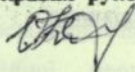


Київський університет імені Тараса Шевченка

На правах рукопису



СЕХ

ОЛЕНА КОСТЯНТИНІВНА

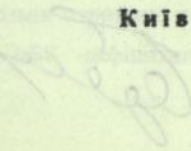
**СИНТЕЗ БІЛКІВ У МЕРИСТЕМАХ КОРЕНІВ КУКУРУДЗИ  
ПІД ВПЛИВОМ ГІПОТЕРМІЇ ТА ФІТОГОРМОНІВ**

*03. 00. 12 - фізіологія рослин*

**АВТОРЕФЕРАТ**

*дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук*

**Київ - 1997**



ЛІБ ім. В. Стефанива  
АН України

581.1



00751838 (W)

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Львівському державному університеті ім. Івана Франка та Інституті фізіології рослин і генетики НАН України (м. Київ).

Наукові керівники:

доктор біологічних наук, професор  
академік ВШ України  
Терек Ольга Іштванівна  
доктор біологічних наук  
Троян Віра Михайлівна

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор  
Мусатенко Людмила Іванівна  
доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент УААН  
Гудков Ігор Миколайович

Провідна установа:

Інститут екології Карпат НАН України  
(м. Львів)

Захист дисертації відбудеться "27" БЕРЕЗНЯ 1997 року 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: м. Київ, пр. Глушкова, 2.

Поштова адреса 252033, Київ 33, вул. Володимирська, 64

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Київського університету імені Тараса Шевченка

Автореферат розіслано "27" ЛЮТОГО 1997 року

Вчений секретар

кандидат біологічних наук, професор

О.В. Брайон

AB - 37, 025

## ВСТУП

Актуальність проблеми. Температура є одним із важливих чинників середовища, який визначає ріст, розвиток та географічне поширення рослин. Необхідність вирощування сільськогосподарських культур у нестійких температурних умовах, характерних для багатьох регіонів інтенсивного землеробства, зумовлює актуальність дослідження процесів, що забезпечують їх адаптацію та реалізацію потенційної продуктивності генотипу. Важливість вивчення цих питань у зв'язку з дією низьких позитивних температур підсилюється їх унікальною роллю в регуляції окремих етапів онтогенезу рослин, таких як вихід клітин зародків насіння деяких видів зі стану спокою чи переходу озимих рослин до генеративного розвитку, а також у підвищенні стійкості теплолюбивих культур у процесі загартування (Николаева, 1967; Туманов, 1979).

Внаслідок інтенсивних фізіологічних досліджень реакції рослинних клітин на несприятливі умови навколишнього середовища, виконаних протягом останнього десятиріччя, отримано дві групи даних. З одного боку, виявлено зміни у фітогормональному комплексі, зокрема, нагромадження абсцизової кислоти (АБК) у відповідь на різні види стресів, в тому числі і на дію несприятливих температур, завдяки чому цей гормон отримав назву "стресового" (Wright, 1977; Davies, Zhang, 1990; Chen et al., 1993). Значення цього класу сполук у реакції на стресові умови підтверджується також тим, що стійкість рослин до їх дії можна підвищити за допомогою екзогенно введених фітогормонів чи синтетичних регуляторів росту, які мають близький спектр фізіологічної активності (Бочарова и др., 1983; Ott et al., 1986; Волкова, Титов, 1992).

Останнім часом чіткі докази ролі фітогормонів у формуванні стійкості рослинних організмів отримано у дослідях з генетичними мутантами. Так, виявлено, що у АБК-дефіцитних мутантів на відміну від диких форм

ЛІНБ ім. В. Стефанива  
АН України

загартування не супроводжувалося формуванням стійкості до гіпотермії, тоді як при додаванні екзогенної АБК вона з'являлася (Heino et al., 1990).

З другого боку встановлено, що одним з основних механізмів впливу несприятливих чинників на біологічні об'єкти є синтез специфічних білків, яким відводять роль у модуляції та протекції окремих клітинних функцій при стресі і в процесі розвитку адаптації до нього (Levitt, 1980; Graham, Patterson, 1982; Войников, Корытов, 1991).

Важливим напрямком подальших досліджень, який активно розвивається у сучасній фізіології рослин, є вивчення взаємозв'язку між цими процесами, тобто, чи опосередковують зміни в ендогенному рівні фітогормонів вплив стресових чинників на синтез білків (Sachs, Ho, 1986; Luo et al., 1992; Мусієнко та ін., 1995). Дані, які свідчать про зв'язок цих процесів, також отримано при вивченні ролі АБК: виявлено та охарактеризовано ряд генів, експресія яких індукується АБК та різними видами стресів (Lang, Palva, 1992).

Вищеописані результати отримано у дослідях з диференційованими клітинами, окремими органами чи цілими проростками. Але відомо, що найчутливішими до дії екстремальних чинників у вищих рослин є апікальні меристеми, функціонування яких забезпечує відновлення росту після їх дії протягом всього онтогенезу. Саме реакція клітин апікальних меристем на дію температури має визначальну роль в реалізації температурного ефекту протягом стадії яровізації, чи у підвищенні стійкості рослини протягом фаз загартування (Гродзинский и др., 1981). В той же час аналіз впливу умов середовища на клітини меристем проводився переважно на цитологічному рівні шляхом дослідження мітотичної активності чи кінетики клітинного циклу (Гудков, 1974; Barlow, Rathfelder, 1985). Лише поодинокі роботи присвячені вивченню метаболічних процесів у цих умовах (Родченко и др., 1988). Тому дослідження особливостей фітогормонального комплексу та специфічності синтезу білків у зв'язку з

функціональною активністю меристем в умовах дії низькотемпературного стресу є актуальним як для з'ясування механізмів стійкості, так і для розробки способів її підвищення.

Мета та завдання роботи. Метою роботи було комплексне дослідження впливу гіпотермії на фітогормональний статус, синтез білків та функціональну активність меристеми коренів проростків кукурудзи сорту Закарпатська жовта зубовидна.

