

АКАДЕМИЯ НАУК ССР МОЛДОВА
Институт физиологии растений

На правах рукописи

ВАХБИ РИФАТ

УДК 581.144+57.05.633.15+547.973

РОСТ ПРОРОСТКА КУКУРУЗЫ И ОБРАЗОВАНИЕ АНТОЦИАНА
В УСЛОВИЯХ ДЕЗИНТЕГРАЦИИ И ХИМИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ
/ 03.00.12- физиология растений /

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кишинев 1991

Работа выполнена во Львовском университете им. И. Франко
на кафедре морфологии, систематики и физиологии растений

Научный руководитель : доктор биологических наук,
профессор Терек О.И.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор Таргон П.Г.
доктор биологических наук
Демкив О.Т.

Ведущая организация : молдавский научно-исследовательский
института кукурузы и сорго НПО "Порумбень"

Защита диссертации состоится "23" мая 1991 г.
в 14 час. на заседании специализированного Совета Д.012.06.01
при Институте физиологии растений АН ССР Молдова

Адрес: 277018, Кишинев, ул. Лесная, 22, Институт физиологии
растений АН ССР Молдова

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии
растений АН ССР Молдова

Автореферат разослан "26" апреля 1991 г.

Ученый секретарь
специализированного совета,
кандидат биологических наук



Клевцова Е.В.

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00816087 (U)



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время рост рассматривают как процесс новообразования структур, тесно связанный с биосинтезом белка. С помощью физиологически активных веществ, изменяющих интенсивность роста, можно активно воздействовать на многие метаболические центры, как мишени вмешательства в регуляторные механизмы клетки и добиваться функциональных изменений в клетке, органе и целом растения / Кефели, 1970, 1985, 1990 ; Калинин, 1973, 1985, 1988/.

Клеточный подход в изучении роста, получивший широкое распространение в последнее время, внес много нового в наши знания о запуске ростовых процессов, о последовательности событий, обеспечивающих морфогенез / Иванов, 1974, 1985 ; Демкив, 1981 ; Обручева, 1982 /. Вместе с тем в литературе почти отсутствуют данные о влиянии экзогенных регуляторов роста на связь роста с обменом вторичных соединений, в частности образованием антоциана, что можно регистрировать на начальных этапах роста. Это особенно важно для познания темпов роста, ибо замедление их при становлении функций, связанных с продуктивностью, влияют на последующие фазы развития и ведут к снижению продуктивности. Необходимо также учесть, что протекание любого процесса в растении связано с фитогормональной регуляцией. В связи с этим изучение содержания эндогенных фитогормонов при экзогенной обработке растений физиологически активными веществами на фоне изменений в росте, содержании белка, свободных аминокислот и антоциана является актуальным.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось изучение действия фитогормонов - ауксина / ИУК / и гиббереллина / ГК /, а также синтетических препаратов - 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты / 2,4-Д / и хлорхолинхлорида / ССС / на ростовые процессы и образование антоциана в целом проростке и его дезинтегрированных частях. При этом основное внимание уделялось связи роста с содержанием белка, свободных аминокислот и эндогенных фитогормонов - ИУК и АБК.

В связи с этим были поставлены следующие задачи :

1. Изучить особенности роста целого проростка кукурузы и его дезинтегрированных частей при воздействии экзогенных регуляторов.
2. Выяснить влияние дезинтеграции и химической регуляции на образование антоциана.

АН УРСР

3. Исследовать изменения уровня эндогенных фитогормонов в изучаемых объектах при воздействии экзогенных регуляторов роста и расчленении целого на отдельные части.

4. Изучить уровень белка и свободных аминокислот при воздействии физиологически активных веществ в связи с образованием антоциана.

Научная новизна работы. Впервые исследовано влияние экзогенных регуляторов роста гормональной и негормональной природы на связь роста с образованием антоциана и его зависимость от целостности растительного организма. Показано, что показателем остановки растяжения клеток и перехода к дифференцировке можно считать образование антоциана, которое изучалось в системе целого растения и его изолированных частей. Выявлено, что дезинтеграция проростка кукурузы не препятствует образованию антоциана и что обработка физиологически активными веществами повышает синтез антоциана, но не изменяет его состав.

Новым подходом в работе является изучение связи роста с метаболизмом вторичных соединений на фоне изменений в азотном обмене, в частности уровня белка и свободных аминокислот. Выявлены существенные отличия этих показателей в целостном организме и при расчленении его на отдельные части.

Практическая значимость работы. Образование антоциана на свету в проростках кукурузы можно использовать для оценки темпов роста, т.е. антоциан может служить маркером ростовых процессов, поскольку отражает ход процесса дифференцировки и служит надежной и доступной мерой для анализа процесса морфогенеза.

Вклад автора. Разработана программа и методы исследований, выполнены анализы и получены экспериментальные данные. Проведена статистическая обработка результатов и дана их интерпретация.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на 2-й Всесоюзной конференции "Регуляторы роста растений" / Киев, 1968 /, Международном Биохимическом Конгрессе / Прага, 1988 /, ежегодных научных конференциях преподавателей и сотрудников биологического факультета Львовского университета и на заседании Львовского отделения Всесоюзного общества физиологов растений / Львов, 1990 /.

