УКРАЇНСЬКИЙ БОТАНІЧНИЙ ЖУРНАЛ

В.М. ГЕНЕРАЛОВА, В.А. ВАСЮК, Л.І. МУСАТЕНКО

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, м. Київ, МСП-1, 01601, Україна

АБК ТА ГІБЕРЕЛІНИ В ОРГАНАХ ПРОРОСТКІВ *PHASEOLUS VULGARIS* L. І *ZEA MAYS* L.

Ключові слова: Phaseolus vulgaris *L.*, Zea mays *L.*, *абсцизова кислота, гіберелінoподібні речовини, проростки, органи*

Абсцизова кислота та гібереліни присутні в усіх тканинах і органах рослин у різні періоди життя, взаємодіють з іншими гормонами і виявляють широкий спектр впливу на їх морфологічний та фізіологічний стан [3, 5, 19]. Вони беруть участь у фізіологічних процесах проростання та дозрівання насіння і переході його у стан спокою, який, зокрема, індукують гібереліни, а підтримує АБК. Показано, що дозрівання плодів також регулюється безпосередньо співвідношенням АБК і гіберелінів [22]. Накопичення етилену та гіберелінів і зменшення рівнів АБК у міжвузлях рису призводило до старіння та апоптозу епідермальних клітин [23]. Інгібування синтезу гіберелінів активувало сигналінг АБК у культурі зародків *Zea mays* L. [24]. Екзогенна АБК пригнічувала ріст колеоптилів і міжвузлів рису, тобто процеси, які контролюються гіберелінами, а швидкість росту рослин залежала від співвідношення промотора росту — гібереліна та інгібітора — АБК [17, 18]. Ініціація гіпонастичного росту кореня *Oryza sativum* L. залежала від вмісту етилену, АБК та ІОК, а швидкість його росту — від етилену, АБК і гіберелінів [23]. Якщо додати до наведених вище результатів досліджень останнього десятиліття ще відомі факти про можливість «переключення» шляхів синтезу у напрямку ГПР чи

© В.М. ГЕНЕРАЛОВА, В.А. ВАСЮК, Л.І. МУСАТЕНКО, 2009

АБК залежно від використання спільного попередника їх біосинтезу, а також ангагонізм їх дії [22], то стає зрозумілим інтерес до поглибленого вивчення як розподілу, так і співвідношення цих фітогоромнів в органах рослин.

Використання проростків *Z. mays* L. та *Phaseolus vulgaris* L. для дослідження локалізації АБК і гіберелінів у різних їх органах зумовлено тим, що одно- та дводольні рослини різняться типами росту, кількостями нативних ростових речовин, характером фотосинтезу, швидкістю окислювальних реакцій, різною чутливістю тканин до дії фітогормонів, біохімічними показниками та ін. [2, 4, 12]. Застосування інгібіторів синтезу індивідуальних гіберелінів показало, що пригнічення синтезу $ГК_1$ та $ГК_3$, які стимулюють ріст стебла, призводило до зменшення розмірів стебла однодольних рослин *Lolium temulentum* L. на 35 %, а дводольних — *Pisum sativum* L. — на 10 % [21]. Метою представленого експериментального дослідження було з'ясування особливостей змін рівнів мобільних та іммобільних форм АБК і гіберелінів у різних органах проростків *Z. mays* і *Ph. vulgaris* на ранніх етапах розвитку.

Матеріал і методи досліджень

Відкаліброване насіння *Ph. vulgaris* сорту Білозерна та *Z. mays* гібриду Буковинський 11Т після стерилізації витримували у дистильованій воді 3 год. і пророщували в темряві за 27 °С протягом 4-х діб. Морфофізіологічні дослідження (лінійні розміри, маса сирої і сухої речовин кореня, гіпокотиля, зародкового листка квасолі і кореня, мезокотиля, бруньки кукурудзи) та визначення вмісту вільних і зв'язаних форм гормонів проводили на 48, 72, 96 год., протягом яких тривав активний ріст органів [1].