Для досягнення цієї мети було поставлено такі конкретні завдання:

- дослідити вплив зниженої температури на розмір та мітотичну активність меристеми кореня;
- дослідити біологічну активність та кількісний вміст фітогормонів у клітинах меристеми при дії низької температури;
- вивчити динаміку впливу гіпотермії, АБК та 6-бензиламінопурину (6-БАП) на інтенсивність синтезу білків у меристемах коренів;
- провести порівняльний аналіз поліпептидного складу легкокорозчинних білків меристем при дії фітогормонів в умовах оптимальної та низької температури.

Наукова новизна та практична цінність роботи. Отримано нові дані стосовно реакції клітинної популяції меристеми кореня проростків кукурудзи сорту Закарпатська жовта зубовидна на дію низької температури  $8 \pm 1^\circ \text{C}$  протягом 24 год. Встановлено, що зниження мітотичної активності в меристемі супроводжується зростанням вмісту та біологічної активності фітогормонів АБК і цитокінінів та зменшенням рівня індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК). Баланс ендогенних фітогормонів у меристемі змінюється в сторону зростання кількості інгібітора росту. На фоні зменшення загальної інтенсивності синтезу білка виявлено специфічні для окремих періодів впливу гіпотермії зміни їх поліпептидного складу. Виділено та охарактеризовано групу "стресових" білків, активація яких відбувається відразу після дії гіпотермії, та групу білків "раннього періоду адаптації" клітин меристеми

до даного чинника. З використанням різних способів нанесення АБК ( $10^{-6}$  М) та 6-БАП ( $10^{-11}$  М) показано, що підвищення ендogenous вмісту АБК та цитокінінів має захисний вплив на функціонування білоксинтезуючого апарату клітин, проте здатність підтримувати мітотичну активність меристеми на контрольному рівні в умовах гіпотермії характерна тільки для цитокініну. Виявлено зміни у поліпептидному складі білків меристем, які відбуваються під впливом 6-БАП та АБК в умовах оптимального та несприятливого температурних режимів.

Результати роботи обґрунтовують можливість та способи використання сполук із цитокініновим типом активності для підвищення стійкості рослин до низькотемпературного стресу.

Матеріали дисертації використовуються у загальному курсі "Фізіологія рослин" та спецкурсі "Фізіологія рослинної клітини" біологічного факультету Львівського державного університету ім. Івана Франка та послужили основою для виконання студентами курсових та дипломних робіт.

Основні положення, що виносяться на захист.

1. Зниження мітотичної активності в меристемі кореня дводобових проростків кукурудзи сорту Закарпатська жовта зубовидна при 24 год. дії температури  $8 \pm 1^\circ\text{C}$  спричинено зміною її фітогормонального балансу: підвищенням біологічної активності та кількісного вмісту АБК, цитокінінів та зменшенням рівня ауксинів.

2. Підвищення ендogenous вмісту АБК та цитокінінів має захисний вплив на функціонування білоксинтезуючого апарату клітин меристем в умовах гіпотермії; здатність підтримувати мітотичну активність меристеми на контрольному рівні характерна тільки для цитокініну.

3. На фоні зниження інтенсивності синтезу загальних білків клітин меристеми при дії гіпотермії зростає відносний вміст легкокорозчинних "стресових" білків з мол. масою 12 - 17,5; 23; 25; 26,6; 35,5; 36,5; 37; 38; 46; 48;

100 та 110 кДа та білків “раннього періоду адаптації” до гіпотермії з мол. масою 30; 39; та 58 кДа.

**Апробація роботи.** Матеріали, викладені у дисертації, доповідалися на щорічних наукових конференціях професорсько-викладацького складу біологічного факультету Львівського державного університету ім. Івана Франка (1994-1995); на 8-й міжнародній конференції “Вивчення онтогенезу рослин природних та культурних флор у ботанічних закладах Євразії” (Київ, 1995); на міжнародній конференції “Progress in plant sciences from plant breeding to growth regulation” (Угорщина, 1996); на X конгресі Європейської Федерації Фізіологів Рослин (FESPP) (Італія, 1996); на VI конференції молодих вчених, присвяченій 50-й річниці з дня заснування Інституту фізіології рослин та генетики НАН України (Київ, 1996).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 9 робіт.

**Структура та об’єм роботи** Дисертаційну роботу викладено на 169 сторінках друкарського тексту. Вона містить 7 таблиць, ілюстрована 22 рисунками. Список цитованої літератури містить 306 найменувань.

### **МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

**Об’єкт досліджень.** Об’єктом досліджень були меристеми коренів дводобових проростків кукурудзи сорту Закарпатська жовта зубовидна. Насіння пророщували у темряві при температурі  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ . Через 48 годин проростки з довжиною коренів 2,5-3,5 см відбирали і використовували для подальших досліджень при двох температурних режимах:  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  (контроль) та  $8 \pm 1^\circ\text{C}$  (дослід).

**Визначення розмірів меристеми та її мітотичної активності.** Розміри меристеми аналізували на постійних цитологічних препаратах поздовжніх зрізів коренів шляхом вимірювання ареалу мітотичних поділів та довжини послідовно розташованих клітин кори. Визначали відстань від ініціалей, на якій ці показники змінювалися, що свідчить про початок зони розтягу

клітин. Фіксували корені у суміші Навашина. Зрізи, товщиною 8-10 мкм фарбували гематоксиліном за Гейденгайном.

Дослідження біологічної активності та кількісного вмісту фітогормонів. Екстрагування ендогенних АБК та ІОК з меристем коренів дводобових проростків кукурудзи проводили за методом В.І.Кефелі із співавторами (1973), а цитокінінів - за методом, описаним Р.А. Карначук та співавторами (1990). Очищення від супутніх речовин та концентрування екстрагованих фітогормонів проводили за методом С.В. Савінського із співавторами (1991). Біологічну активність ендогенних гормонів аналізували методом біотестування: АБК та ІОК - за приростом довжини колеоптилів пшениці сорту Миронівська 808 (Бойчук, Зайцева, 1977), цитокініни - за приростом маси сім'ядолей огірка сорту Далекосхідний (Процко, Варшавська, 1977). Кількісний вміст АБК, ІОК та цитокінінів визначали за допомогою спектроденситометричної тонкошарової хроматографії (СДТХ) з використанням спектроденситометра Camag TLC Scanner (Швейцарія) (Савинский и др., 1987). Баланс ендогенних фітогормонів розраховували за формулою, як описано (Савинский и др., 1992).