Публикации. Основные положения диссертации опубликованы в 3 печатных работах.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 125 страницах машинописи и состоит из введения, обзора литературы,

экспериментальной части, заключения, выводов и списка использованной литературы. Иллюстративный материал включает 14 рисунков и 9 таблиц. Список литературы содержит 251 наименование, из них 107 – на иностранных языках.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В наших исследованиях изучали остановку роста растяжением и переход к дифференцировке у проростков кукурузы, а также действие расчленения их на части в связи с ростом и образованием антоциана. При этом проростки подвергали воздействию фитогормонов / ГК и ИУК / и синтетических препаратов / ССС и 2,4-Д /. Эти приемы были направлены для усиления или ослабления перехода делящихся клеток меристем к растяжению и дифференцировке.

Объектом наших исследований служили проростки кукурузы сорта Закарлатская желтая зубовидная / *Zea mays L.* /, у которых антоцианированию подвергаются не только побеги, но и корни. Семена проращивали в кюветах на фильтровальной бумаге в темном термостате при температуре + 25°C. Через двое суток проростки кукурузы одинаковой начальной длины раскладывали по 10 штук в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную растворами исследуемых веществ. В каждую чашку наливали по 10 мл раствора физиологически активных веществ в концентрации 10 мг/л / ГК, ИУК и 2,4-Д / и 1 мл/л 60 % раствора ССС. Контролем служили чашки с таким же количеством дистиллированной воды. Дальнейший рост проростков проходил в теплице кафедры морфологии, систематики и физиологии растений Львовского университета при температуре + 25°C, фотопериоде 18 часов, освещенности 15 Вт/м² ФАР / лампы ЛД – 80 /. Для изучения роли света в процессах роста проростков и образовании антоциана был поставлен соответствующий темновой вариант опыта.

Измерение длин органов проростка и их антисинтетических частей проводили через 1, 3, 5 и 7 дней. Нами было проведено также расчленение проростков на части. Дезинтеграция целого достигалась микрохирургией. У исходных проростков отделяли корень с зерновкой, побег с зерновкой, а также изолировали эти органы, лишив их полностью зерновки, декапировали и разделяли на отрезки – базальный и апикальный. Все опыты проведены в трехкратной повторности, каждый вариант имел пятикратную повторность. Полученные результаты обрабо-

ганы статистически / Деркач и др., 1977 /.

Для решения поставленных задач нами были использованы следующие методики исследований.

Определение антоциана. Свежий растительный материал экстрагировали 70° / подкисленным до pH 3,0 / этанолом, наносили на хроматограммы и разделяли в двух системах растворителей: БУВ / 4:1:2 / и 15 % уксусной кислоте. При дневном и УФ свете отмечали окраску пятен, их Rf. Исследуемые пятна антоцианов алкирировали подкисленным этанолом и высушивали в термостате при + 50°С.

Путем последовательных разбавлений этанолом сухого остатка и с помощью показаний максимумов поглощения, полученных на спектрофотометре / Врсорд М 40 /, составляли концентрационную кривую, позволяющую оценивать содержание антоциана в отдельных частях растений. Для количественной оценки антоциана отрезали участки корня или побега окрашенной антоциановой зоны, взвешивали и растирали подкисленным этанолом. Извлечение пигмента проводили до полного обесцвечивания растительной ткани. Объединенные экстракты центрифугировали и определяли плотность раствора на СФ-26 при длине волны 540 нм.

Определение содержания белка проводили колориметрическим методом Лоури / Lowry et al, 1951 /.

Свободные аминокислоты определяли методом Б.П.Плешкова / 1935/. Зафиксированную жидким азотом растительную ткань подвергали экстракции 70° горячим этанолом, настаивали в течение 12 часов в холодильнике, затем проводили экстракции и промывки 70° этанолом до отрицательной реакции с нингидрином. Определение содержания свободных аминокислот проводили с помощью автоматического анализатора аминокислот типа Вд 1200 Е / ЧССР /. Аминокислоты разделяли на двух колонках с использованием ионообменных смол Amineх А-4 и Amineх А-5. Расчет площадей пиков аминокислот на спектрограммах проводили с помощью линейки с логарифмической шкалой.

Определение триптофана проводили химическим методом, который основан на образовании окрашенных в желтый цвет продуктов реакции триптофана с азотной кислотой. Интенсивность окраски измеряли на фотоэлектроколориметре / Ермаков и др., 1972 /.

Определение ауксина проводили по методике В.И.Кефели и соот. / 1973 /. После фиксации жидким азотом, трехкратной экстракции этиловым спиртом и упаривания объединенного экстракта до водного остатка проводили экстрагирование фитогормонов очищенным от переки-

си серным эфиром. Эфирную фракцию упаривали досуха и в сухом остатке определяли ИУК и АБК / последнюю выделяли по методике / Millington, 1974 / с помощью жидкостного хроматографа высокого давления Ray Unicam -4800 при длине волны 282 нм / для ИУК / и 254 нм / для АБК /. Для этой цели использовали колонку, заполненную Sheri-sorb 500 В. Элюцию фитогормонов с колонки проводили 40 % MeOH. Скорость потока жидкости 1 мл/мин при давлении 20 атм. Температу - ра термостата 40 °С. Эти определения были проведены в Киеве в Инсти-туте ботаники им. Н.Г.Холодного АН УССР. Идентичность пиков ИУК и АБК на спектрограммах, полученных из очищенных этанольных экстрак-тов растительной ткани, проверялись добавлением соответствующих пре-паратов. Результаты рассчитывали по калибровочным кривым.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Рост целого проростка и образование антоциана при воздей-ствии физиологически активных веществ

Антоцианы являются одним из легко определяемых внешне показате-лей процесса морфогенеза. Наблюдаемый параллелизм между темпами накопления антоцианов и некоторыми особенностями морфогенеза дал основание использовать эти пигменты как меру воздействия света на растения / Синнот, 1963 ; Mohr , 1981 ; Тохвер, 1982 /.