Фітогормони екстрагували 80 %-м етанолом з антиоксидантом (0,002 % диетилдитіокарбамат натрію) [6]. Вільну АБК екстрагували з водного залишку диетиловим ефіром, зв'язану — виділяли після гідролізу 1N NaOH у 30%-му етиловому спирті. Обидві форми АБК очищали за допомогою кислотно-лужної переекстракції водного залишку і тонкошарової хроматографії (ТШХ). Кількісно АБК визначали на високоефективному рідинному хроматографі «Pye Unicam» і розраховували за програмою «Chrom-6». ГПР почергово екстрагували з водного розчину при pH 2,8 етилацетатом (вільні форми) та водонасиченим бутиловим спиртом (зв'язані). Після ТШХ активність отриманих фракцій ГПР визначали методом біотесту за довжиною гіпокотилів проростків салату сорту Кучерявець одеський. Кількість ГПР розраховували за еквівалентом до $ГК_3$. Повторюваність дослідів трикратна. Кількісні дані обробляли статистично (P = 2,6—3,5 %).

Результати дослідження та їх обговорення

Аналіз отриманих результатів показав, що проростання насіння *Ph. vulgaris* супроводжується інтенсивним ростом гіпокотиля, який досягав 1,8 см на 48 год. (рис. 1). У цей період ріст відбувається за рахунок активного розтягування клітин [7]. У подальшому спостерігалося збільшення довжини

гіпокотиля, але несуттєве. На відміну від гіпокотиля мезокотиль кукурудзи ріс рівномірно. Розміри коренів, зародкового листа квасолі та його аналога у кукурудзи — бруньки збільшувалися поступово.

У *Ph. vulgaris* відзначемо приріст маси сирої речовини гіпокотиля уп'ятеро (від 0,05 до 0,25 г), маса коренів і зародкових листків змінювалась значно менше (рис. 2). Маса сирої речовини органів проростків *Z. mays* збільшувалася повільно. Найменш оводненими органами були листки квасолі та бруньки кукурудзи. Це, можливо, пов'язано з відсутністю фотосинтезу на момент дослідження у листків, які перебували в умовах гетеротрофного живлення. Корені досліджуваних проростків мали значну швидкість росту за рахунок розтягування клітин [7], яке супроводжувалось інтенсивним поглинанням води, активацією біосинтезу важливих продуктів метаболізму, що зумовлює збільшення їх ваги. Тривалість росту гіпокотиля та мезокотиля обмежена, головна їх функція — винесення на поверхню грунту сім'ядолей у квасолі та бруньки у кукурудзи. Відсутні суттєві зміни у накопиченні маси сухої речовини у гіпокотилі *Ph. vulgaris* і мезокотилі *Z. mays*.

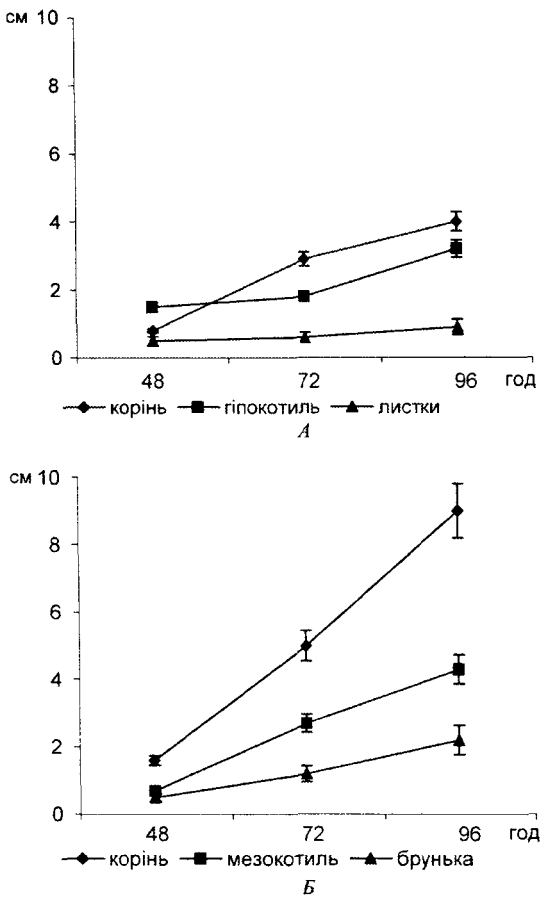

Рис. 1. Довжина органів проростків *Ph. vulgaris* (*А*) та *Z. mays* (*Б*)

Fig. 1. The organs of seedling length of *Ph. vulgaris* (*A*) and *Z. mays* (*Б*)

