

Київський Університет ім. Тараса Шевченка

на правах рукопису

Бабенко Лідія Михайлівна

Структурно-функціональні особливості насіння з різним типом
спокою

03.00.12 - фізіологія рослин

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1995

581.1



Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі фітогормонології
Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Мусатенко Л.І.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Терек О.С.
доктор біологічних наук, професор
Галкін А.П.

Провідна установа: **Київський університет ім. Тараса Шевченка**

Захист дисертації відбудеться "7" червня 1995 р. о "14" год.
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.01.07 для захисту
дисертацій на біологічному факультеті Київського університету
ім.Тараса Шевченка за адресою: Київ -127, просп. акад. Глушкова,2.
Поштова адреса: 252033, Київ -33, Володимирська, 64,
спецрада Д 01.01. 07 біологічний факультет

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Київського універ-
ситету ім.Тараса Шевченка

Автореферат розіслано "28" квітня 1995 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради
канд. біол. наук., професор

Брайон О.В.

**ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України**

Загальна характеристика роботи.

Актуальність проблеми. Насінню більшості дикоростучих і багатьох культурних рослин притаманний стан спокою. Таке насіння навіть при сприятливих умовах або не здатне проростати, або має низьку схожість, а вилучені з нього зародки утворюють проростки з аномальним розвитком (Николаева, 1967; Николаева и др., 1985). Спокій насіння є важливим пристосувальним механізмом збереження видів, який забезпечує рослинам можливість переживати несприятливі умови, з одного боку, і утворює запас насіння в ґрунті - з іншого. В той же час, наявність спокою у насіння утруднює культивування корисних рослин, ускладнює роботу по інтродукції багатьох перспективних народногосподарських видів і створенню колекцій живих рослин. Спокій насіння бур'янів створює додаткові труднощі в боротьбі з засміченням посівів. Ускладнює проблему варіювання глибини спокою не тільки у різних видів, але нерідко в межах одного виду, а також різноманітність умов його порушення. Тому вивчення природи спокою насіння і умов його подолання є актуальним завданням фізіологів рослин, ембріологів, селекціонерів, генетиків.

Проблемі спокою насіння присвячено чимало робіт, але більшість їх містить дані про способи його подолання під дією тих чи інших факторів (Даскалюк, Тома, 1994; Berestetsky et. al., 1991). Поглиблене вивчення біохімічної природи спокою, молекулярно-фізіологічних механізмів, що його формують, заслуговують на значно більшу увагу дослідників.

При переході насіння від спокою до проростання відбуваються значні зміни в експресії геному, регуляторика яких лишається незрозумілою. Існують численні докази того, що ці процеси можуть регулюватися на рівні фітогормонів та їх рецепторів. Значну роль відводять абсцизовій кислоті (АБК) в зв'язку з тим, що її вміст в тканинах насінини тісно корелює з ходом розвитку і з певними змі-

нами в генній експресії, зокрема синтезом запасних білків і, можливо, преформованих мРНК і їх маскуванню (Dure, Greenway, 1981). Заслугує на увагу інший природний регулятор росту - жасмонова кислота (ЖК), дія котрої на проростання та нуклеопroteїновий синтез залежить від типу спокою насіння (Далецкая, Зембднер, 1989; Zembdner, Partier, 1993). В зв'язку з цим викликає суттєвий інтерес порівняльне вивчення дії ЖК та АБК, котрі здатні регулювати процеси спокою і проростання насіння. Рішення цих проблем дасть змогу наблизитись до розкриття механізмів формування спокою та виходу з цього стану, розробити методи довгострокового зберігання схожого насіння з високим рівнем енергії проростання. Саме в цьому полягає їх теоретичне та практичне значення.

Мета роботи. Метою даної роботи було дослідження особливостей функціонування білоксинтезуючої системи та анатомо-морфологічної структури насіння з різним типом спокою. Передбачалось за допомогою вивчення компонентного складу синтезованих поліпептидів охарактеризувати зміни в експресії геному зародка в стані спокою і виході з нього, при реактивації ростових процесів при проростанні, а також під впливом фізіологічно активних речовин. У відповідності з цим були поставлені наступні задачі:

1. Дослідити зміни клітинної структури і набору синтезованих поліпептидів на протязі дозрівання насіння ортодоксального та речальцитратного типів.

2. Порівняти зміни в структурі, трансляційно-транскрипційній активності і наборі синтезованих поліпептидів протягом холодної та теплої стратифікації насіння ортодоксального типу.

3. Дослідити в модельній системі ЖК- та АБК-залежні процеси в характері генної експресії.

Наукова новизна. Подана робота є першим систематизованим дос-

лідженням, в якому на базі аналізу літературних даних та результатів власних експериментів охарактеризовані основні структурно-функціональні особливості насіння з різним типом спокою. Показано, що морфогенез зародка насіння рекальцитратного та ортодоксального типів відбувається по аналогічній схемі. Різниця між ними проявляється у швидкості проходження та кількості стадій ембріогенезу. На момент повного дозрівання насіння клена срібlistого його клітини містять всі притаманні функціонально активній клітині структури, а також повний набір необхідних для проростання білків. В зрілому насінні клена татарського відбувається зниження активності білоксинтезуючого апарату, мембранна система клітин зародка зазнає суттєвих змін, ліпідні краплі і білкові тіла заповнюють весь об'єм клітини. Відновлення мембранної структури та активності білоксинтезуючого апарату відбувається протягом холодної стратифікації чи обробки ЖК. Пригнічення проростання насіння клена срібlistого ЖК чи АБК супроводжується різким зниженням активності трансляції, вірогідно, внаслідок більш загального порушення метаболізму. На фоні загального пригнічення білкового синтезу обидва гормони активували синтез подібної групи поліпептидів (рІ 4.0 в діапазоні молекулярних мас (ММ) 14-67кДа). Вперше доведено, що зміни активності білоксинтезуючої системи зародка при екзогенній обробці ЖК залежать від типу спокою насіння.

Одержані результати поглиблюють знання про функціонування білоксинтезуючого апарату та регуляторну дію фізіологічно активних речовин на ключових етапах розвитку, а також збагачують уявлення про механізми формування спокою і виходу з нього.

Наукові положення, що виносяться на захист.

1. При аналогічній схемі морфогенезу зародків різниця між фізіологічними типами насіння проявляється у швидкості проходження стадій

ембріогенезу. Крім того, ембріогенез насіння ортодоксального типу доповнюється стадією збезводнення.

2. На момент повного дозрівання клітини насіння рекальцитратного типу характеризуються типовою структурою функціонально активної клітини. Мембранна система клітин зародка насіння ортодоксального типу на завершальних етапах ембріогенезу зазнає суттєвих змін, весь об'єм клітини заповнюється ліпідними краплями та білковими тілами.

3. При переході насіння *A. tataricum* L. в стан спокою відбувається різке зниження активності білоксинтезуючого апарату, котрий залишається активним в зрілому насінні *A. saccharinum* L.

4. Відновлення мембранної структури та активності білоксинтезуючого апарату в насінні рекальцитратного типу відбувається протягом холодної стратифікації чи при обробці жасмоновою кислотою.