Дослідження впливу 6-БАП та АБК на ріст проростків кукурудзи. Для підбору концентрацій 6-БАП та АБК, які б використовувалися при дослідженні їх впливу на функціональну активність меристем, дводобові проростки переносили на розчини АБК та 6-БАП у діапазоні концентрацій  $10^{-4}$  -  $10^{-8}$  М та  $10^{-6}$  -  $10^{-11}$  М відповідно і вирощували при температурі 27°C та 8°C. Вимірювання розмірів меристеми, її мітотичної активності проводили через 24 години за описаними вище методами. Вплив фітогормонів та гіпотермії на ріст проростків кукурудзи аналізували шляхом вимірювання їх висоти, маси надземної частини та кореня через 24 та 72 години.

Дослідження інтенсивності синтезу білка за включенням радіоактивного попередника. Інтенсивність синтезу білка у клітинах меристем визначали за включенням  $^{14}\text{C}$ -лейцину (шитома активність  $4,4 \times 10^{11}$  Бк/мМ, концентрація

0,2 Мбж/мл), час інкубації меристем 1 год. Кількісний вміст білка визначали за методом Лоурі (Lowry et al., 1951), радіоактивність - за допомогою сцинтиляційного лічильника ISOCAP - 300.

Аналіз поліпептидного складу білків меристем методом електрофорезу у поліакриламідному гелі. Поліпептидний склад фракції легкорозчинних білків клітин меристем вивчали за допомогою одномірного електрофорезу у градієнтному ПААГ (7,5-22%) у присутності ДДС-На за методом Лемлі (Laemmli et al., 1970). На кожен доріжку наносили однакову кількість білка. Гелі сканували на денситометрі Beckman DU-8.

Статистичне опрацювання результатів експериментів. Цитологічні досліди виконані у 6-8 повторностях, а біохімічні - не менше як у трьох повторностях. Отримані результати опрацьовували статистично. Визначали середнє арифметичне, стандартну похибку. Достовірність різниці між варіантами оцінювали за критерієм Ст'юдента, використовуючи 5% рівень значущості.

## **РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

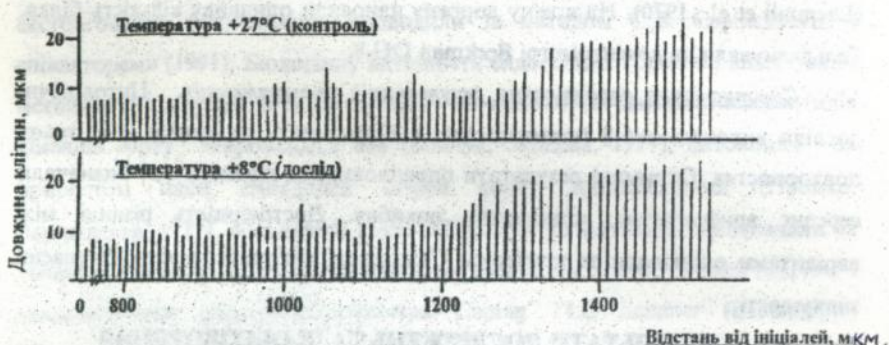
### **1. Вплив гіпотермії на структуру меристеми кореня проростка кукурудзи, мітотичну активність та її фітогормональний статус.**

Відомо, що у переважної більшості видів рослин оптимальними для поділу клітин кореня і переходу їх до розтягу є  $t$  25°-27°C, відхилення значень якої в сторону підвищення чи зниження температури гальмує ростові процеси. Температурні межі для росту коренів кукурудзи знаходяться в інтервалі від 9° до 40°C (Barlow, 1972). Інкубація коренів біля нижньої межі збільшує стійкість клітин меристеми до короткочасового охолодження в середньому на 4,2°C (Родченко и др., 1988). Тому у варіантах наших дослідів використовували температуру  $8 \pm 1^\circ\text{C}$ , вплив якої спостерігали при 2-24 годинних експозиціях.

Встановлено, що інкубація дводобових проростків кукурудзи сорту Закарпатська жовта зубовидна протягом 24 год. при  $8 \pm 1^\circ\text{C}$  гальмує

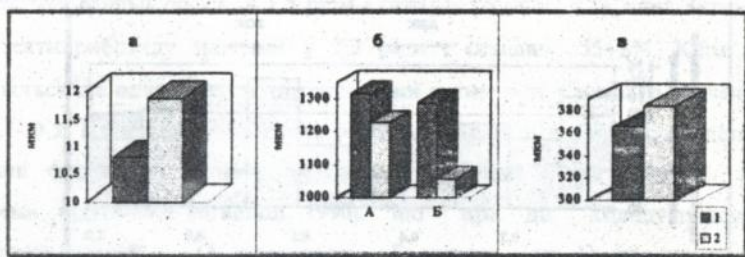
утворення пагонів та інтенсивність росту первинного кореня. У контрольному варіанті швидкість росту кореня була  $1,25 \pm 0,10$  мм/год., а при дії гіпотермії сповільнювалася в 2,3рази і складала  $0,54 \pm 0,07$  мм/год.

**Розміри меристеми кореня.** Аналіз цитологічних препаратів поздовжніх зрізів коренів проростків кукурудзи показав, що протягом перших 1,3 мм від ініціалей середня довжина клітин первинної кори у контрольному варіанті мало змінюється і складає  $10,80 \pm 0,09$  мкм (рис.1/2). Після цього вона



**Рис. 1.** Гістограма розподілу довжини клітин у рядах первинної кори меристеми кореня проростків кукурудзи

зростає до 17,5-20 мкм, що свідчить про початок зони розтягу клітин. Протягом перших  $1,29 \pm 0,01$  мм на зрізах спостерігаються мітотичні фігури, після цієї відстані вони зустрічаються рідко. Співставлення отриманих результатів показало, що меристематична зона дводобових проростків кукурудзи даного сорту простягається на відстань  $1,32 \pm 0,01$  мм від ініціалей. Через 24 год. дії  $t 8^{\circ}\text{C}$  мітози спостерігаються тільки протягом першого мм від ініціалей, а довжина клітин починає помітно збільшуватися дещо пізніше (рис.1). Тому розмір меристеми у цьому варіанті визначали за другим показником, він склав  $1,23 \pm 0,03$  мм. Одночасно спостерігалась тенденція до збільшення довжини чохла до  $0,38 \pm 0,01$  мм та середньої довжини клітин меристеми. У підсумку загальна довжина меристеми і чохла