Як відомо, кожен вид рослин і періоди їхнього розвитку (вегетативний, генеративний) характеризуються певним балансом фітогормонів і співвідношенням їх вільних та кон'югованих форм [11, 20]. Дослідження змін вмісту АБК і гіберелінів у різних органах проростків квасолі та кукурудзи протягом чотирьох діб показали, що на 48-му годину у *Ph. vulgaris* вміст зв'язаної АБК був практично однаковим у всіх органах. Найвищу кількість вільної АБК виявлено в корені (табл. 1). На 72 год. найінтенсивніше накопичення фітогормону, особливо вільної форми, встановлено в листках та корені. У подальшому (на 96 год.) у корені та гіпокотилі зростала частка зв'язаної АБК.

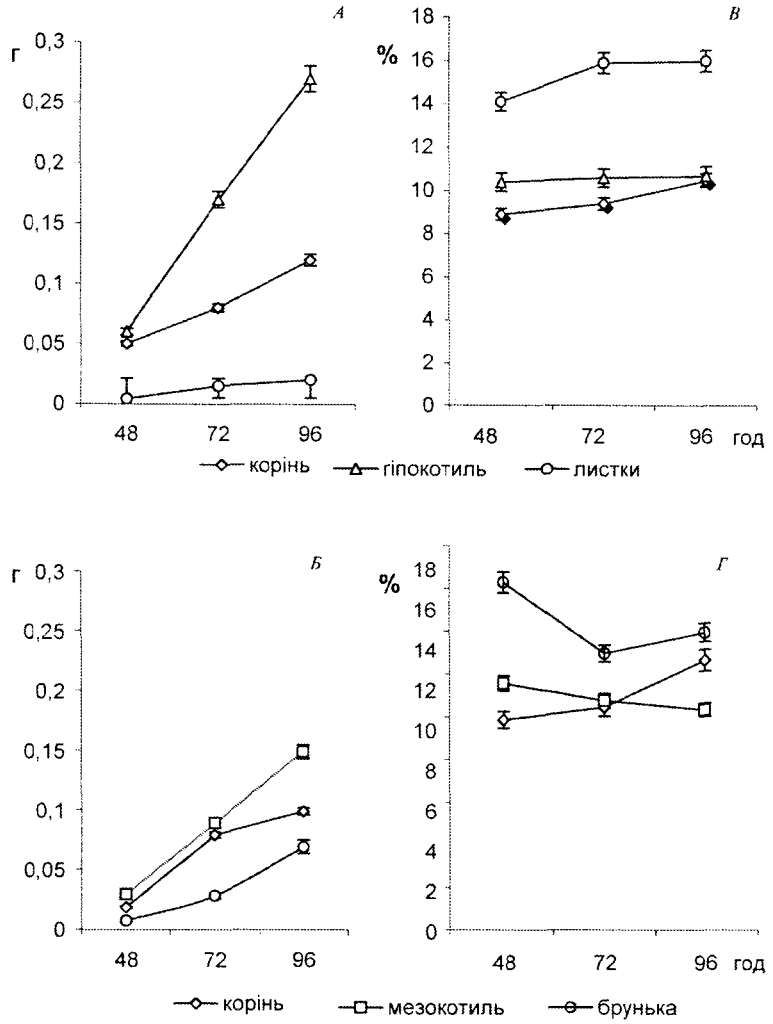

Рис. 2. Маса сирої (*А*, *Б*) та сухої (*В*, *Г*) речовини органів проростків *Ph. vulgaris* (*А*, *В*) та *Z. mays* (*Б*, *Г*)

Fig. 2. The fresh (*А*, *Б*) and dry (*В*, *Г*) mass of seedling organs of *Ph. vulgaris* (*А*, *В*) and *Z. mays* (*Б*, *Г*)

Слід зазначити, що протягом росту діапазон коливання кількості обох форм АБК у гіпокотилі досить стабільний. Найвищими були показники вільної АБК порівняно з іншими органами. Крім того, на початку експерименту для нього характерне збільшення вмісту вільної АБК, а наприкінці — зв'язаної. Таке підвищення рівня АБК може пояснюватися недостатньою швидкістю інактивації надлишків вільної форми, нечутливістю молодих тканин до фітогормону або низькою активністю окиснювальних ферментів [3].