5. Пригнічення проростання насіння *A. saccharinum* L. жасмоновою чи абсцизовою кислотами супроводжується різким зниженням активності трансляції, вірогідно, внаслідок більш загального порушення метаболізму. На фоні загального пригнічення білкового синтезу обидва гормони активували синтез подібної групи поліпептидів (рІ 4.0 в діапазоні ММ 14-67кДа).

6. Різконаправленість екзогенної дії жасмонової кислоти на насіння з різним типом спокою проявляється в стимуляції проростання для ортодоксального насіння та пригніченні проростання для рекальцитратного.

7. Синтез білків D, H, J, A та поліпептидів з рІ 5.8-6.2 ММ 20-25 кДа активувався протягом холодної стратифікації і обробки ЖК та, навпаки, пригнічувався в умовах, що не сприяли виходу із стану спокою. Очевидно, вихід із стану спокою пов'язаний із синтезом саме цих білків.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідались та обговорувались на конференції "Актуальні питання ботаніки та екології" (Ялта, 1993), III з'їзді всеросійського товариства фізіологів рослин (Санкт-Петербург, 1993), XV міжнародному ботанічному конгресі (Йокохама, 1993), 9-му конгресі федерації Європейських товариств фізіологів рослин (Брно, 1994), на засіданнях відділу фітогормонології Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України та на засіданнях секції фізіологів рослин УЕТ.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 6 робіт.

Загальна характеристика роботи

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису об'єктів та методів дослідження, результатів та їх обговорення, заключення, висновків та списку літератури (179 найменувань, з них 141 на іноземних мовах). Роботу викладено на 140 сторінках машинописного тексту, вона ілюстрована 27 рисунками.

Об'єкти та методи досліджень

Об'єктом дослідження було насіння клену срібlistого (*Acer saccharinum L.*) і клену татарського (*A. tataricum L.*) - рекальцитратного та ортодоксального типів відповідно. Особливості функціонування білоксинтезуючої системи та субмікроскопічну будову насіння клену срібlistого досліджували на 26-36 день після цвітіння (ДПЦ) та 36-50 ДПЦ, а клену татарського - на 60-65 ДПЦ, 90-95, 145-150 ДПЦ і на протязі холодної та теплової стратифікації, яку проводили за методикою (Николаева и др., 1974).

Стерилізоване етанолом насіння пророщували в темноті при 22°-25°С, в присутності клафрану (500 мг/л). В роботі використовували АБК в концентрації 100 мг/л та ЖК - 250 і 500 мг/л.

Дослідження структури зародку. Для дослідження будови зародка

насіння фіксували за методом (Паушева, 1970). Препарати аналізували на світловому мікроскопі NU-2. Для дослідження субмікроскопічної структури клітин зародкові органи насіння фіксували за методом (Mollechauer, Totten, 1971). Ультратонкі зрізи отримували з допомогою скляних ножів на ультрамікротомі LKB-3. Будову клітин досліджували на електронному мікроскопі JEM-1200 EX.

Мічення насіння. Насіння, позбавлене оплодєня і насінневої шкірки, інкубували з 3,5МБк/мл [³⁵S]-метіоніну (11,5ПБк/моль) або з 23МБк/мл [³H]-уридину (7,4ПБк/моль) в 3 мл середовища (10 мМ КН₂Р₄ рН 7.0, клафоран 500мг/л) протягом шести год при 28°C. Після інкубації насіння відмивали холодною дистильованою водою, підсушували, зародкові осі відокремлювали від сім'ядолей, зважували, заморожували в рідкому азоті і зберігали при -70°C.

Дослідження білків і РНК. Білок екстрагували за модифікованим методом (Hurtman and Tanaka, 1986). При виділенні РНК заморожений матеріал гомогенізували в буфері рН 7.6 (0.05М трис, 0.06М KCL, 0.01М MgCL₂). Супернатант відділяли центрифугуванням і використовували для визначення радіоактивності методом паперових дисків (Mans, Nivelli, 1961). Радіоактивність вимірювали в сцинтиляційному лічильнику LS-750 ("Beckman", США). Концентрацію білку в розчинах визначали за методом (Bredford, 1976).

Двомірний електрофорез білків проводили за методом (O'Farrell, 1975). В першому напрямку білки розділяли ізоелектрофокусуванням в трубках, в другому - електрофорезом в ПААГ-ДС-Na. Молекулярні маси білків визначали за відомими маркерами. Для одержання радіоавтографів висушені гелі експонували з рентгенівською плівкою Kodak X-OMAT при -70°C на протязі 12-24 діб.

Статистична обробка результатів. Досліди виконані в трьох повторностях. Статистичну обробку результатів проводили методом дис-

персійного аналізу з використанням пакету програм "Statgrafics" (STSC, Канада).

Результати та їх обговорення.

1. Формування насіння різних фізіологічних типів. Цвітіння клена срібlistого відбувається ще до розпускання листа (кінець березня - початок квітня). Календарні строки цвітіння можуть варіювати в залежності від природних умов. Період формування насіння клена срібlistого триває протягом двох місяців і завершується в другій половині травня. Розвиток зародка включає етапи клітинного росту, диференціації зародкових органів та нагромадження запасних речовин. Найбільш інтенсивний ріст сім'ядолей і зародкової осі спостерігається в першій половині ембріогенезу. В клітинах зрілого насіння зберігається необхідна для проростання при інших сприятливих умовах кількість води.

Розвиток насіння клена татарського потребує майже вдвічі більше часу порівняно з кленом срібlistим. Крім того для завершення ембріогенезу йому необхідні збезводнювання до повітряно-сухого стану без втрати життєздатності (оводненість зрілого насіння 10%) та тривала холодна стратифікація.

2. Біогенез запасних речовин насіння. При дослідженні клітинного росту зародка насіння різних фізіологічних типів було виявлено, що на стадії диференціації зародкових органів його клітини сильно вакуолізовані. Відкладання білків в запас, як правило, відбувається в клітинах, що втратили мітотичну активність. Формування білкових тіл починається з появи на внутрішній стороні тонопласту невеликих білкових згустків. З часом їх маса зростає, поступово заповнюючи об'єм вакуолі. Характерно, що відкладання запасних білків відбувається не на всій поверхні тонопласту, а лише в окремих його ділянках. Частина тонопласту залишається вільною, що можливо

пов'язано з транспортом через ці ділянки мембран запасного білку у вакуолю. Білкові тіла в зародковій осі і сім'ядолях насіння кленів мають подібну будову, їх біогенез відбувається за єдиною схемою. Внаслідок заміщення вакуолярного соку запасним білком, знижується рівень оводненості клітин, які втрачають осмотичну функцію. Відбувається фізіологічне збезводнення, яке у насіння ортодоксального типу на завершальних етапах розвитку переходить у чисто фізичне.

Формування ліпідних крапель також відбувається за єдиною схемою в клітинах зародкової осі і сім'ядолей насіння різних видів клену. Наявність в цитоплазмі клітин ліпідних крапель вже на початкових етапах формування зародка свідчить, що синтез запасних ліпідів випереджає синтез запасних білків. Чисельні ліпідні краплі в насінні клена татарського ми спостерігали на 60-65 добу ембріогенезу. Обробка насіння ЖК на цій стадії викликала їх розпад і відновлення нормальної структури клітин. Синтез запасних білків в цей час ще не починався. Характерно, що в процесі формування насіння локалізація ліпідних крапель в клітині змінюється. Протягом значного періоду розвитку вони відносно рівномірно розміщуються по всій цитоплазмі і мігрують у фазі збезводнювання до плазмалеми, утворюючи ліпідний шар навколо цитоплазми. В клітинах зрілого насіння запасні ліпіди є домінуючими, тому що, крім плазмалеми, вони формують щільні шари навколо білкових тіл і вільно розміщуються в цитоплазмі.

