках 5,77%, в марте на этапе "пыльца" в чешуях 10,2% и в цветковых зачатках 9,0%.

Дисперсионный анализ экспериментальных данных по пяти сортам показал, что влияние этапов развития генеративных почек на содержание в них фенолов составляет  $\eta^2 = 0,75$ ,  $\rho = 0,999$ .

Среди выделенных фенолов нами идентифицированы хлорогеновая, изохлорогеновая и неохлорогеновая кислоты, два производных пара-кумаровой кислоты (пара-кумароилхинные кислоты), флаваноны нарингенин и прунин. О наличии в генеративных почках персика хлорогеновой кислоты, нарингенина и прунина сообщают В.И. Кривенцов, К. Анандараджа, А.А. Садыков, Х.И. Исаев, А.И. Исмаилов [12, 17].

Все выделенные нами фенольные соединения являются ингибиторами ростовых процессов [7, 5]. При использовании в качестве биотеста пыльцы персика было установлено, что степень подавления процесса прорастания пыльцы при добавлении фенолов зависела от концентрации вещества и его химической природы. Самый слабый ингибитор роста - хлорогеновая кислота, за ней следуют изохлорогеновая кислота и прунин. Сильными ингибиторами являются нарингенин, а также производные пара-кумаровой кислоты.

Поскольку хлорогеновая кислота в количественном отношении является основным фенольным соединением на протяжении всего периода развития почки, то динамика ее содержания повторяет динамику суммарного содержания фенолов. Что же касается флаванонов, то прослеживается четкая закономерность: вхождение в глубокий покой сопровождается увеличением уровня флаванонов, выход из него – падением их концентрации [5]. В целом влияние этапов морфогенеза на содержание нарингенина в почках составило  $\eta^2 = 0,42$ ,  $\rho = 0,99$ . В специально поставленных опытах была изучена динамика содержания флаванонов после выхода из покоя на этапе формирования мужского гаметофита [5]. В этом опыте испытывались температуры от +3° (нижний предел формирования мужского гаметофита у персика) до +16° (верхний предел). Как и следовало ожидать, интенсивность формирования мужского гаметофита, и также рост почек зависели от температуры опыта. Аналогичные различия получены и по содержанию флаванонов. Во всех вариантах опыта переход к этапу "пыльца" сопровождается гидролизом нарингенина, но при температурах +3° и +6° отмечалось небольшое увеличение количества прунина, тогда как при более высоких температурах содержание этого флаванона не изменялось.

В вегетативных почках флаванонов больше, но, так же, как и в генеративных, отмечено снижение их уровня к весне.

**5. Соотношение регуляторов роста в генеративных почках.** Рассматривая гормональную регуляцию морфогенеза генеративных почек персика как результат сбалансированного действия стимулирующих и ингибирующих факторов [11], мы попытались объединить разрозненные экспериментальные сведения по регуляторам роста (табл. 4.). Для этого содержание и активность регуляторов роста были выражены в баллах, причем пятью баллами оценивалось содержание регулятора в период его

Таблица 4

Динамика содержания (баллы) ингибиторов и стимуляторов роста на основных этапах морфогенеза генеративных почек персика

Тип регулятора	Вещество	Уплотнение конуса нарастания	Органогенез цветка	Спорогенная ткань пыльника	Микроспора	Пыльца
Ингибиторы	Хлорогеновая кислота	3	5	1.5	1	0.5
	Нарингенин	0	1-2	4-5	2-0.5	0
Стимуляторы	Гиббереллины	0	0-2	2-3	4-3	3-5
	Ауксины	5	0-0.5	1.5	2	2-3
	Цитокинины	1	1	3	4	4-5

максимума. Установлено, что начальный этап морфогенеза почки (уплощение конуса нарастания) контролируется ауксинами, при этом превалирует фракция щелочных ауксинов. В период органогенеза цветка усиливается действие таких ингибиторов, как хлорогеновая кислота. По мере прохождения покоя, который совпадает с этапом формирования спорогенной ткани пыльника, в почках накапливаются сильные ингибиторы, такие, как нарингенин. В этот же период отмечено постепенное увеличение пула гиббереллиноподобных веществ. Выход из покоя и дальнейшее развитие почек контролируется соотношением ауксинов, цитокининов и гиббереллинов с преобладанием последних на фоне низкого уровня фенольных ингибиторов. В табл. 4. нет данных об участии в регуляции морфогенеза таких важных гормонов, как этилен и абсцизовая кислота. Корреляция между содержанием абсцизовой кислоты и покоем была обнаружена у почек березы, яблони, смородины и бука, однако у почек персика подобной корреляции не оказалось [2].