Интересным аспектом этой проблемы является влияние фитогормо-нов на образование антоцианов, что изучено крайне мало. Известно, что фитогормоны являются теми мощными факторами, которые способны усилить или ослабить рост отдельных органов растительного организ - ма. В наших исследованиях изучалось воздействие противоположных по действию веществ - ГК, ИУК, ССС и 2,4-Д на рост и образование антоциана в интактных проростках кукурузы и отдельных его частях. Полученные данные представлены в таблице 1.

Как видно из приведенных данных, гиббереллин подавляет рост корня и одновременно тормозит увеличение длины антоциановой зоны. Поскольку интенсивность блокировки роста и антоциановой зоны была не одинаковой, то отношение длины антоциановой зоны ко всей длине корня возрастает. ССС также блокирует рост корня в длину, однако он почти весь антоцианирован, в результате чего отношение антоциановой зоны ко всей длине наивысшее - 0,86, что на 21 % больше, чем в контроле. Следует также отметить, что все используемые нами физиоло-гически активные вещества повышают отношение длины антоциановой

Таблица 1

Влияние физиологически активных веществ на рост и величину антоциановой зоны органов
5-дневных интактных проростков кукурузы

Варианты	К о р е н ь			П о б е г		
	: Длина, мм	: Длина анто -	:	: Длина, мм	: Длина анто -	:
	: / L /	: циановой зо-	: L_a/L	: / L /	: циановой зо-	: L_a/L
	:	: ны, мм	:	:	: ны, мм	:
	: / L_a /	:		: / L_a /	:	
К	: 160,2 ± 7,4	: 115,3 ± 7,8	: 0,71	: 81,9 ± 3,6	: 39,2 ± 3,0	: 0,47
ГК	: 122,1 ± 5,0	: 101,5 ± 5,4	: 0,83	: 114,9 ± 2,9	: 76,2 ± 3,1	: 0,66
ССС	: 160,4 ± 7,5	: 138,5 ± 7,1	: 0,86	: 61,2 ± 3,0	: 45,4 ± 2,2	: 0,74
ГК + СССР	: 142,5 ± 6,7	: 116,5 ± 5,6	: 0,81	: 103,9 ± 4,9	: 51,3 ± 4,9	: 0,49
ИУК	: 127,1 ± 5,9	: 97,6 ± 4,7	: 0,76	: 75,6 ± 3,3	: 36,2 ± 3,3	: 0,55
2,4-Д	: 68,4 ± 5,2	: 55,1 ± 3,2	: 0,80	: 65,2 ± 2,4	: 35,2 ± 1,9	: 0,54
ИУК + 2,4-Д	: 69,8 ± 4,7	: 56,7 ± 3,4	: 0,82	: 64,8 ± 3,7	: 33,0 ± 3,2	: 0,51

зоны к общей длине побега, что затрудняет однозначную трактовку зависимости интенсивности роста от образования антоциана.

Выделенные нами пигменты из корней и побегов исследуемых проростков содержат один основной пигмент, обладающий одинаковыми характеристиками / рис. 1 /.

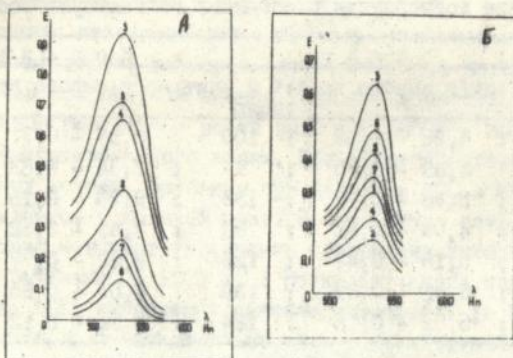


Рис.1. Спектры поглощения антоциана из корня / А / и побега / Б / 5-дневных интактных проростков кукурузы после инкубации их на воде / 1 /, гиббереллине / 2 /, CCC / 3 /, ГК + CCC / 4 /, ИУК / 5 /, 2,4-Д / 6 / и ИУК + 2,4-Д / 7 /.

Сопоставление спектров поглощения, данных R_f , цветных реакций с аналогичными данными литературы / Harberne et al., 1975 / позволяет прийти к заключению, что исследуемый антоциан кукурузы сорта Закарпатская желтая зубовидная представляет собой цианидин, который является доминирующим у разных сортов кукурузы.

Как видно из данных рисунка 1, максимумы поглощения этанольных экстрактов антоциана из корня и побега кукурузы после инкубации их на воде и на растворах физиологически активных веществ / были сходны, что свидетельствует о том, что исследуемые регуляторы не изменяют хроматографические и спектральные характеристики антоциана. Небольшой сдвиг максимума поглощения от 532,4 до 534,7 нм свидетельствует о наличии во всех вариантах цианидина.

Наши данные свидетельствуют о том, что в проростках кукурузы антоциан образуется только на свету и что в процессе роста содержание его возрастает, особенно в первые 5 дней. Сравнение изучаемых вариантов показывает, что исследуемые нами физиологически активные вещества повышают содержание антоциана и в побегах, и в корнях про-

роста кукурузы, но в наибольшей мере - ССС и 2,4-Д. При этом 2,4-Д снижает содержание антоциана в корнях на 33 % / табл. 2 /.