Пластиди клітин зародка на ранніх стадіях розвитку насіння кленів за субмікроскопічною будовою практично не відрізняються. Певні відміни з'являються в більш пізній період ембріогенезу і проявляються у тому, що у клена срібlistого пропластиди диференціюються у хлоропласти з відносно добре розвинутою системою фотосинтетичних мембран, які зберігаються в стромі органел на протязі

всього періоду розвитку насіння. Про це свідчить той факт, що зріле насіння не втрачає зеленого забарвлення. Поряд з розвитком ламелярної системи в пластидах починають формуватися крохмальні зерна. В зародковій осі і сім'ядолях зрілого насіння клена срібlistого вміст крохмалю досягає максимуму. При цьому амілопласти зберігають цілісність мембран оточуючої їх оболонки.

В ранній період розвитку насіння клена татарського пропластиди клітин формують фотосинтетичні мембрани у вигляді гран і ламел, нагромаджують невеликі крохмальні зерна (рис.1). Така структура пластид зберігається в подальший період ембріогенезу, як в клітинах зародкової осі, так і сім'ядолей. На завершальних етапах ембріогенезу, коли в клітинах органів зародку відкладена достатня кількість запасних ліпідів і білків, в пластидах відбувається розпад крохмальних зерен і системи фотосинтетичних мембран (рис.1). В зрілому насінні структура клітинних органел настільки змінюється, що їх ідентифікація стає неможливою.

3. Структурні зміни клітин зародка насіння клена татарського в процесі стратифікації. На 60 добу холодної стратифікації змінюються розміри і зменшується кількість ліпідних крапель на одиницю площі зрізу клітини. Очевидно, певна їх частина під впливом лізису зменшується в об'ємі і зникає. Розпад ліпідних крапель приводить до збільшення в клітинах доли гіалоплазми. Паралельно з утилізацією запасних ліпідів починає відновлюватись ламелярна структура плазмалем і мембран клітинних органел. В наступний період стратифікації такі клітинні органели як ядро, пластиди і мітохондрії набувають типової для них структури. Ядра в цей період мають чітко виражену двомембранну оболонку і містять великі ядерця. Більшість пластид має видовжену форму, чітко виражену оболонку, невисокої щільності матрикс, в якому розміщуються пластоглобули і крохмальні

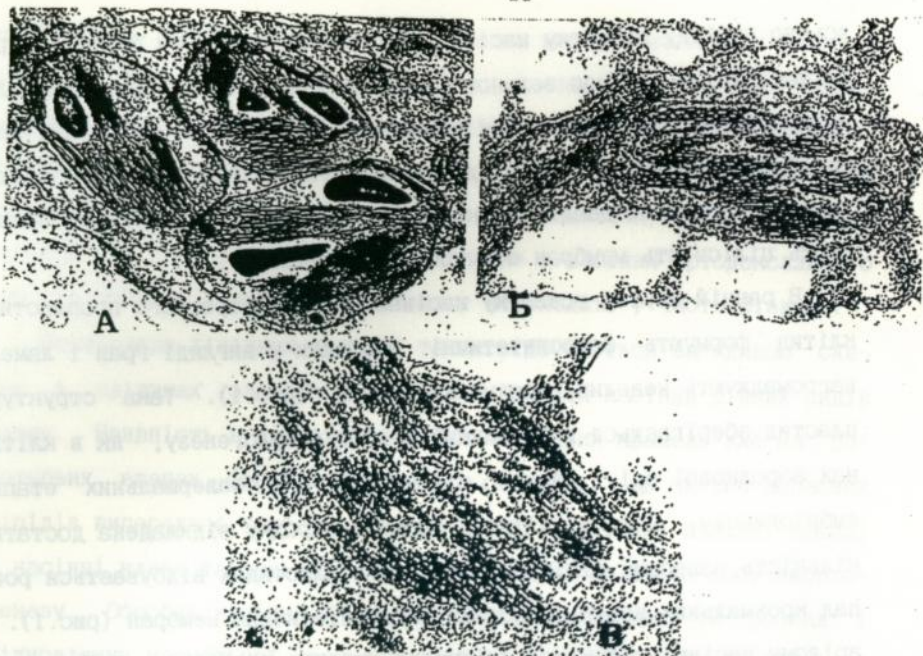


Рис.1 Зміни структури пластид при формуванні насіння клена татарського: А - 80 ДПЦ (x10000); Б, В - на завершальних етапах ембріогенезу, В (x12000); В (x10000).

зерна. Структура білкових тіл в цей період залишається без суттєвих змін. Процес розпаду ліпідів супроводжується появою в цитоплазмі клітин гліоксісом (рис.2), які містять ферменти, що приймають участь в *в*-окисленні ліпідів і функціонуванні гліоксілатного циклу.

Дослідження ультраструктури клітин зародка в кінці холодної стратифікації показало, що основні структурні зміни стосуються білкових тіл, об'єм яких збільшується, білковий матрикс втрачає щільність і набуває вираженої гранулярної структури, частина білкових тіл починає зливатися. Все це свідчить про початок протеолізу запасних білків (рис.3).

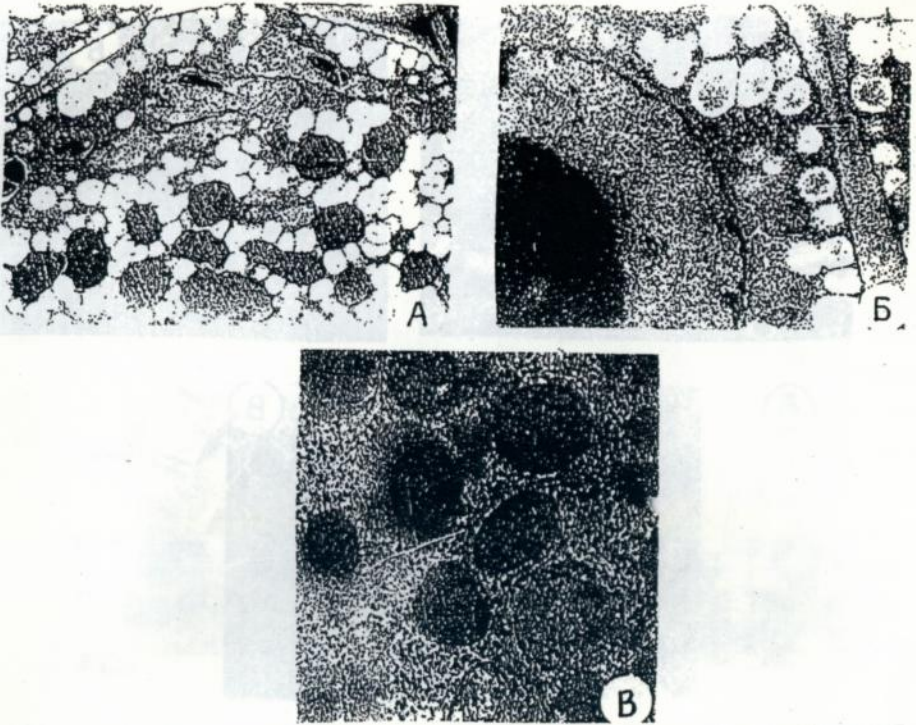


Рис. 2 Відтворення мембранної структури в клітинах насіння клена татарського: А - пластиди (x8000); Б - ядро (x12000); В - поява гліоксисом на 90 добу холодної стратифікації (x25000).