**Рис. 2.** Вплив гіпотермії на розміри меристеми коренів проростків кукурудзи

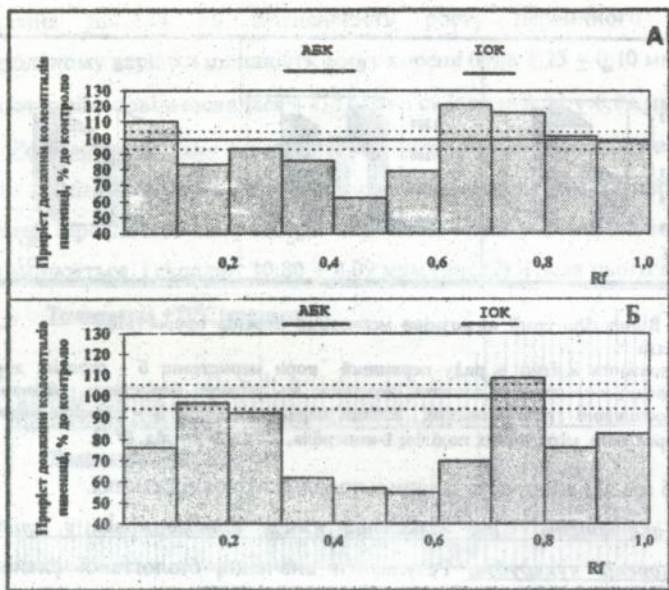
а - середня довжина клітин в ряду первинної кори меристеми; б - середня довжина меристеми кореня; в - середня довжина чохла; А - розміри меристеми, визначені за довжиною послідовно розташованих клітин первинної кори; Б - розміри меристеми визначені за ареалами мітотичних поділів; 1-контроль, 27°С; 2- дослід, 8° С.

складала 1,6 мм, її використовували у подальших дослідженнях.

**Біологічна активність та кількісний вміст фітогормонів у клітинах меристем коренів кукурудзи.**

Результати вивчення біологічної активності екстрактів фітогормонів наведено на рис. 3, 4. Встановлено, що речовини, ідентичні за розташуванням препарату - свідка АБК, знаходяться у зонах із значеннями Rf 0,3 - 0,45. Інгібуюча активність зон з Rf 0,1 - 0,2 та 0,5 - 0,6 може бути зумовлена присутністю супутніх коекстрактивних неідентифікованих фенольних сполук. Крім того, при перегляді хроматограм в УФ-світлі виявлено, що Rf препарату синтетичної ІОК знаходиться в межах 0,65 - 0,75. Отже, стимуляція росту колеоптилів на 16-21% у цих зонах зумовлена присутністю ІОК (рис. 3, А).

У меристемах коренів рослин, що інкубувалися протягом 24 годин при 8°С загальна інгібуюча активність зростала у всіх зонах гістограм, а у зонах з АБК - в 1,6 рази. Крім того, з'являлася інгібуюча активність у зонах з Rf 0-0,1 та 0,8-1,0. Проте низька позитивна температура негативно впливала на активність ІОК. Так, після 24 годин її дії, середня активність зон гормону знижувалася на 29±8% порівняно із контрольним варіантом.



**Рис. 3.** Біологічна активність АБК та ІОК у клітинах меристем коренів кукурудзи  
 А - 27°C; В - 8°C; \_\_\_\_ зона розташування препаратів - свідків АБК та ІОК

Як свідчать результати дослідження біологічної активності цитокинінів (рис. 4, А), у контрольному варіанті виявлено області з цитокиніновою активністю у зонах із значеннями Rf 0,3-1,0. Після ідентифікації гормонів в УФ-світлі за розташуванням препаратів - свідків встановлено, що підвищена цитокинінова активність у зонах з Rf 0,7 - 1,0 зумовлена присутністю цитокиніну зеатину, а у зонах з Rf 0,30 - 0,50 - зеатинрибозиду. Середня активність зон зеатину складала  $45 \pm 8\%$  від загальної стимулюючої, зеатинрибозиду -  $24 \pm 8\%$ .

Після 24 годинної дії низької температури біологічна активність цитокинінів у меристематичних клітинах помітно зростала. Так, приріст маси сім'ядолей огірків під впливом фракцій із зон з Rf, значення яких співпадає із значенням

Rf зеатину, збільшувався, в 1,5 рази і складав  $69 \pm 8\%$ , а середня йктивність зон зеатинрибозиду зростала у 2,3 рази і складала  $55 \pm 8\%$ . Крім того, з'являється ще одна область цитокинінової активності у зонах із значеннями Rf 0,1- 0,3. Ця малорухома група речовин, за деякими даними, представляє зв'язані форми цитокинінів, можливо глюкозиди (Davey, Staden, 1978). Зокрема, відзначено (Brandon, 1990), що при дії холоду цитокиніни перетворюються в О-глюкозиди. Вважають, що О-глюкозиди є

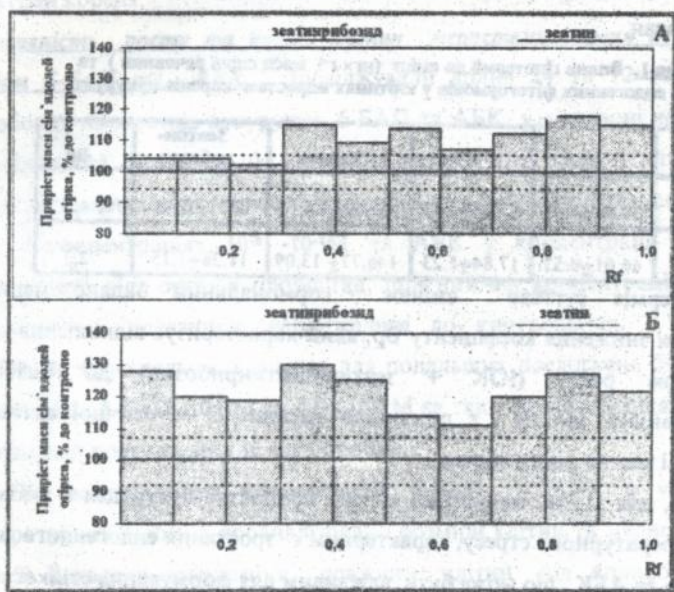


Рис. 4. Біологічна активність цитокинінів у клітинах меристем коренів кукурудзи

А - 27°C; В - 8°C; — зона розташування препарату - свідка зеатину, зеатинрибозиду

активними у біотестах, що може бути пов'язано з легким перетворенням цих сполук у вільні форми (Веденичева, Мусатенко, 1990).