Для проростків *Z. mays* протягом експерименту (48, 72 та 96 год.) характерне лінійне зростання кількості вільної АБК і зменшення — зв'язаної в усіх

Таблиця 1. **Вміст АБК в органах проростків *Phaseolus vulgaris* L. та *Zea mays* L., нг/г м. с. р.**

Органи проростків	Тривалість пророщування, год.					
	48		72		96	
	вільна	кон'югована	вільна	кон'югована	вільна	кон'югована
Ph. vulgaris						
Листок	14+1	15+1	36+5	19+1	12+1	12+2
Гіпокотиль	23+1	17+2	22+1	20+1	23+1	25+3
Корінь	32+3	14+1	46+4	15+1	32+2	49+5
Z. mays						
Брунька	85+6	123+9	99+6	55+2	105+10	56+1
Мезокотиль	68+3	87+6	85+6	60+3	96+4	51+2
Корінь	35+4	41+3	43+2	49+1	66+2	48+1

органах, але найбільше накопичення обох форм АБК (особливо кон'югованої) виявлено у бруньці на 48 год. проростання (табл. 1). У *Ph. vulgaris* встановлено найвищу активність вільних ГПР у корені та гіпокотилі протягом дослідження, а в листках кількість обох форм майже однакова (табл. 2). На 96 год. зросла кількість зв'язаних ГПР, що може свідчити про інтенсифікацію процесів кон'югації.

Таблиця 2. **Вміст ГПР в органах проростків *Phaseolus vulgaris* L. та *Zea mays* L., нг/г м. с. р. по $ГК_3$.**

Органи проростків	Тривалість пророщування, год.					
	48		72		96	
	вільна	кон'югована	вільна	кон'югована	вільна	кон'югована
Ph. vulgaris						
Листок	21+2	29+1	23+2	16+1	23+1	41+5
Гіпокотиль	35+3	26+2	41+3	25+4	28+4	40+3
Корінь	50+4	36+2	46+2	28+2	30+3	30+1
Z. mays						
Брунька	885+31	634+34	206+29	116+15	197+15	134+13
Мезокотиль	941+36	131+19	146+13	89+14	295+21	562+27
Корінь	753+49	616+25	554+28	156+19	336+35	252+31

В усіх органах *Z. mays* на ранніх стадіях росту проростків (48 год.) переважали мобільні форми ГПР над іммобільні, що пов'язано з активацією ростових процесів після виходу насіння зі стану спокою. У подальшому активність обох форм ГПР знижувалася. Винятком є мезокотиль, в якому на пізніших етапах (72 і 96 год.) зменшувалася кількість вільних форм і зростала — зв'язаних, які

після гідролітичного розщеплення можуть бути використані для формування та функціонування інтеркалярної меристеми стебла.

Відомо, що гомеостатичний стан рослинного організму досягається шляхом збалансованості всіх метаболічних і біохімічних реакцій, що координуються сигнальними системами [5, 15]. Останніми роками розширено дослідження взаємодії фітогормонів, їх плейотропного ефекту та ролі у фізіологічних процесах, які зумовлюють цілісність рослини [9, 10, 19]. При цьому значна увага приділяється вивченню генів контролю синтезу та катаболізму фітогоромнів. Так, показано, що у процесі проростання насіння одні і ті самі гени синтезу гіберелінів — *GA20ox1 GA20ox2, PSCA20ox1, GA3ox, PSGA3ox, PsGA20x1, PsGA20x2* та АБК — *AtNCED6, CYP707A2* — здатні регулювати вміст фітогормонів як в одно-, так і дводольних рослин, кількісні показники яких залежали від виду рослини [13, 22]. Крім того, активність генів неоднакова на різних стадіях розвитку рослин. Наприклад, у гороху виявлено ген *PsCPs1*, котрий ініціював початкові реакції синтезу гіберелінів і виявляв високу активність в органах, які інтенсивно ростуть (зародкові листки, стебло та корені), а в сім'ядолях його активність була суттєво меншою [14]. Антагоністична дія АБК та гіберелінів виявляється вже на генетичному рівні. Показано, що експресія генів синтезу АБК (*AtABA2, AAO3*) пригнічувала активність гена синтезу гіберелінів (*AtGA3ox2*) [22]. Отже, інтенсивні фізіологічні процеси, які зумовлюють початковий ріст проростків, пов'язані з формуванням їхніх органів і реалізацією спадкової програми у наступні періоди. Вивчення співвідношення компонентів гормонального комплексу дає можливість оцінити стан фізіологічних процесів, які відбуваються в органах рослин [8]. Притаманна рослинному організму каскадність дії фітогормонів, коли один фітогормон впливає на синтез, розпад або інактивацію іншого [15, 16], може регулюватися синтезом *de novo*, зміною шляхів синтезу, а в разі використання спільного попередника — взаємооберненим перетворенням і катаболізмом їхніх форм