В зрілому насінні клена татарського обробка ЖК (в концентрації 500 мг/л, 48 год) викликала відновлення мембранної структури клітин аналогічно тому, що відбувалось при холодній стратифікації. В протилежність цьому при дослідженні насіння після теплової стратифікації не відбувається відновлення мембранної структури клітин і відсутній гідроліз ліпідних крапель.

4. Особливості експресії геному насіння різних фізіологічних груп при дозріванні. Дослідження компонентного складу синтезованих білків в зародкових осях і сім'ядолях в процесі формування насіння клена татарського, дозволило встановити, що синтез окремих поліпептидів, що містяться у великій кількості в стратифікованому на-

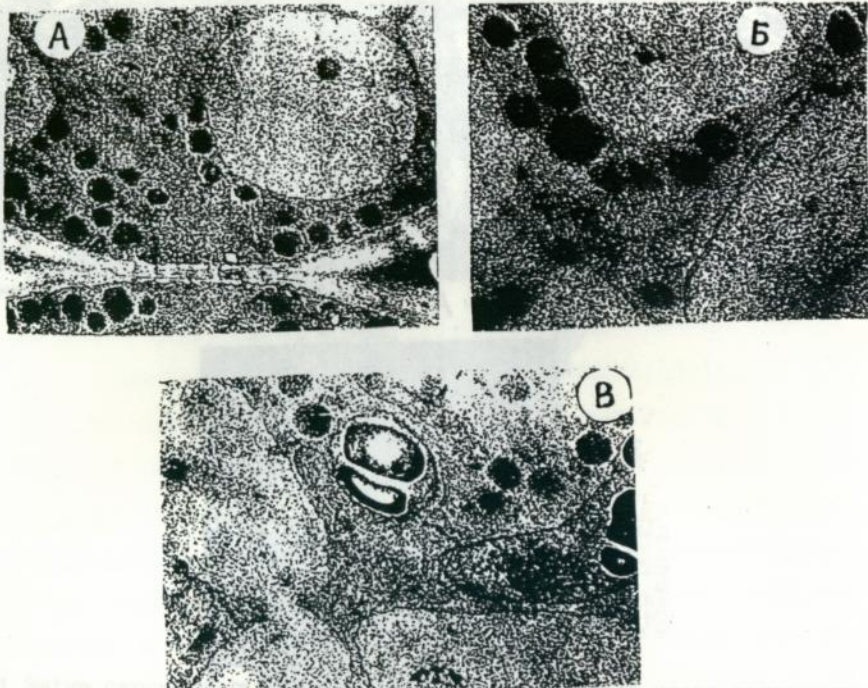


Рис.3 Протеоліз запасних білків в клітинах насіння клена татарського на протяжі холодної стратифікації: А - сухе насіння; В - 60 діб; В - 90 діб (x10000).

сінні, активувався на ранніх етапах ембріогенезу. Так, в сім'ядолях 65-добових зародків була присутня група поліпептидів з pI 4.0 і M 14-94кДа, а також білки у квадраті, обмеженому значеннями pI 4.1-5.0 та M 20-55кДа. В зародкових осях активно експресувався білок С (pI 4.8, 22кДа). Висока інтенсивність синтезу вищевказаних білків характерна для завершальних етапів стратифікації.

Білковий синтез в сім'ядолях та зародкових осях насіння клену татарського на 150 ДПЗ значно змінився і характеризувався слабкою інтенсивністю. В зародкових осях *de novo* синтезувались лише поліпептиди С, В (pI 5.8, 14кДа) і група поліпептидів з pI 4.0 і M 31, 30, 25, 20кДа. Крім вищевказаних поліпептидів в сім'ядолях

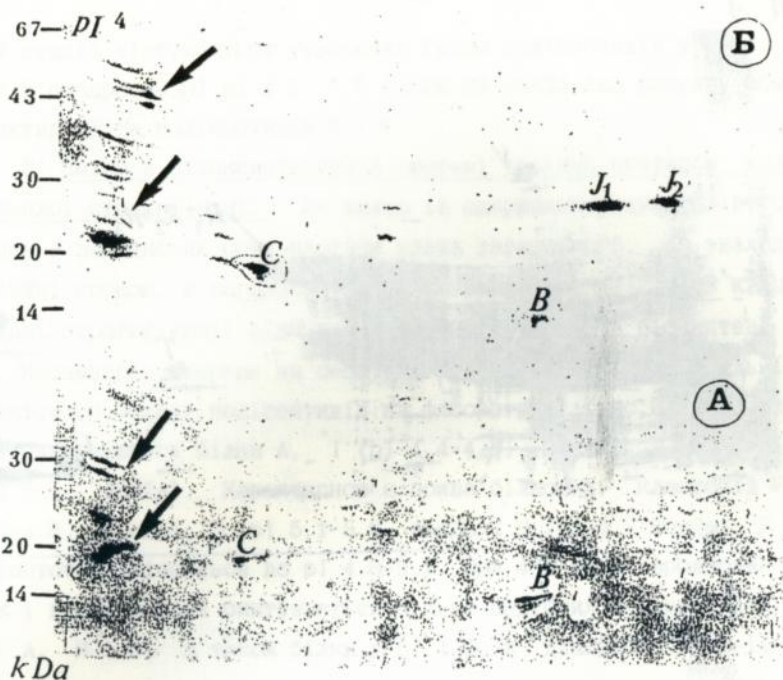


Рис. 4 Радиоавтограф двомірного електрофорезу білків зародкової осі (А) та сім'ядолей (В) насіння клена татарського на 150 добу після цвітіння (повна зрілість).

синтезуються білки J_1 (рІ 6.2, 30кДа) і J_2 (рІ 6.4, 30кДа) (рис.4).