Таблица 2

Содержание антоциана в органах 5-дневных проростков кукурузы при воздействии экзогенных регуляторов роста

Варианты	П о б е г		К о р е н ь	
	: мг/г сырого веса:	% к конт:	: мг/г сырого веса:	% к конт:
		доля		доля
Контроль	: 4,09 ± 0,28	: 100	: 6,97 ± 0,71	: 100
ГК	: 3,69 ± 0,55	: 97	: 7,34 ± 0,82	: 105
ССС	: 5,46 ± 0,77	: 133	: 9,98 ± 0,15	: 143
ГК + ССС	: 4,03 ± 0,61	: 98	: 7,69 ± 0,62	: 110
ИУК	: 5,15 ± 0,44	: 126	: 8,42 ± 0,77	: 121
2,4-Д	: 5,31 ± 0,67	: 130	: 4,65 ± 0,65	: 67
ИУК + 2,4-Д	: 5,08 ± 0,15	: 124	: 5,24 ± 0,12	: 75

Итак, блокировка роста побега под действием ССС сопровождается повышением уровня антоциана, тогда как стимуляция роста гиббереллином не вызывает существенных изменений в содержании этого пигмента. Эти данные согласуются с представлением об антоцианах как маркерах остановки ростового процесса, которые накапливаются в закончивших рост дифференцированных клетках. Но неясной остается причина высокого содержания их в стимулированных в росте корнях под действием ИУК, наравне с угнетенными в росте гиббереллином и ССС, а также низкое содержание этих пигментов под влиянием 2,4-Д. Это говорит о сложных механизмах, регулирующих общий метаболизм, в частности, обмен вторичных соединений.

2. Рост дезинтегрированных частей проростка и образование антоциана при воздействии физиологически активных веществ

Изучение изолированных органов проростка показало, что рост последних замедлен по сравнению с ростом этих же органов целого растения. Исключение составляет корень с зерновкой, рост которого усиливается, особенно при действии ССС. Интересным является отсутствие резкого торможения роста изолированного корня гиббереллином по сравнению с интактным проростком, где усиленно растет побег. При совместном влиянии ССС и ГК наблюдается такая же картина. При этом антоциановая зона наибольшая в варианте с ССС и ССС + ГК, особенно у изолированного корня с зерновкой, где отношение $L_{\text{ант.}}/L$ равно соответственно 0,89 и 0,97, тогда как в контроле - 0,67.

Таким образом, образование антоциана в корне, у которого сохранен контакт с зерновкой, исключает влияние фотосинтата, формирующегося в побеге, на антоцианирование корня. В побеге при наличии зерновки также синтезируется антоциан. При этом отношение длины антоциановой зоны ко всей длине у изолированных органов остается практически таким же, как у интактных растений.

Декапитация изолированных органов с зерновкой не блокирует образование антоциана, наоборот, отмечено более интенсивное накопление его, чем при наличии апекса. Следует отметить, что все используемые нами регуляторы роста вызывают 100% - ное антоцианирование всего декапитированного корня. При этом образуется множество дополнительных корней, особенно при действии ССС и ИУК, которые также окрашиваются в красный цвет. В литературе есть данные о том, что декапитация вызывает увеличение содержания антоциана в корнях / Pilet, Takahashi, 1979 /. А поскольку апекс является источником синтеза АБК, ингибитора синтеза антоциана, то его отсутствие при декапитации, сопровождающееся усиленным образованием этого пигмента, свидетельствует о том, что АБК влияет на количество антоциана, а не на индукцию появления его.

Если изолировать корень от побега и от зерновки, то происходит резкое ингибирование роста. Удаление зерновки у изолированных органов вызывает во всех вариантах не только сильное торможение роста, но и блокировку образования антоциана. Вероятно, трофический фактор, имеющий акропетальное направление, контролирует не только рост / Ney, Pilet, 1980 /, но и образование антоциана.

Проводя дальнейшую, более глубокую дезинтеграцию органов на отдельные отрезки обнаружили, что у акропетальных сегментов антоциан не образуется; так как в эту часть отрезка входят зоны деления и растяжения, для которых наличие антоциана не характерно. Вместе с тем для базальных отрезков корней и побегов кукурузы / зона дифференцировки / отмечено образование антоциана в том случае, когда сохранен контакт отрезка с зерновкой.

В другой серии опытов изучали нарастание во времени одновременного действия дезинтеграции и физиологически активных веществ. Полученные данные представлены на рисунке 2, из которых видно, что отношение величины антоциановой зоны к общей длине органов достигает наибольшей величины при действии ССС, особенно в корнях, сохраняющих контакт с зерновкой.

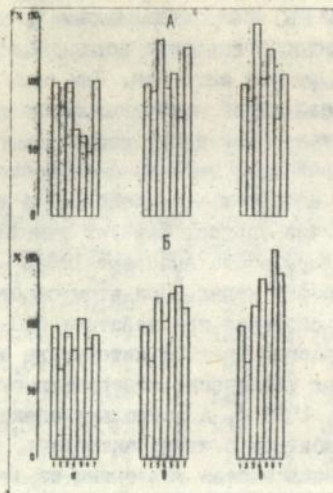


Рис.2. Отношение величины антоциановой зоны к длине корня / А / и побега / Б /, имеющих контакт с зерновкой при воздействии регуляторов роста.

а - через 1, б - 3, в - 5 дней роста органов на свету.
1 - контроль, 2 - ГК, 3 - ССС, 4 - ГК + ССС, 5 - ИУК,
6 - 2,4-Д, 7 - ИУК + 2,4-Д.