Таблиця 3. **Співвідношення вільних форм ГПР/АБК в органах проростків *Phaseolus vulgaris* L. та *Zea mays* L.**

Органи проростків	Тривалість пророщування, год.		
	48	72	96
Ph. vulgaris			
Первинний листок	1,6	0,7	1,8
Гіпокотиль	1,5	1,9	1,2
Корінь	1,6	1,0	0,9
Zea mays L.			
Брунька (колеоптиль з листками)	17,5	2,1	1,9
Мезокотиль	27,7	1,7	3,1
Корінь	19,0	12,9	5,1

[3]. Співвідношення між ГПР та АБК свідчать про їх перерозподіл, зокрема вільних форм у різних органах проростків (табл. 3). За несуттєвих відмінностей співвідношення фітогормонів у квасолі та кукурудзи на 48-му год. цей показник був на порядок вищим, що свідчить про значне переважання гіберелінів над АБК. У процесі пророщування до 96-ї год. співвідношення мобільних та іммобільних гіберелінів і АБК в органах проростків одно- та дводольних рослин знижується.

Таким чином, згідно з результатами нашого дослідження, одно- та дводольні рослини мають однаковий якісний склад АБК і гіберелінів, але різняться їх кількістю та співвідношенням вільних і зв'язаних форм.

1. *Васюк В.А., Веденічева Н.П., Генералова В.М. та ін.* Фітогормональний комплекс проростків кукурудзи в гетеротрофний період росту // Укр. ботан. журн. — 2006. — **63**, № 6. — С. 829—836.
2. *Головацкая И.Ф., Карначук Р.А.* Динамика роста растений и содержание эндогенных фитогормонов в процессе ското- и морфогенеза фасоли // Физиол. растен. — 2007. — **54**, № 3. — С. 461—468.
3. *Кефели В.И., Коф Э.М., Власов П.В., Кислин Е.Н.* Природный ингибитор роста — абсцизовая кислота. — М.: Наука, 1989. — 184 с.
4. *Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А.* Физиология растений. — М.: Высш. шк., 2005. — 735с.
5. *Кулаева О.Н., Прокопцева О.С.* Новейшие достижения в изучении механизма действия фитогормонов // Биохимия. — 2004. — **69**, № 3. — С. 293—311.
6. *Методические* рекомендации по определению фитогормонов. — Киев: Ин-т ботаники АН УССР, 1988. — 78 с.
7. *Мусатенко Л.І., Мартин Г.І., Ситник К.М.* Деякі структурно-функціональні особливості росту органів зародка квасолі // Укр. ботан. журн. — 1982. — **39**, № 4. — С. 49—53.
8. *Озолина Н.В., Прадедова Е.В., Саляев Р.К.* Динамика изменения гормонального статуса корнеплода столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) в онтогенезе и ее связь с динамикой накопления сахаров // Изв. РАН, Сер. Биология. — 2005. — № 1. — С. 30—35.
9. *Полевой В.В.* Физиология целостности растительного организма // Физиол. раст. — 2001. — **48**, № 4. — С. 631—643.
10. *Ситник К.М.* Цілісність рослинного організму // Укр. ботан. журн. — 2001. — **58**, № 3. — С. 292—300.
11. *Ситник К.М., Мусатенко Л.І., Мартин Г.І. та ін.* Клітинний ріст і фітогормональний комплекс первинного листка *Phaseolus vulgaris* L. // Укр. ботан. журн. — 2002. — **59**, № 3. — С. 239—246.
12. *Шереметьев С.Н., Гамалей Ю.В.* Водный режим травянистых растений на градиенте влажности почвы. V. Структурно-функциональные корреляции на материале однодольных и двудольных растений // Ботан. журн. — 2003. — **88**, № 5. — С. 1—22.
13. *Ayele B.T., Ozga J.A., Reinecke D.H.* Regulation of GA biosynthesis genes during germination and young seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.) // J. of Plant Growth Regulation. — 2006. — **25**, № 3. — P. 219—232.
14. *Ayele B.T., Ozga J.A., Kuperin L.V., Reinecke D.M.* Development and embryo axis regulation of gibberellin during germination and young seedling growth of pea // Plant Physiol. — 2006. — **142**. — P. 1267—1281.
15. *Benkova E., Chist A., Triml J., Jugens G.* Role of hormonal regulation of auxin and cytokinin in lateral root development // XV Congress Federation of European Societies of Plant Biology (17—21 July 2006), Lyon, France. — 2006. — P. 117.
16. *Chow B., Court P.M.* Hormone signaling from a developmental context // J. Experiment. Botany — 2004. — **55**, № 395. — P. 247—251.