При вивченні спектру синтезованих поліпептидів насіння клену срібlistого насамперед звертає на себе увагу низька інтенсивність синтезу білків, особливо в зародкових осях на ранніх етапах ембріогенезу. В зародках зрілого насіння кількісний і якісний склад поліпептидів зазнає значних змін, де ново синтезуються поліпептиди U (рІ 6.6-6.9, 18кДа); S (рІ 6.6-7.0 23кДа), рІ 6.6-6.7 35кДа; Т (рІ 6.0-6.2 30кДа); V (рІ 4.5-5.8, 88кДа); R_1 (рІ 5.4-5.8, 62кДа), R_2 (рІ 5.4-5.8, 61кДа), R_3 (5.4-5.8, 60кДа). Білковій зоні, що мала ММ 29-36кДа та рІ 4.8-5.5 на 36 ДЩ, відповідає зона з тією ж ММ, але рІ 4.1-5.5 на 50 ДЩ (на рисунку обмежена пунктиром) (рис.5). На

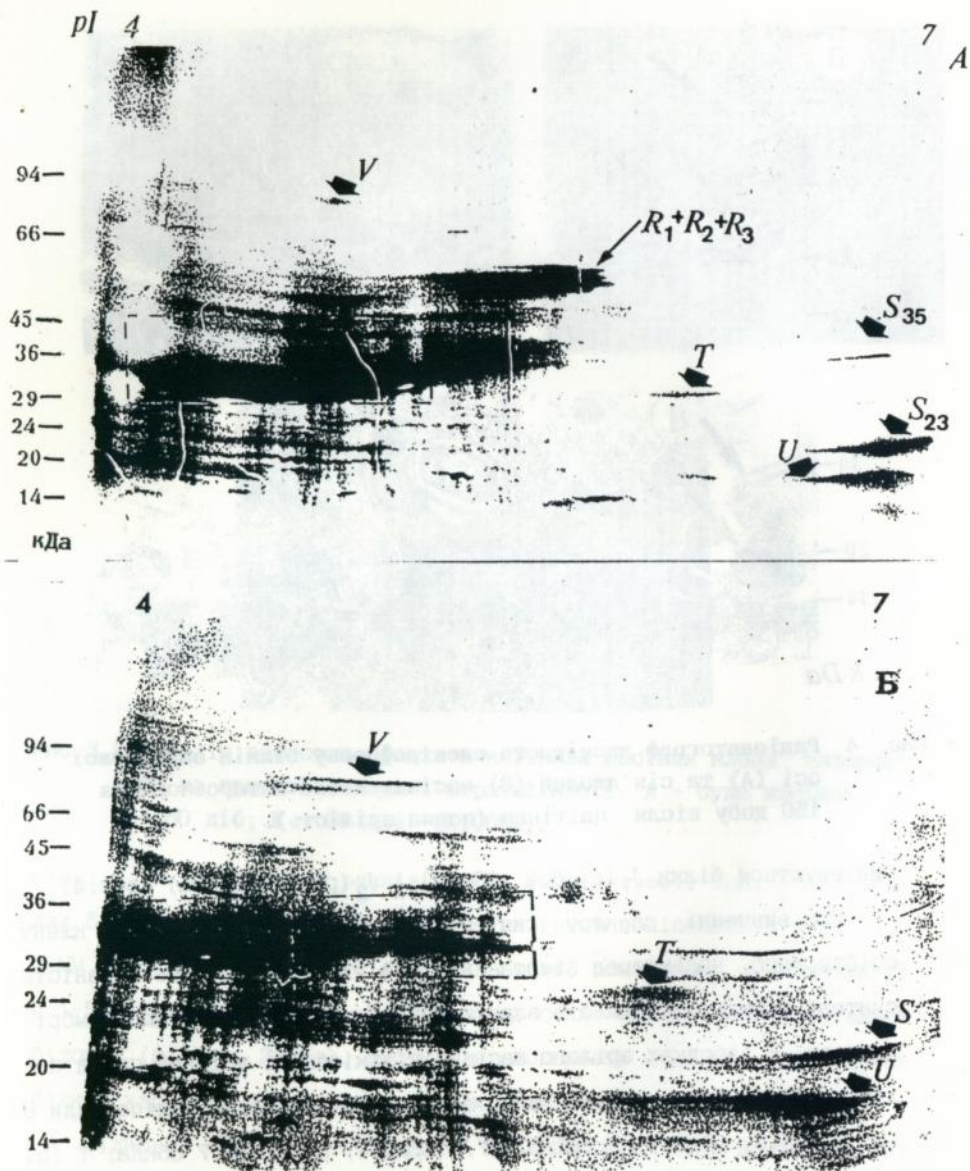


Рис.5 Радиоавтограф двовірного елетрофорезу білків зародкової осі (А) та сім'ядолей (Б) насіння клена срібlistого на 50 добу після цвітіння.

цій стадії відбувається утворення групи поліпептидів у зоні, обмеженій квадратом рІ рІ 4.1- 5.5 та ММ 29-36кДа (на рисунку обмежена пунктиром) та поліпептидів U і S.

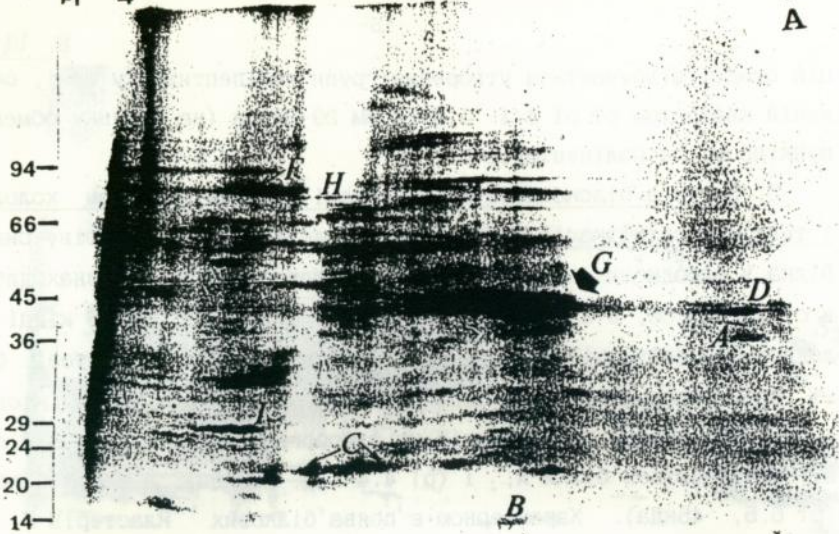
5. Зміни в білоксинтезуючій системі насіння протягом холодної і теплої стратифікації. Як видно із одержаних результатів, синтез білка в зародкових осях насіння клена татарського, що знаходиться в стані спокою, в загальному має низьку інтенсивність. В кінці холодної стратифікації відбуваються помітні зміни в біосинтезі білка. Насамперед звертає на себе увагу значне збільшення кількісного і якісного складу поліпептидів на флюорограмі (рис.6). На цій стадії синтезуються білки А, І (рІ 4.4-4.6, 30кДа), а також білок D (рІ 6.5, 45кДа). Характерною є поява білкових кластерів F (рІ 4.3-4.8, 82кДа); G (рІ 5.1-5.9, 45кДа); H (рІ 4.9 80кДа). У білка С ізоточка зміщується до рІ 4.8-5.2. При 4°С як в зародкових осях, так і в сім'ядолях синтезується кілька подібних поліпептидів: білки А, Н і В, а також білки з рІ 4.0 в діапазоні ММ 14-94кДа (рис.6).

В сім'ядолях якісний склад білків після 120 діб при 22°С значно різниться від такого при холодній стратифікації. Основна маса нових білків локалізована у квадраті, обмеженому значеннями рІ 5.4-6.5 25-55кДа (на рисунку відокремлений пунктиром), а також в квадраті рІ 4.5-5.2 14-20кДа (на рисунку обмежений прямою). Необхідно також відмітити появу новосинтезованого білка N (рІ 6.6, 40кДа), а також білка O (рІ 7.0, 10кДа). Характерна зона білків з рІ 4.0 і широким діапазоном ММ присутня як в контролі, так і при 120-добовій тепловій стратифікації (рис.7). На відміну від попередніх білків рівень синтезу білків у квадраті, обмеженому ММ 25-55кДа та рІ 4.5-5.4, рівний приблизно такому при 4-х місячній тепловій стратифікації (рис.6,7).