2,4-Д наоборот, резко снижает образование антоциана / длина антоциановой зоны на 27 % меньше, чем в контроле /. Инкубация корней на растворе с двумя регуляторами - ИУК и 2,4 - Д приводит к снятию ингибирующего действия 2,4-Д на длину антоциановой зоны. Следует также отметить уменьшение роста корней под действием гиббереллина, особенно в первые дни опыта, но со временем эта разница становится меньшей. Это происходит, по-видимому, из-за отсутствия побега, рост которого, как было показано выше, стимулируется гиббереллином. Что касается изолированного побега с зерновкой, то со временем во всех вариантах, кроме гиббереллина, наблюдается повышение отношения антоциановой зоны к общей длине, причем в наибольшей мере при воздействии 2,4-Д и 2,4-Д + ИУК.

Таким образом, для образования антоциана целостность проростка не является необходимым условием, однако, удаление зерновки подавляет этот процесс. Можно думать, что питательные вещества, поступающие из зерновки, являются необходимыми для образования антоциана.

источниками субстратного типа клеточной дифференцировки. Однако, сам процесс дезинтеграции связан не только с нарушением субстратного снабжения, но и с дефицитом гормонов, которые играют важную роль в ростовых и метаболических процессах.

Итак, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что связь между ростом интактного проростка кукурузы и его отдельных частей с уровнем антоцианов весьма сложна. При разной интенсивности роста, обусловленной воздействием экзогенных физиологически активных веществ, не всегда наблюдается адекватная положительная или отрицательная корреляция.

3. Влияние регуляторов роста на уровень эндогенных фитогормонов в связи с образованием антоциана

В связи с выше описанным было интересным проследить за возможной связью между содержанием эндогенных фитогормонов и образованием антоциана в исследуемых тканях кукурузы. Следует отметить, что по добрых работ в доступной нам литературе не обнаружено.

В наших исследованиях определяли содержание свободной и связанной ИУК у 5-дневных интактных проростков и расчлененных на отдельные органы, сохранивших контакт с зерновкой. При этом органы разделяли на две зоны - содержащую и не содержащую антоциан.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что стимуляция роста побегов, наблюдаемая при воздействии гиббереллина, сопровождается повышенным содержанием свободной ИУК, причем в большей мере в антоциановой зоне. Это связано, по-видимому, с передвижением синтезированной в апексе ИУК в зону активного роста. В корнях же этих растений содержится значительно меньше, чем в контроле, свободной ИУК, в частности в антоциановой зоне на 31 %, а в безантоциановой - на 67 %. Угнетение роста побега при воздействии ССС сопровождается практически отсутствием свободной ИУК и высоким уровнем связанной формы. При совместном действии ИК и ССС происходит снятие ингибирующего действия ССС на рост побега, что связано, по-видимому, с повышением содержания ИУК. В варианте с ИУК отмечено резкое повышение содержания связанной формы гормона, особенно в антоциановой зоне побега / в 6,4 раза / и корня / в 4,4 раза /, что является очевидно результатом инактивации его растительной тканью. Известно, что у высших растений существует высокоразвитая система инактивации ауксина / окисление ИУК-оксидазой, конъюгация, нековалентная связь с белками /. В целом все системы инактивации образуют довольно надежную защиту раститель-

ных клеток от действия на них экзогенных ауксинов, регулируя таким образом содержание эндогенных ауксинов в тканях. Можно предположить, что синтез и разрушение ИУК-производных является гомеостатическим механизмом для поддержания постоянной концентрации ауксина в тканях.

Слапует также отметить, что самое высокое содержание свободной АБК найдено в побегах, инкубированных на растворе ССС, особенно в антоциановой зоне и превышает контроль более чем в 14 раз. Следовые количества АБК обнаружены в стимулированных в росте побегах при воздействии гиббереллина, а также в побегах и корнях, растущих на растворе с ИУК.

Что касается влияния дезинтеграции, то ИУК обнаружен в большом количестве / 425 нг/г сыр. веса / в побегах, инкубированных на растворе с гиббереллином в зоне, не содержащей антоциан, а также в варианте с экзогенной ИУК / 643 нг/г сыр. веса /. АБК больше всего при воздействии ССС, особенно в антоциановой части побегов.

В связи с этим было интересно определить в исследуемых тканях содержание предшественника ИУК в растениях - аминокислоты триптофана. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наибольшее содержание триптофана наблюдается при воздействии ССС как в целых, так и в изолированных побегах и корнях, сохранивших контакт с зерновкой. Меньшее количество триптофана отмечено при воздействии ГК и ИУК, особенно в изолированных корнях, имеющих контакт с зерновкой. Эти данные говорят о неодинаковом использовании триптофана как предшественника ИУК в разных вариантах опыта.

Итак, совокупность рассмотренных данных свидетельствует о том, что содержание эндогенных ИУК и АБК в проростках кукурузы коррелирует с интенсивностью ростовых процессов. Стимуляция роста сопровождается повышением уровня свободных ауксинов и снижением уровня ингибитора АБК. Образование большого количества конъюгатов ауксина происходит при избытке гормона. Посредством такого комплексования могут осуществляться разные процессы: регулирование уровня свободного ауксина, опосредование его физиологического действия, инактивация части молекул и, наконец, перевод в запасную форму. Все эти сложные изменения в гормональном балансе растений оказывают существенное влияние на метаболические процессы, в частности метаболизм азотистых соединений.

4. Содержание белка и свободных аминокислот в тканях кукурузы при воздействии регуляторов роста и дезинтеграции

Показано, что физиологически активные вещества существенно влияют на уровень белка в исследуемых тканях кукурузы / рис. 3 и 4 /. Повышение его отмечено при воздействии гиббереллина в побегах интактного проростка и изолированного, причем как в антоциановой зоне, так и в не содержащей антоциан части побега. В корнях этих же растений, как интактных, так и дезинтегрированных, наблюдается снижение уровня белка. Эти данные свидетельствуют о прямой корреляции между уровнем белка и интенсивностью роста органов.