17. *Hoffmann-Benninh S., Kende H.* On the role of abscisic acid and gibberellin in the regulation of growth in rice // Physiol. Plant. — 1992. — **99,** № 4. — P. 1156—1161.
18. *King R.W. Junttila O., Mander L.N., Beck E.J.* Gibberellin structure and function: biological activity and competitive inhibition of gibberellin 2- and 3-oxidases // Physiol. Plant. — 2004. — **120**, № 2. — P. 287—293.
19. *Klämbt D.* Plant hormone receptors from binding proteins to functional units / In: Plant hormone signal reception and transduction. Eds. Smith A.R. et al. — Kluwer Academic Publishers, 1996. — P. 37—39.
20. *Kowalczyk S., Jakulowa A., Ziwelinsks E., Bandurski R.* Bifunctional indole-3-acetyl transferase catalyses synthesis and hydrolysis of indole-3-acetyl-myo-inositol in immature endosperm of *Zea mays* //Physiol. Plant. — 2003. — **119**, № 2. — P. 165—174.
21. *Mander L.N., Sherburn M., Camp D. et al.* Effects of during modifided gibberellins on flowering and growth in *Lolium temuletum* and *Pisum sativum* // Phytochemistry. — 2000. — **53**. №4.9. — P.519—528.
22. *Mitsunory S., Atsushi H., Ayuko K. et al.* Regulation of hormone metabolism in arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid and of gibberellin metabolism // The Plant J. — 2006. — **48**, № 3. — P. 354—366.
23. *Steffens B. E., Sauter M.J.* Epidermal cell death in rice is regulated by ethylene, gibberellin, and abscisic acid // Plant Physiol. — 2007. — **145**. — P. 237—241.
24. *White C.N., Rivin C.J.* Gibberellins and seed development in maize. Gibberellin synthesis inhibition enhances abscisic acid signaling in cultured embryos // Plant Physiol. — 2000. — **122,** № 4. — P. 1089—1098.

Рекомендує до друку
К.М. Ситник

Надійшла 13.06.2008

В.Н. Генералова, В.А. Васюк, Л.И. Мусатенко

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, г. Киев

АБК И ГИББЕРЕЛЛИНЫ В ОРГАНАХ ПРОРОСТКОВ *PHASEOLUS VULGARIS* L. И *ZEA MAYS* L.

Методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и биотестов показана локализация свободных и связанных АБК и гиббереллиноподобных веществ (ГПВ) в органах четырехдневных проростков *Z. mays* и *Ph. vulgaris*. Установлено, что в проростках кукурузы количественно преобладают ГПВ по сравнению с проростками фасоли. Для фасоли показано максимальное количество АБК в корнях, а для кукурузы — в почке.

Ключевые слова: Phaseolus vulgaris L., Zea mays L., *абсцизовая кислота, гиберелинноподобные вещества, проростки, органы.*

V.N. Generalova, V.A. Vasjuk, L.I. Musatenko

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciencis of Ukraine, Kyiv

ABA AND GIBBERELLINS IN ORGANS OF SEEDLINGS OF *PHASEOLUS VULGARIS* L. AND *ZEA MAYS* L.

Localisation of free and bound ABA and gibberellin-like substances (GLS) was studied in organs of 4-day seedlings of *Z. mays* and *Ph. vulgaris*, using methods of a high-efficiency liquid chromatography and biotests. Higher quantities of GLS were found in maize seedlings, as compared to bean seedlings. The maximum quantity of ABA in bean was determined in roots, while in maize it was found in buds.

Key words: Phaseolus vulgaris, Zea mays, abscisic acid, gibberellin-like substances, seedlings, organs.