Спектр синтезованих поліпептидів при тепловій і холодній стратифікації в сім'ядолях суттєво відрізняється. Якщо при тепловій стратифікації відмічена активність біосинтезу білка в квадраті, обмеженому ММ 25-55кДа з рІ 5.4-6.5, і взагалі не синтезуються

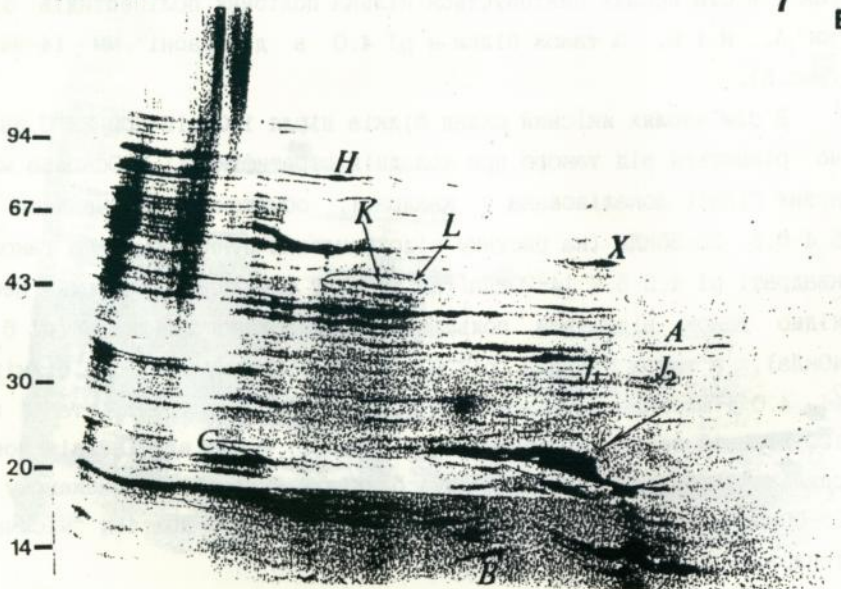
pl 4

7
A



pl 4

7
Б



kDa

Рис. 6 Радиоавтораф двовірний електрофору білків зародкової осі (А) та сім'ядолей (Б) насіння клена татарського, що стратифіковане 120 діб при 4°С.

pI 4

7

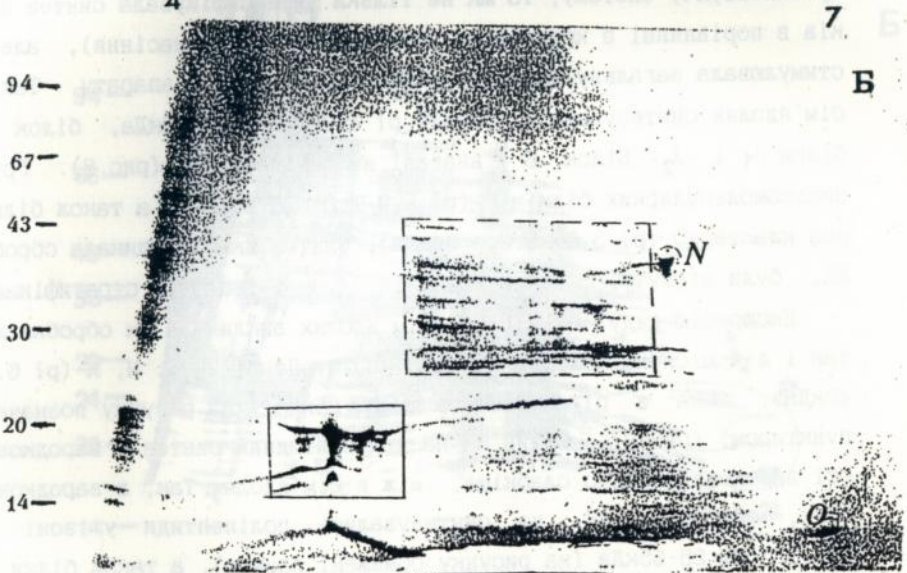
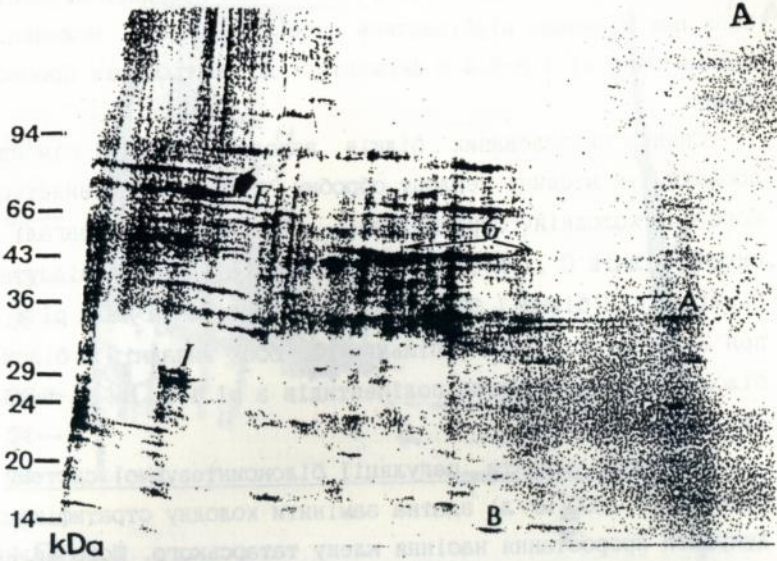


Рис. 7. Радиоавтограф двомірного електрофорезу білків зародкової осі (А) та сім'ядолей (Б) насіння клена срібlistого на 50 добу після цвітіння.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

білки тієї ж ММ, але з рІ 4.5-5.4, при холодній стратифікації на обох цих ділянках відбувається активний синтез. Можливо, поліпептидами зони рІ 4.5-5.4 є ферменти, що контролюють процес проростання.

Спектр синтезованих білків зародкової осі і сім'ядолей, що пройшли 4-х місячну теплову обробку, суттєво відрізняється від такого при холодній стратифікації. Так, при 22°C взагалі відсутній синтез білків С, Н, D. Крім того в сім'ядолях відсутній синтез білків J. У білка I ЗОкДа при 4°C, його зона мала рІ 4.4-4.6, а при 22°C рІ 4.2-4.4. Спільним для обох випадків є білок А, В та білок I, а також група поліпептидів з рІ 4.0, ММ 14-94кДа (рис.6, 7).

6. Деякі аспекти регуляції білоксинтезуючої системи насіння.