Основными исходными веществами, обеспечивающими синтез белка, являются аминокислоты. Образуются в процессе фотосинтеза или в результате синтетической деятельности корней, они в дальнейшем участвуют в самых разнообразных биохимических процессах, в том числе и синтезе белка и ростовых веществ.

Результаты наших исследований свидетельствуют о существенных изменениях в суммарном и процентном содержании некоторых аминокислот / рис. 5 и 6 /. Прежде всего следует отметить, что все используемые нами регуляторы снижают общее суммарное содержание свободных аминокислот: в корнях в наибольшей мере ИУК и ГК, а в побегах ССС. При этом отмечена разница между изучаемыми частями органов — безантоциановой и антоциановой зоны. Показано, что в корнях, инкубированных на растворе с гиббереллином, уменьшается содержание аланина, что может быть одной из причин ослабления роста. При этом в этих же корнях больше тирозина, который является предшественником в биосинтезе фенольных ингибиторов.

Следует также отметить высокое содержание пролина в тканях исследуемых растений, особенно угнетенных в росте побегов и корней при воздействии синтетического препарата ССС. Фитогормон гиббереллин действует иначе. Элокируя рост корня, вызывает повышение уровня пролина только в антоциановой зоне, а в апикальной части, где происходит деление и растяжение клеток, пролин содержится лишь в следовых количествах. На сегодняшний день среди разных точек зрения о значении пролина для жизнедеятельности растений преобладает представление о нем как веществе со специфическими свойствами против экстремальных воздействий внешних факторов / Palfi et al , 1974 ; Schneider , 1986 /.

Итак, приведенные результаты свидетельствуют о существенных изменениях в содержании аминокислот в интактных проростках кукурузы

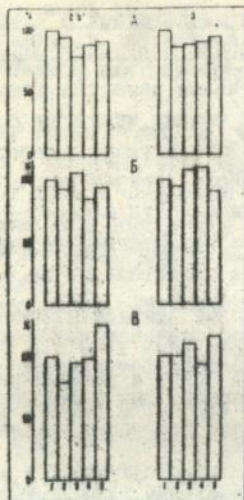


Рис.3. Содержание белка в побегах целого проростка кукурузы / А /, имеющего контакт с зерновкой / Б / и изолированного / В / при воздействии регуляторов роста / в % к контролю /
 1 - контроль, 2 - ГК, 3 - ССС, 4 - ГК + ССС, 5 - ИУК,
 б/а-безантоциановая, а -антоциановая зона.

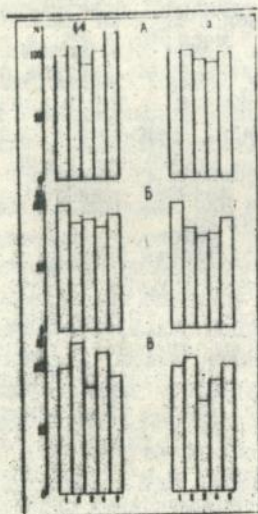


Рис.4. Содержание белка в корнях целого проростка кукурузы / А /, имеющего контакт с зерновкой / Б / и изолированного / В / при воздействии регуляторов роста / в % к контролю /
 Обозначения как на рис. 3.

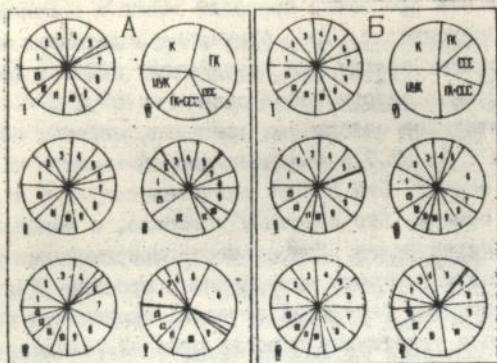


Рис. 5. Свободные аминокислоты в побегах интактных проростков при воздействии регуляторов роста / в % от суммы / 1 - К, 2 - GK, 3 - CCC, 4 - GK+CCC, 5 - IYK, 6 - U1 - сумма в % к контролю /. А - безантоциановая, Б - антоциановая часть. Нумерация аминокислот: 1 - аспарагиновая к-та, 2 - треонин, 3 - серин, 4 - аспарагин, 5 - глутаминовая к-та, 6 - пролин, 7 - глицин, 8 - аланин, 9 - валин, 10 - изолейцин, 11 - лейцин, 12 - тирозин, 13 - фенилаланин.

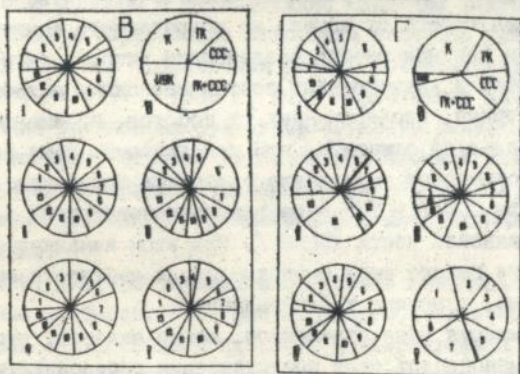


Рис. 6. Свободные аминокислоты в корнях интактных проростков кукурузы при воздействии физиологически активных веществ / в % от суммы / В-безантоциановая, Г-антоциановая часть. Остальные обозначения как на рис. 5.