Дані кількісного аналізу, проведеного за допомогою методу СДТШ, підтверджують результати біотесту (табл. 1). При дії зниженої температури

кількість АБК зростала в 1,7 рази і становила  $66,01 \pm 6,53$ , порівняно із  $39,69 \pm 3,67$ ,  $\text{нг} \times \text{г}^{-1}$  маси сиріої речовини у контролі, тоді як вміст ІОК зменшується від  $67,04 \pm 6,13$  до  $17,84 \pm 1,23$   $\text{нг} \times \text{г}^{-1}$  маси сиріої речовини. Вміст зеатину у меристемах коренів контрольних рослин значно перевищує кількість його транспортної форми зеатинрибозиду. При дії температури  $8^\circ\text{C}$  протягом 24 годин у клітинах меристем особливо помітними були зміни у вмісті зеатинрибозиду, кількість якого зростала у 5,3 рази, тоді як зеатину - лише в 1,3 рази.

**Таблиця 1.** Вплив гіпотермії на вміст ( $\text{нг} \times \text{г}^{-1}$  маси сиріої речовини) та баланс ендогенних фітогормонів у клітинах меристем коренів кукурудзи

Варіанти	АБК	ІОК	Зеатин	Зеатин-рибозид	Вр
$+27^\circ\text{C}$ (контроль)	$39,60 \pm 3,67$	$67,04 \pm 6,13$	$116,49 \pm 10,15$	$2,12 \pm 0,30$	4,7
$+8^\circ\text{C}$ (дослід)	$66,01 \pm 6,53$	$17,84 \pm 1,23$	$146,77 \pm 13,09$	$11,26 \pm 1,15$	2,7

Гіпотермія суттєво змінює гормональний баланс меристем, викликаючи зниження коефіцієнту Вр, який характеризує відношення вмісту стимуляторів росту (ІОК + зеатин+зеатинрибозид) до інгібіторів (АБК). Очевидно, що це і є причиною зменшення мітотичної активності меристеми і темпів росту кореня.

Отже, для клітин меристеми кореня проростка кукурудзи в умовах дії низькотемпературного стресу, характерним є зростання ендогенного вмісту цитокінінів та АБК, що може бути важливим для формування стійкості їх до даного чинника. Одним із механізмів участі фітогормонів у цьому процесі може бути вплив на роботу білоксинтезуючого апарату клітин, від чого залежатиме функціональна активність меристеми в нових умовах. Вивчення цих питань було предметом наших подальших експериментів. Для моделювання впливу підвищеної кількості фітогормонів у меристемах коренів кукурудзи використали спосіб обробки проростків екзогенними АБК та 6-БАП. Як показник функціональної активності меристем визначали

інтенсивність синтезу білків та мітотичного поділу клітин в умовах гіпотермії та при дії фітогормонів.

## 2. Вплив 6-БАП та АБК на інтенсивність синтезу білка у клітинах меристем коренів проростків кукурудзи в умовах гіпотермії

На першому етапі роботи з метою опрацювання умов експериментів з екзогенними фітогормонами проведено порівняльне дослідження дії різних їх концентрацій на морфометричні показники проростків кукурудзи та розміри меристеми кореня.

Інтенсивність росту та поділу клітин меристеми кореня кукурудзи під впливом 6-БАП та АБК. Досліджували вплив 24 та 72 год. обробки дводобових проростків кукурудзи 6-БАП та АБК у діапазоні концентрацій відповідно  $10^{-6}$  -  $10^{-11}$ М та  $10^{-4}$  -  $10^{-8}$ М на висоту, масу колеоптиля і кореня в умовах оптимального та низькотемпературного режимів. Встановлено, що 6-БАП у концентраціях  $10^{-6}$  -  $10^{-9}$ М та АБК у концентрації  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$ М пригнічували ріст органів проростка, при нижчих концентраціях значення досліджуваних показників наближалися до контрольних. На підставі результатів порівняльного аналізу для подальших досліджень було вибрано концентрації 6-БАП -  $10^{-11}$ М та АБК -  $10^{-6}$ М як такі, що не викликали помітних модифікацій росту кореня за час обробки.

Під впливом цих концентрацій 6-БАП та АБК в умовах двох температурних режимів проаналізовано розміри клітин та меристеми кореня (табл. 2). Виявлено зменшення довжини клітин під впливом обох

**Таблиця 2.** Вплив 6-БАП та АБК на розмір клітин та тканин апікальної частини кореня через 24 год. обробки

показники варіанти	Довжина зони меристеми, мкм від ініціалей	Довжина зони чохла, мкм	Середня довжина клітин первинної кори меристеми, мкм
Н. О ( $t + 27^{\circ}\text{C}$ )	$1316 \pm 12$	$366 \pm 11$	$10.80 \pm 0.09$
Н. О ( $t + 8^{\circ}\text{C}$ )	$1227 \pm 33$	$384 \pm 10$	$11.86 \pm 0.10$
6-БАП ( $t + 27^{\circ}\text{C}$ )	$1279 \pm 13$	$346 \pm 17$	$9.71 \pm 0.19$
6-БАП ( $t + 8^{\circ}\text{C}$ )	$1250 \pm 13$	$382 \pm 17$	$10.85 \pm 0.04$
АБК ( $t + 27^{\circ}\text{C}$ )	$1212 \pm 19$	$387 \pm 9$	$9.55 \pm 0.07$
АБК ( $t + 8^{\circ}\text{C}$ )	$1210 \pm 11$	$359 \pm 12$	$11.33 \pm 0.11$

речовин при  $t$  27°C, проте порівняння даних з результатами дослідження мітотичної активності (табл. 3) дає підставу зробити висновок про різну причину цього зменшення. 6-БАП стимулює мітотичну активність і значення середньої довжини клітин може зменшуватися за рахунок новоутворених клітин. АБК, навпаки, гнітить мітотичну активність, викликаючи акумуляцію клітин у  $G_1$ -фазі циклу (Гудков, 1985), що також в результаті знижує значення досліджуваного показника. Під впливом АБК в умовах нормального температурного режиму, а також під впливом обох гормонів в умовах гіпотермії дещо зменшувався арсал меристеми, що враховували у подальших дослідженнях.