Таким образом, процессы развития генеративных почек персика регулируются путем взаимодействия гормонов и веществ негормональной природы. Взаимодействие между этими соединениями частично связано с прямым влиянием одних на активность других, частично на их биосинтез (метаболическая вилка). По нашим данным, фенольные соединения участвуют в процессах окисления ИУК. Хлорогеновая кислота и ее изомер неохлорогеновая кислота выступают в роли ингибиторов ауксиноксидазы, производные пара-кумаровой кислоты обладают стимулирующим действием на ауксиноксидазу. Антигиббереллиновым действием в отношении синтеза и активности амилазы характеризуется нарингенин [5].

### Выводы

1. Сравнительное изучение содержания веществ гормональной природы: ауксинов, гиббереллинов, цитокининов и фенольных ингибиторов роста в генеративных и вегетативных почек выявило различия в динамике их соотношения, связанные со специализацией почки.

2. Начальный этап дифференциации почек на генеративные и вегетативные характеризуется максимальным уровнем содержания веществ ауксиновой природы, период органогенеза цветка – накоплением хлорогеновой кислоты. Во время формирования спорогенной ткани пыльника синтезируются сильные ингибиторы роста (нарингенин и прунин) и отмечается накопление цитокининов и гиббереллинов.

3. Весеннее развитие генеративных почек контролируется соотношением ауксинов, цитокининов и гиббереллинов на фоне низкого уровня фенольных ингибиторов роста.

### Список литературы

1. Витковский В.Л. Морфогенез плодовых растений. - Л.: Колос, 1984.- 207с.
2. Дерфлинг К. Гормоны растений. Системный подход.- М.: Мир, 1985.- 304с.
3. Елманов С.И. Зимнее развитие цветочных почек персика и абрикоса // Труды Никит. ботан. сада.-1959. - Т. 29.- С.251-263.
4. Елманова Т.С. Морфофизиологическое изучение генеративных почек персика в связи с зимостойкостью // Бюл. Никит. ботан. сада.- 1987.- Вып.64 - С.76-80.
5. Елманова Т.С. Фенольные соединения персика. Деп. ВИНТИ №0287. 0046765, 1987, 54с.
6. Елманова Т.С. Содержание гиббереллиноподобных веществ в почках персика в связи с зимостойкостью // Труды Никит. ботан. сада. – 1989. - Т.108. - С.21-36.
7. Елманова Т.С., Шевченко С.В. Реакция мужского гаметофита на действие фенольных соединений // Бюл. Никит. ботан. сада. – 1985.- Вып. 56. - С.83-86.
8. Запрометов М.Н. Фенольные соединения растений. Биосинтез, превращения и функции // Новые направления в физиологии растений. - М.: Наука, 1985. - С.143-162.
9. Исаева И.С. Органогенез плодовых растений. -М., 1977. – 135с.
10. Кефали В.И. Рост растений и природные регуляторы // Физиология растений. – 1978. - Т.25. Вып.5. - С.975-990.
11. Кефали В.И. Природные ингибиторы как факторы регуляции роста // Фитогормональная регуляция роста и развития растений. – Киев: Наукова думка, 1985. - С.110-116.
12. Кривенцов В.И., Анандараджа К. Сезонные изменения нарингенина и хлорогеновой кислоты в почках персика в период покоя // Физиология и биохимия культурных растений. - Т.5.- С.61-64.
13. Кулаева О.Н. О механизме действия цитокининов // Рост растений и природные регуляторы. - М.: Наука. - 1977. - С.216-234.
14. Кулаева О.Н. О регуляции экспрессии генов в растительных клетках // Физиология растений – 1978. - Т.25, Вып.5. - С.990-1088.
15. Мазин В.В., Шашкова Л.С. Изучение природных цитокининов // Рост растений и природные регуляторы. - М.:Наука, 1977.- С.122-142.
16. Николаева М.Г. Методы определения фитогормонов и фенольных веществ - Л.:Наука, 1979.- 79с.
17. Садыков А.А., Исаев Х.И., Исмаилов А.И. Полифенолы коры корней и цветков *Persica vulgaris* // Химия природных соединений. – 1975. – Вып.2. - С.281-282.

18. Серебряков Э.П. Методы количественного определения гиббереллинов в растительных объектах // Рост растений и природные регуляторы. - М.: Наука, 1977 - С.105-121.

19. Уоринг Ф., Филлипс И. Рост растений и дифференцировка. - М.: Мир, 1984. – 512 с.

### **Content of growth regulators in the peach buds**

Elmanova T.S.

Common regularities in the level changes of auxins, gibberellins, cytokinins and phenol inhibitors in generative peach buds were studied. It was determined that initial stage of morphogenesis is controlled with auxins. At the period of flower elements formation the influence of such inhibitors as chlorogen acid become more intensive. During the rest period which is coincide with the stage of anther sporogen tissue formation passing strong inhibitors of phenol nature are accumulated, gradual increase of gibberellin substances pool was observed. Issue from the rest and further buds' development are controlled with correlation of auxins, cytokinins and gibberellins, with the predominance of gibberellins on the background of phenol inhibitors low level.