зн. Нарушение целостности проростка приводит также к изменениям в содержании свободных аминокислот. Так, суммарное содержание аминокислот возрастает в побегах только при воздействии ССС / в безантоциановой части на 61,5, а в антоциановой зоне - на 57,2 % /. При этом повышается относительное содержание треонина, серина, глицина и, особенно аспарагина / на 33,7 в безантоциановой части и на 75,8 % в антоциановой зоне /. Эти данные свидетельствуют о нарушениях в аминокислотном обмене, что связано, возможно, с замедленным использованием их на синтез белка. При совместном применении ССС и ГК повышается процентное содержание аспарагина и пролина. Учитывая участие тирозина в биосинтезе фенольных веществ, становится понятным высокий уровень его в угнетенных в росте органах. Следует учесть и то, что накопление тирозина и фенилаланина, которые обнаруживаются обычно в растительных тканях в следовых количествах, будучи активными метаболитами, может свидетельствовать о прекращении конструктивных и биосинтетических процессов.

Следует также отметить высокое процентное содержание аспарагина и особенно пролина в обеих частях побега, инкубированного на растворе ИУК / более чем в 3 раза /. При этом в 2,5 - 3 раза больше глутаминовой кислоты, играющей первостепенную роль в реакциях переаминирования, но меньше аланина в 1,5 - 2 раза. Сравнивая эти результаты с полученными на интактных проростках, следует отметить, что дезинтеграция / изоляция побега от корня, но сохраняющего контакт с зерновкой / не нарушила закономерности воздействия экзогенных регуляторов на количественный и качественный состав свободных аминокислот. Что же касается корней, изолированных от побегов, но имеющих связь с зерновкой, то следует отметить, что используемые нами регуляторы роста повышают суммарное содержание свободных аминокислот, причем в наибольшей мере ССС / в 7,5 раза в антоциановой зоне и почти в 4 раза в безантоциановой части корня /. При этом изменяется и относительное содержание целого ряда аминокислот, в частности аспарагина, пролина, аланина, тирозина и фенилаланина.

Таким образом, суммируя выше изложенное, можно сказать, что количество свободных аминокислот дает представление о биосинтетических возможностях растений. Но по количеству и составу аминокислот не всегда возможно судить об их роли в отдельных процессах жизнедеятельности. Тем не менее, существует коррелятивная взаимосвязь между содержанием некоторых аминокислот и ростом. При ингибировании роста накапливаются в основном пролин, тирозин, фенилаланин, а при стимуля-

ции ростовых процессов – аланин и дикарбоновые аминокислоты. Следовательно, накопление отдельных аминокислот в клетках растений может служить показателем интенсивности биосинтетических процессов и уровня жизнедеятельности растения, что говорит о взаимосвязи аминокислотного обмена с ростовыми процессами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучая остановку роста клеток растяжением и переход к дифференцировке у проростков кукурузы, а также действие расчленения его на части в связи с ростом и образованием антоциана обнаружили, что последовательная дезинтеграция проростка приводит к замедлению роста и торможению образования антоциана. Вместе с тем, антоциан образуется как в побеге, так и в изолированном корне с зерновкой, т.е. для его образования нет необходимости контакта осевых органов проростка. Декапитация изолированных органов с зерновкой не меняет характер образования антоциана. Однако, уже через сутки в изолированных декапитированных корнях с зерновкой антоциан накапливается интенсивнее, чем при наличии апекса, что обусловлено отсутствием апекса, места синтеза АБК, ингибирующей образование антоциана. Следовательно, АБК влияет на количество антоциана, а не на индукцию появления его.

Более сильным и отрицательно влияющим фактором на рост отдельных органов и образование антоциана является удаление зерновки, что вызвано тем, что трофический фактор контролирует не только рост / Neu, Pilet, 1980 /, но и образование антоциана. Глубокая дезинтеграция органов на отдельные сегменты выявила, что антоциан образуется только в отрезке из базальной части / зона дифференциации /, а в отрезке из апикальной части – не образуется, поскольку она состоит из зоны деления и растяжения, для которых наличие антоциана не характерно.

Итак, дифференцировка и появление антоциана в клетках – взаимосвязанные процессы. Рост растительного организма и образование в нем антоциана – это сложный процесс, подвергающийся воздействию ряда эндогенных и экзогенных факторов. Характерно, что на ряде этапов / гормональной и субстратной регуляции / эти процессы могут сопрягаться и тогда блокировка одного из процессов, например, роста может вести к торможению другого процесса – образования антоциана. Существенно, что фитогормоны / ГК и ИУК /, а также синтетические вещества / ССС и 2,4-Д / повышают содержание антоциана, но не изменяют его состав.

Таким образом, выбранная растительная модель дала возможность в единой системе целого развивающегося растения и его изолированных органов проследить связь процесса дифференцировки и образования антоциана. Кроме того, возможность фиксировать длину антоциановой части и ее связь с ростом дает основание для создания системы физиологической оценки. Иными словами, антоциан может служить маркером остановки ростовых процессов, например, для кукурузы, так отражает ход процесса дифференцировки и служит надежной и доступной мерой для анализа процесса морфогенеза.

Известно, что рост растений регулируется сложной многокомпонентной гормональной системой. Для познания гормональной регуляции роста важным являются метаболические основы ростовых процессов, особенности которых определяются свойствами синтезируемых белков. Выявлена прямая корреляция между содержанием белка и интенсивностью роста как целых проростков кукурузы, так и дезинтегрированных.

Следует подчеркнуть, что общие реакции обмена тесно связаны с путями биосинтеза азотсодержащих гормонов / цитокинины и ауксины / и безазотистых / гиббереллины, АБК, этилен /. Известно, что гормоны образуются из аминокислот / ауксин, этилен / или из органических кислот / АБК, цитокинины, гиббереллин /. Существенно, что и негормональные регуляторы типа фенольных ингибиторов и стимуляторов образуются из аминокислот / фенилаланина и тирозина /. Все это говорит о сложных механизмах, регулирующих обмен вторичных соединений, в том числе и антоцианов, которые находятся в тесной взаимосвязи с общим метаболизмом.