Інтенсивність включення  $^{14}C$ -лейцину в білки клітин меристем. Вплив екзогенних фітогормонів на синтез білка вивчали у двох серіях експериментів: 1) дводобові проростки інкубували на розчині АБК чи 6-БАП протягом 24 годин при температурі 27°C, відмивали від гормонів та переносили в умови гіпотермії; 2) проростки переносили на розчині фітогормонів і відразу поміщали в умови гіпотермії.

Як свідчать отримані дані, низька позитивна температура пригнічує інтенсивність синтезу білків у клітинах меристем (рис. 5). Так, уже через 2 години дії  $t$  8°C інтенсивність включення  $^{14}C$ -лейцину знижується на 42%, через 4 години - на 47% і залишається майже на такому ж рівні до 24 години.

Подібне зниження загальної інтенсивності синтезу білка при дії низької температури показано на багатьох об'єктах, але при цьому виявлено індукцію синтезу окремих типів поліпептидів (Войников, Коротков, 1991).

Під впливом обробки 6-БАП при 27°C інтенсивність включення мітки в білок меристем зростає вже через дві години, досягає максимуму через чотири, на 73% перевищуючи контроль і зберігається на такому ж рівні до кінця обробки.

Перенесення передоброблених цитокініном проростків у несприятливий температурний режим також знижує інтенсивність включення  $^{14}C$ -лейцину

вже через дві години, але протягом усіх 24 годин інкубації вона була вищою, ніж у необроблених цитокініном коренях, а наприкінці експозиції навіть

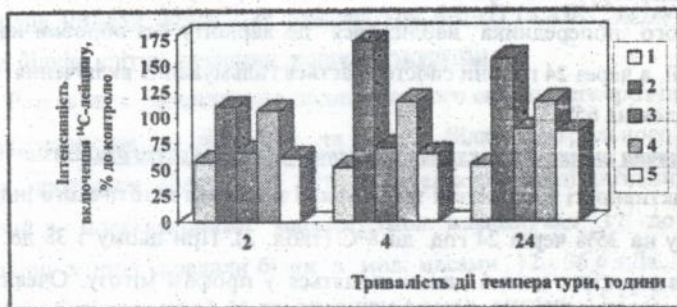


Рис. 5. Вплив передобробки меристем коренів кукурудзи 6-БАП та АБК на включення <sup>14</sup>С-лейцину в білок

1- включення <sup>14</sup> С-лейцину при t 8°C; 2- включення <sup>14</sup>С-лейцину при обробці 6-БАП при t 27°C; 3 - включення <sup>14</sup>С-лейцину при t 8°C після передобробки 6-БАП; 4 - включення <sup>14</sup>С-лейцину при обробці АБК при t 27°C;

5 - включення <sup>14</sup>С-лейцину при t 8°C після передобробки АБК.

зростає (рис. 5). Ці результати дають підстави зробити висновок про те, що збільшення ендогенної активності цитокінінів у меристемі кореня має захисний ефект на збереження її функціональної активності в умовах гіпотермії, оскільки інтенсивність синтезу білку зберігається на більш високому рівні, ніж при дії зниженої температури. При одночасному впливі фітогормону і гіпотермії така закономірність проявилася тільки протягом перших чотирьох годин обробки, а наприкінці її інтенсивність включення амінокислоти істотно знизилася.

При оптимальній для росту температурі під впливом АБК спостерігається тенденція до збільшення включення <sup>14</sup>С-лейцину (рис.5), але статистична обробка свідчить про її недостовірність. При перенесенні оброблених таким чином проростків в умови гіпотермії інтенсивність включення <sup>14</sup>С -лейцину в білок була вищою порівняно із рослинами, які інкубувалися тільки на дистильованій воді, а після 24 годин впливу низької позитивної температури навіть зростала. Ці дані аналогічні описаним у

дослідах з цитокінінами. Проте експозиція коренів на розчині АБК при дії низької температури не проявила захисного ефекту. Рівень включення радіоактивного попередника наближався до варіанту без обробки на 4-й год. інкубації, а через 24 години спостерігається гальмування включення  $^{14}\text{C}$ -лейцину в білок на 65%.

Мітотична активність клітин меристем коренів кукурудзи. Визначення мітотичної активності в меристемі зафіксувало зниження мітотичного індексу в середньому на 35% через 24 год. дії  $8^{\circ}\text{C}$  (табл. 3). При цьому з 38 до 90% збільшується кількість клітин, які знаходяться у профазі мітозу. Очевидно, профазний блок спричинений дією гіпотермії на утворення мітотичного веретена.

**Таблиця 3.** Вплив 6-БАП та АБК на мітотичну активність клітин меристем коренів кукурудзи.

Варіанти	$\text{H}_2\text{O}$		6-БАП		АБК	
	$t+27^{\circ}\text{C}$	$t+8^{\circ}\text{C}$	$t+27^{\circ}\text{C}$	$t+8^{\circ}\text{C}$	$t+27^{\circ}\text{C}$	$t+8^{\circ}\text{C}$
Мітотичний індекс, %	$6.70 \pm 0.22$	$4.40 \pm 0.08$	$8.30 \pm 0.25$	$6.65 \pm 0.4$	$4.15 \pm 0.14$	$4.30 \pm 0.12$

При обробці коренів рослин 6-БАП протягом 24 год. при  $27^{\circ}\text{C}$  мітотична активність клітин зростала на 24%. В умовах дії низької температури і 6-БАП <sup>вони</sup> мали вищу мітотичну активність ніж без цитокініну. При цьому на 12% зменшувалася кількість клітин, які знаходилися у профазі. АБК, натомість, негативно впливала на мітотичну активність клітин, незважаючи на вибір концентрації, яка не пригнічує загальну інтенсивність синтезу білка та слабо модифікує ріст проростка при 24 год. інкубації. Як у нормальному так і у низькотемпературному режимах мітотична активність знижувалася на одну і ту ж величину, а саме на 40%. Причому, якщо при дії АБК при  $27^{\circ}\text{C}$  було виявлено клітини у всіх фазах мітозу, то в умовах гіпотермії, подібно до того, як і при дії однієї температури, також

спостерігалось нагромадження клітин у профазі. Тобто, в умовах низькотемпературного стресу АБК не впливає на мітотичну активність.