Обробка ЖК (500 мг/л) здатна замінити холодну стратифікацію та індукувати проростання насіння клену татарського. Щодо впливу на білоксинтезуючу систему, то ЖК не тільки інтенсифікувала синтез білків в порівнянні з контролем (нестратифіковане насіння), але й стимулювала загальну активність білоксинтезуючого апарату. Так, в сім'ядолях синтезувались білки з рІ 4.0 і ММ 20-40кДа, білок С, білки J₁ і J₂. Білок В - взагалі не синтезувався (рис.8). Група низькомолекулярних білків Р (рІ 5.9-7.0, 28-19кДа), а також білковий кластер Q (рІ 5.0-5.2, 94кДа), синтез яких викликала обробка ЖК, були відсутні як при холодній, так і тепловій стратифікації.

Експресію ряду білків в сім'ядолях викликала як обробка ЖК, так і 4-х місячна холодна стратифікація. Це білки А, Н, X (рІ 6.3, 48кДа), зона з рІ 5.8-6.2 з ММ 20-25кДа (на рисунку позначена пунктиром) (рис.8). Вплив ЖК на поліпептидний синтез в зародковій осі виражений значно слабкіше, ніж в сім'ядолях. Так, в зародкових осях, оброблених ЖК, не синтезувались поліпептиди у зоні рІ 5.5-6.5 ММ 25-65кДа (на рисунку обмежені прямою), а також білки С, G, F. Характерний також низький синтез білків Н, I, В. На флюорограмі відмічено наявність темної смуги рІ 6.5 в діапазоні ММ 14-94кДа біля анодного кінця геля, яка була відсутня в сім'ядолях

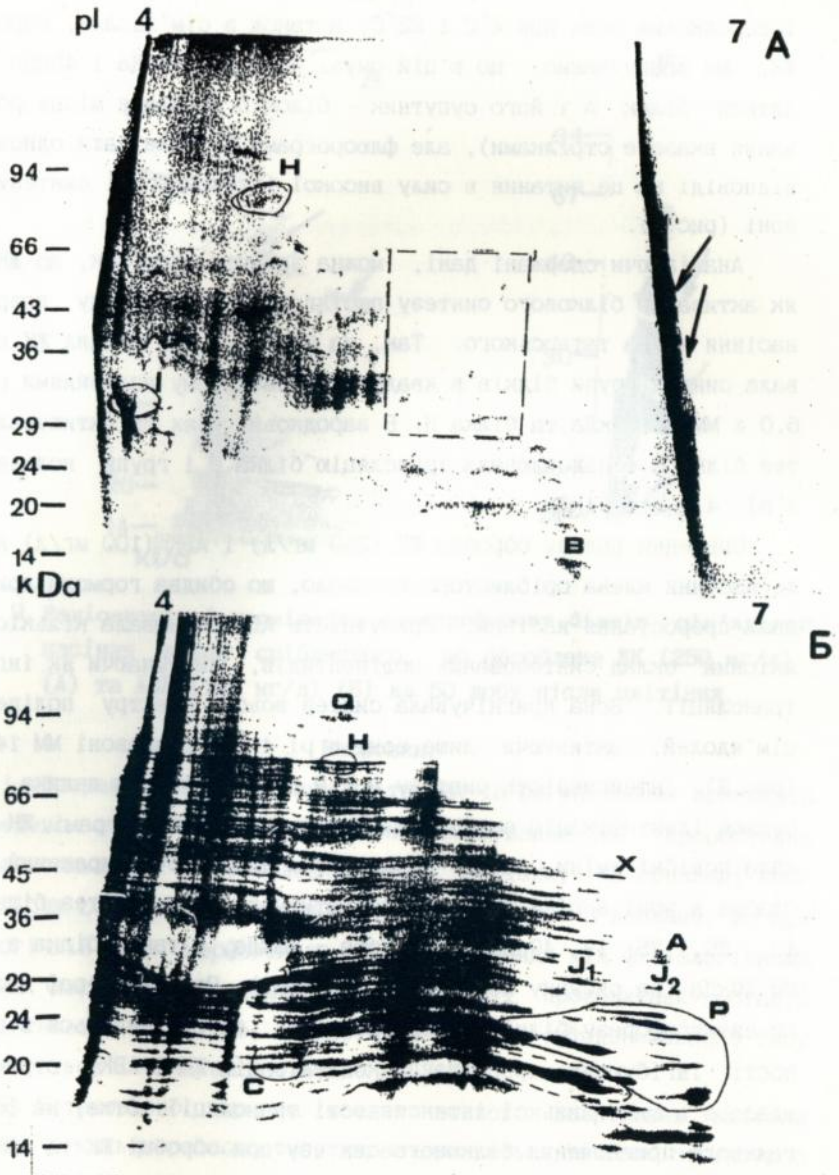


Рис. 8. Радиоавтограф двовірної електрофорезу білків зародкової осі (А) та сім'ядолей (В) насіння клена татарського, що оброблене ЖК (500 мг/л) на 150 добу після цвітіння.

і зародкових осях при 4°C і 22°C, а також в сім'ядолях, оброблених ЖК. Ми припускаємо, що в цій смузі на рівні 36кДа і 45кДа знаходяться білок А і його супутник - білок D (можливе місце розташування вказане стрілками), але флюорограма не може дати однозначної відповіді на це питання в силу високої інтенсивності синтезу в цій зоні (рис.8).

Аналізуючи одержані дані, можна зробити висновок, що ЖК діяла як активатор білкового синтезу протягом всього періоду дозрівання насіння клена татарського. Так, на 65 ДПЩ в сім'ядолях ЖК активувала синтез групи білків в квадраті, обмеженому значеннями рІ 4.1-6.0 з ММ 20-70кДа, та білка Н. В зародкових осях ЖК активувала синтез білка В і підсилювала трансляцію білка С і групи поліпептидів з рІ 4.0 14-94кДа.

Вивчення впливу обробки ЖК (250 мг/л) і АБК (100 мг/л) на зріле насіння клена срібlistого показало, що обидва гормони пригнічували проростання насіння. Присутність АБК змінювала кількісний і якісний склад синтезованих поліпептидів, виступаючи як інгібітор трансляції. Вона пригнічувала синтез всього спектру поліпептидів сім'ядолей, активуючи лише зону з рІ 4.0 в діапазоні ММ 14-67кДа (рис.9). Інтенсивність синтезу в цій зоні настільки велика, що утруднює ідентифікацію окремих поліпептидів на флюорограмі. ЖК викликала подібні зміни, але її ефект в сім'ядолях був виражений значно слабше в зоні з рІ 4.0, де вона активувала лише синтез білків 50, 40, 29, 25, 19, 49кДа і частково - 48кДа, а також білка з рІ 4.5 ММ 49кДа (на рисунку позначені стрілками). Радіоавтограф двомірного електрофорезу білків зародкової осі, що синтезуються в присутності інгібуючих проростання концентрацій ЖК і АБК, отримати не вдалося в силу низької інтенсивності трансляції. Отже, на фоні загального пригнічення білкового синтезу при обробці ЖК та АБК в насінні клену срібlistого активувався синтез подібної групи поліпептидів (рІ 4.0 в діапазоні ММ 14-67кДа).

Таким чином, насіння, що має різні типи спокою, характеризується різною реакцією білоксинтезуючої системи на вплив ЖК.