ВЫВОДЫ

1. Выявлен параллелизм между ростом в длину корня и побегов проростка кукурузы и накоплением в них антоциана. Показано, что в побеге и корне кукурузы сорта Закарпатская желтая зубовидная содержится антоциан цианидин, который локализован в закончивших рост дифференцированных клетках.

2. Физиологически активные вещества - ГК, ИУК, 2,4-Д, и особенно ССС, изменяя интенсивность ростовых процессов, повышают содержание антоциана, но не влияют на его состав. Однако 2,4-Д снижает содержание антоциана в корнях, угнетенных в росте.

3. Расчленение интактного проростка на органы - корень и побег, приводит к подавлению роста и уменьшению длины антоциановой зоны. Дальнейшая дезинтеграция - изолирование органа от зерновки, вызывает

резкое торможение роста и образование антоциана, а декапитация изолированного органа / с зерновкой / не блокирует процесс антоцианирования, Глубокая дезинтеграция органа на отдельные сегменты приводят к полной блокировке роста и образования антоциана. Таким образом, для образования антоциана целостность растения не обязательна. Появление его тесно связано с дифференцировкой и служит надежной мерой для анализа процесса морфогенеза.

4. Выявлена прямая корреляция между содержанием эндогенных фитогормонов - ИУК и АБК в проростках кукурузы и интенсивностью роста. Стимуляция роста побега гиббереллином сопровождается повышенным уровнем свободной ИУК, особенно в антоциановой зоне, что связано, по-видимому, с передвижением синтезированной в апексе ИУК в зону активного роста. Угнетение роста побега при воздействии ССС приводит к повышению уровня связанной формы ИУК и резкому возрастанию содержания АБК, особенно в антоциановой зоне. При этом отмечено наибольший уровень триптофана - предшественника ИУК как в целых проростках, так и в изолированных побегах и корнях, сохранивших контакт с зерновкой.

5. Обнаружена прямая корреляция между содержанием белка и интенсивностью роста в целых проростках кукурузы и в расчлененных на отдельные органы. Повышение его отмечено в антоциановой и безантоциановой части побегов при воздействии ГК как интактных, так и изолированных, имеющих контакт с зерновкой. В корнях этих же растений содержание белка снижается, а при воздействии ССС - возрастает.

6. Физиологически активные вещества резко изменяют суммарное содержание свободных аминокислот и их качественный состав в тканях как интактных проростков кукурузы, так и дезинтегрированных. При стимуляции роста побегов накапливается аланин, дикарбоновые аминокислоты - аспарагиновая и глутаминовая, а при ингибировании роста - аспарагин, пролин, тирозин и фенилаланин. Накопление последних свидетельствует о прекращении биосинтетических процессов.

Дезинтеграция проростка на отдельные органы не нарушила закономерности воздействия экзогенных регуляторов на количественный и качественный состав свободных аминокислот. Выявлена коррелятивная взаимосвязь между содержанием некоторых аминокислот и ростом отдельных органов растения. Следовательно, накопление отдельных аминокислот в растениях может служить показателем интенсивности биосинтетических процессов и уровня жизнедеятельности растения, что говорит о взаимосвязи аминокислотного обмена с ростовыми процессами.

7. Таким образом, экзогенное воздействие физиологически активных веществ на интактное растение и на его дезинтегрированные части свидетельствует о сложных взаимодействиях и взаимозависимостях, которые существуют между отдельными клетками, тканями и органами растения. Эти взаимодействия основаны на переориентировке метаболических пулов и потоков и связаны с функционированием многокомпонентной фитогормональной системы, регулирующей важные физиологические процессы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Влияние регуляторов роста на образование антоциана в интактных и дезинтегрированных проростках кукурузы // Регуляторы роста и развития растений. К.: Наукова думка. - 1989. - С. 201 / Терек О., Кривич Е /.

2. Влияние физиологически активных веществ на образование антоциана и уровень белка в проростках кукурузы и его дезинтегрированных частях // 2-й съезд Всесоюзного общества физиологов растений. 24- 29 сентября 1990 г. Минск / Терек О., Кривич Е /.

3. Anthocyanin formation in juvenile Zea mays plants during chemical regulation of growth. // 14th International Congress of Biochemistry Abstracts. Prague, Czechoslovakia. 1988, P. 185 (&Terek O.)

ВАХМ РИФАТ

РОСТ ПРОРОСТКА КУКУРУЗЫ И ОБРАЗОВАНИЕ АНТОЦИАНА
В УСЛОВИЯХ ДЕЗИНТЕГРАЦИИ И ХИМИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ

03.00.12 - физиология растений

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано к печати 19.04.91. Формат 60x84/16. Бум. тип. № 1.
Печ. офсет. Усл. печ. л. 0,93. Усл. кр.-отт. 1,16. Уч.-изд. л. 1,22.
Заказ 130. Тираж 100. Бесплатно.

Машинно-офсетная лаборатория Львовского госуниверситета,
Львов, ул. Университетская, 1.

466971

БЕСПЛАТНО

№В 25.319
АВ 25.319

Handwritten mark

УТВЕРЖДЕНО
НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИМ ЦЕНТРОМ
ИЗДАТЕЛЬСТВА И ПЕЧАТНОГО ДЕЛА
МОНУМАЛЬНЫХ ПУКОВ
1988 г.

Handwritten mark