### 3. Вплив низької позитивної температури, 6-БАП та АБК на поліпептидний склад білків клітин меристем коренів кукурудзи

Результати дослідження поліпептидного складу легкорозчинних білків клітин меристем представлені на рис. 6. Білки контрольного варіанту, в якому проростки росли при 27°C, при електрофорезі розділилися на 40 фракцій з молекулярними масами (мол. масами) від 12 до 180 кДа. Половину з них склали білки з мол. масами 12 - 36,6 кДа. Найбільша кількість білка властива 16-ти фракціям з мол. масами 12-17,5; 23; 24; 25; 26,6; 28; 36,5; 37; 38; 39; 46; 48; 58; 70; 84; 93 кДа. При дії t 8° С відбуваються зміни у якісному та кількісному складі поліпептидів, причому вони стають помітними вже через 2 год. дії низької температури. Так, аналіз денситограм показав, що в цьому варіанті з'явилися дві нові смуги поліпептидів з мол. масами 100 та 110 кДа, які були присутні і через 4 та 24 год. дії холоду. Інкубація проростків при t 8° С протягом 24 год. призводила до появи ще однієї смуги білка з мол. масою 30 кДа. Крім того, через 2 год. впливу відзначено значне зростання інтенсивності зв'язування барвника фракціями з мол. масами 12- 17,5; 24 ; 25; 26,6; 35,5; 36,5; 37; 38; 46; 48 кДа. Частина цих фракцій через 4 та 24 год. зменшують свою інтенсивність, проте обрахунок площі піків на денситограмах свідчить, що через 24 год. в 1,4 рази зростає відносний вміст білка з мол. масою 39 кДа та в 2,6 рази - 58 кДа.

Виходячи з класифікації В.К.Войникова та М.В. Коритова (1993) можна припустити, що у варіантах наших дослідів білки, вміст яких зростає через 2 години дії зниженої температури, є стресовими, а ті, зміни яких виявлені при триваліших експозиціях - білками початкової фази адаптації клітин меристеми до гіпотермії.

Значні зміни у поліпептидному спектрі білків меристем виявлено і при різних способах дії 6-БАП та АБК, при цьому окремі із них співпадають з тими, що спостерігаються при дії гіпотермії. Так, поява фракції 100 кДа зафіксована

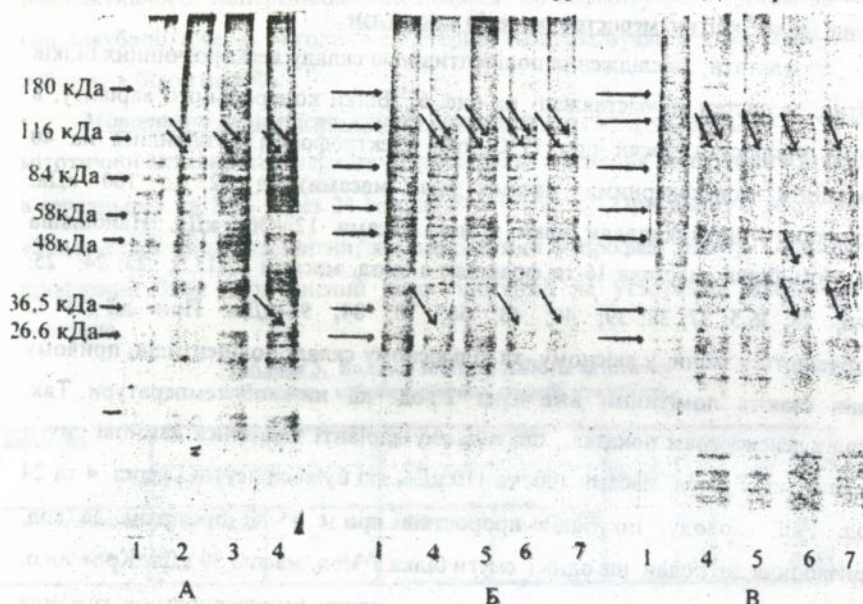


Рис. 6. Електрофоретичні спектри білків меристем коренів кукурудзи в умовах гіпотермії (А); 6-БАП(Б) та АБК (В)

1-контроль - меристема проростків, які росли при 27°C; 2 - 4 вплив температури 8°C протягом 2, 4 та 24 год. відповідно; 5 - обробка 6-БАП (Б) чи АБК (В) при 27°C протягом 24 год.; 6 - обробка 6-БАП (Б) чи АБК (В) при 8°C протягом 24 год.;

7 - передобробка меристем 6-БАП (Б) чи АБК (В) протягом 24 год. при 27°C +24 год. дії гіпотермії.

в усіх варіантах дослідів з обома регуляторами, а 110 кДа - тільки при наявності 6-БАП. Поліпептид 30 кДа спостерігається у варіантах сумісної дії регуляторів і гіпотермії; збільшення низькомолекулярних фракцій 12--17,5 кДа викликає АБК (як при 2-х год. дії 8°C), але зменшує 6-БАП (як спостерігається при 24-х год. дії 8°C). Відносний вміст фракції 46-48 кДа та 116 кДа зростає у варіантах з 6-БАП і знижується з АБК. Зміни цих

поліпептидів виявлено і при дії 8°C. Ці дані дають підстави зробити висновок про те, що зміни поліпептидного складу легкорозчинних білків клітин меристеми кореня при дії низької температури можуть бути індуковані фітогормонами цитокинінами та АБК, ендогенний вміст яких значно модифікується в цих умовах. Специфічні зміни окремих поліпептидних фракцій супроводжують і дію 6-БАП та АБК на клітини меристем при температурі 27°C.