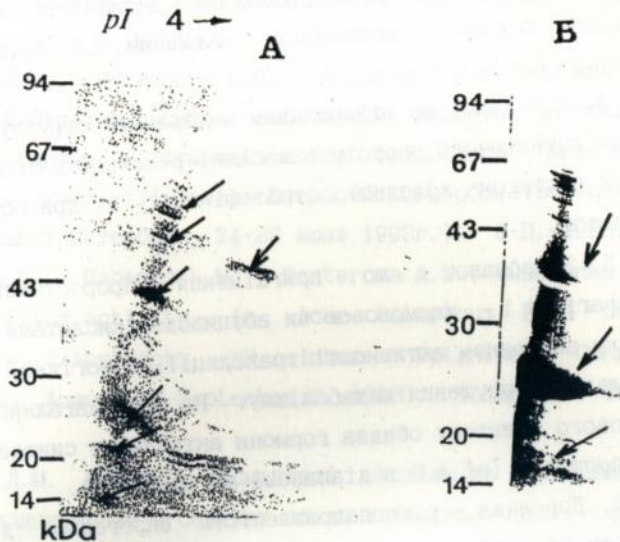


Рис. 9. Радіоавтограф двовірного електрофорезу білків сім'ядолей насіння клена срібlistого, що оброблене ЖК (250 мг/л) (А) та АБК (100 мг/л) (Б) на 50 добу після цвітіння.

Висновки.

1. Вперше з використанням клітинних та регуляторних принципів проведено порівняльне дослідження формування та проростання ортодоксального та рекальцитратного насіння, на прикладі *Acer tataricum* L. та *A. saccharinum* L. - відповідно. З'ясовано, що при аналогічній схемі морфогенезу зародків різниця між фізіологічними типами насіння проявляється у швидкості проходження стадій ембріогенезу. Крім того, ембріогенез насіння ортодоксального типу доповнюється стадією збезводнення.

2. Встановлено, що на момент повного дозрівання клітини насіння рекальцитратного типу характеризуються типовою структурою функціонально активної клітини. Мембранна система клітин зародка насіння ортодоксального типу на завершальних етапах ембріогенезу зазнає суттєвих змін, весь об'єм клітини заповнюється ліпідними краплями та білковими тілами.

3. Показано, що при переході насіння *A. tataricum* L. в стан

спокою відбувається різке зниження активності білоксинтезуючого апарату, котрий залишається активним в зрілому насінні *A. saccharinum* L.

4. Доведено, що відновлення мембранної структури та активності білоксинтезуючого апарату в насінні рекальцитратного типу відбувається протягом холодної стратифікації чи при обробці жасмоновою кислотою.

5. З'ясовано, що пригнічення проростання насіння *A. saccharinum* L. жасмоновою чи абсцизовою кислотами супроводжується різким зниженням активності трансляції, вірогідно, внаслідок більш загального порушення метаболізму. На фоні загального пригнічення білкового синтезу обидва гормони активували синтез подібної групи поліпептидів (рІ 4.0 в діапазоні ММ 14-67кДа).

6. Доведена різнонаправленість екзогенної дії жасмонової кислоти на насіння з різним типом спокою, що проявляється в стимуляції проростання для ортодоксального насіння та пригніченні проростання для рекальцитратного.

7. Показано, що синтез білків D, H, J, A та поліпептидів з рІ 5.8-6.2 ММ 20-25 кДа активувався протягом холодної стратифікації і обробки ЖК та навпаки пригнічувався в умовах, що не сприяли виходу із стану спокою. Очевидно, вихід із стану спокою пов'язаний із синтезом саме цих білків.

Список робіт, опублікованих за матеріалами дисертації:

1. Babenko L.M., Nesterova A.N., Musatenko L.I. Changes in protein synthesis during stratification and jasmonic acid treatment of *Acer tataricum* seed // *Biologia plantarum*.-1994.- V.36 (suppl.) P.108.

2. Бабенко Л.М., Козеко Л.Е., Нестерова А.Н., Мусатенко Л.И. Влияние холодной стратификации и обработки жасмоновой кислотой на интенсивность трансляции в семенах клена татарского (*Acer tataricum* L.) // Докл. АН Украины.-1994.-8.-С.155-157.

3. Бабенко Л.М., Нестерова А.Н., Мусатенко Л.И. Вплив холодної стратифікації та жасмонової кислоти на інтенсивність синтезу біл-

ків і РНК в насінні *Acer tataricum* L. //Укр. ботан. журнал.-1995.-1, 52.- С. 93-97.

4. Бабенко Л.М., Нестерова А.Н., Мусатенко Л.И., Сьтник К.М. Влияние холодной стратификации и жасмоновой кислоты на белково-нуклеиновый синтез в семенах клена татарского (*Acer tataricum* L.) //Тез. докл. III съезда Всероссийского общества Физиологов растений (Санкт-Петербург, 24-29 июня 1993г.).- С-П.-1993.-С.10.

5. Kozeko L.E., Babenko L.M., Nesterova A.N., Musatenko L.I. Protein-synthesizing activity in *Acer tataricum* seed during dormancy release //Abstracts XV Inter. Botanical Congress (Yokohama, Japan, August 28-September 3, 1993).- Yokohama. -1993.- P.441.

6. Бабенко Л.М. Влияние жасмоновой кислоты на интенсивность трансляции и транскрипции в семенах клена татарского (*Acer tataricum* L.) //Тез доп. конф. молодых ученых і спеціалістів "Актуальні питання ботаніки і екології" (19-21 жовтня 1993, Ялта).-Київ.-С.7.

Анотация.

Бабенко Л.М. Структурно-функциональные особенности семян с различным типом покоя.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.12 - физиология растений, Киевский университет им. Тараса Шевченко, Киев, 1995.

Защищается диссертация, по материалам которой опубликовано 6 научных работ. При использовании различных методических подходов получены новые данные, касающиеся субмикроскопической организации и белково-нуклеинового обмена семян с различным типом покоя. Установлены общие закономерности изменения клеточных структур, синтеза белков и нуклеиновых кислот на протяжении различных этапов онтогенеза в семенах с различным типом покоя. Анализ *in vivo* синтеза белка методом двумерного электрофореза позволил выявить ключевые белки, необходимые для инициации прорастания семян. Семена с различным типом покоя характеризуются различным

физиологическим эффектом, в том числе реакцией белоксинтезирующей системы на влияние ЖК.

Brief information.

Babenko L.M. Structural-functional peculiarities of seeds with different types of dormancy.

Thesis for a candidate of biological sciences degree, speciality 03.00.12 -plant physiology - Taras Shevchenko University, Kiev, 1995.

The thesis material of which has been used to publish 6 research works is defended. The application of different methods approaches have made it possible to obtain new data concerning the submicroscopic organization and protein-nucleic exchange in seeds with different types of dormancy. Some general regularities of changes in the cell structure, protein synthesis and nucleic acids during different stages of ontogenesis in seed with different types of dormancy have been established. Analysis of protein synthesis in vivo using the two-dimension electrophoresis has allowed to find the key proteins required for the initiation of seed germination. Seed with different types of dormancy are characterized by different physiological effects including response of the protein synthesizing system to JA influence.

Ключові слова: клен татарський, клен срібlistий, насіння, спокій, стратифікація, жасмонова кислота, абсцизова кислота, білок, РНК.

08455

AB 32.363

AB 32.363