Проведені дослідження деяких сторін метаболізму клітин меристем коренів кукурудзи дали змогу встановити закономірності їх реакції на дані умови та можливий механізм адаптації до них. Нами встановлено, що під впливом низької позитивної температури  $8 \pm 1^\circ\text{C}$  в меристемі кореня дводобових проростків кукурудзи сорту Закарпатська жовта зубовидна зростає концентрація ендогенних цитокинінів та АБК, знижується вміст індоліл-3-оцтової кислоти, гормональний баланс клітин змінюється в сторону збільшення загальної кількості інгібіторів росту; на фоні зниження інтенсивності синтезу загальних білків меристеми відбуваються істотні зміни у поліпептидному складі легкорозчинних білків, специфічних для різних періодів дії гіпотермії, в тому числі активація окремих фракцій; спостерігається зменшення арелу зони меристеми, а також збільшення довжини клітин первинної кори та акумуляція клітин у профазі.

За відомою теорією позиційної інформації (Barlow, Carr, 1984) інтенсивність поділу та розтягу клітин в апексі кореня регулюється концентраційними градієнтами фітогормонів. Тому зміна гормонального статусу меристеми при дії температури 8°C, зокрема зростання вмісту АБК, може спричинити сповільнення кінетики клітинного циклу, зменшення мітотичного індексу та ареалу меристеми і профазний блок клітин, що спостерігається в експериментах як в умовах стресу, так і при обробці АБК. В той же час модифікація фітогормонального балансу в певних межах забезпечує збереження вищої інтенсивності синтезу білків в меристемі та її

функціональної активності в умовах стресу. Опосередковуватися такий ефект фітогормонів може через вплив на функціонування генетичного апарату клітин, про що свідчать виявлені значні зміни у поліпептидному складі білків меристеми кореня. Очевидно, що виявлені зміни в метаболізмі клітин меристеми при дії гіпотермії важливі для забезпечення стійкості цих твірних тканин рослинного організму до даного, а можливо, і до інших видів стресу.

### **ВИСНОВКИ**

1. Зона меристеми кореня дводобових проростків кукурудзи сорту Закарпатська жовта зубовидна, вирощених при температурі  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , простягається на відстань  $1316 \pm 12$  мкм від ініціалей. Після 24 год. дії температури  $8 \pm 1^\circ\text{C}$  збільшується розмір клітин меристеми, зменшується її довжина та мітотична активність, спостерігається акумуляція клітин у профазі.

2. Добова обробка проростків АБК ( $10^{-6}$  М), як при  $27^\circ\text{C}$ , так і при  $8^\circ\text{C}$  зменшує ареал та мітотичну активність меристеми кореня. Під впливом 6-БАП ( $10^{-11}$  М) спостерігається підвищення мітотичного індексу при  $27^\circ\text{C}$  і збереження його значення на контрольному рівні при дії гіпотермії. АБК і 6-БАП зменшують розмір клітин меристеми тільки в умовах оптимального температурного режиму.

3. У меристемі кореня при температурі  $27^\circ\text{C}$  виявлено АБК у кількості  $39,60 \pm 3,67$  нг $\times$ г $^{-1}$  маси сирої речовини, ІОК -  $67,04 \pm 6,13$ , зеатину- $116,49 \pm 10,15$  та зеатинрибозиду- $2,12 \pm 0,30$  нг $\times$ г $^{-1}$  маси сирої речовини. В умовах гіпотермії в 1,6-1,7 рази зростає біологічна активність та вміст АБК та у 2 і 5 разів, відповідно, зеатину та зеатинрибозиду, більше ніж у 3 рази зменшується рівень ауксину.

4. Під впливом низької температури істотно, майже у два рази, зменшується показник балансу ендогенних фітогормонів в сторону збільшення кількості інгібітора росту.

5. Інкубація проростків кукурудзи при температурі  $8 \pm 1^\circ\text{C}$  протягом 2-24 год. знижує інтенсивність синтезу загальних білків клітин меристеми кореня на 42-47%. На цьому фоні спостерігаються значні зміни у поліпептидному складі фракції легкорозчинних цитоплазматичних білків: через 2 год. зростає відносний вміст поліпептидів з мол. масами 12- 17,5; 24 ; 25; 26,6; 35,5; 36,5; 37; 38; 46; 48; 100 та 110 кДа, ідентифікований як пул "стресових" білків, індукованих дією низької температури; через 24 год. формується пул білків "раннього періоду адаптації" клітин меристеми до дії гіпотермії, який характеризується збільшенням відносної кількості фракцій з мол. масою 30; 39 та 58 кДа.

6. Вплив екзогенних АБК ( $10^{-6}$  М) та 6-БАП ( $10^{-11}$  М) на інтенсивність синтезу білка залежить від температури та способу нанесення. Обробка клітин меристем при  $t$   $27^\circ\text{C}$  позитивно впливає на включення міченого попередника у білок і сприяє збереженню вищого рівня інтенсивності його синтезу при дії низькотемпературного стресу.

7. В умовах гіпотермії реакція клітин меристеми кореня на добову обробку АБК та 6-БАП має двофазний характер: через 4 год. виявлено деяке збільшення інтенсивності включення  $^{14}\text{C}$ -лейцину у білок порівняно з контролем, а через 24 год. величина цього показника зменшується більше, ніж у два рази.

8. Окремі зміни у поліпептидному спектрі білків меристеми, виявлені при дії гіпотермії, індукуються обробкою проростків 6-БАП та АБК. Вплив їх на відносний вміст більшості фракцій має протилежний характер.

#### **СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА МАТЕРІАЛАМИ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Сех О.К. Терек О.І., Троян В.М., Романюк Н.Д., Воробець Н.М. Біологічна активність цитокінінів та синтез білків у меристемах коренів кукурудзи в умовах гіпотермії // Вісник Львівського у-ту "Фізіолого-

біохімічна оцінка дії техногенних факторів на рослини". -Львів: Світ, 1996. - №24. -с. 43-47.

2. Сех О.К., Троян В.М., Терек О.І. Вплив АБК на інтенсивність синтезу білка у меристемах коренів кукурудзи в умовах гіпотермії // Укр. ботан. журн. -1997. -54, №1. -с. 91-97.

3. Sekh O., Terek O., Troyan V. The increase of biological activity of abscisic acid and cytokinins, protein synthesis in maize meristematic cells under the low temperature stress // Materials of the Conf. on Progress in Plant Science from Plant Breeding to Growth Regulation. -17-19 June. -1996. -Mosonmagyarovar. - P.5-9,

4. Terek O., Sekh O., Terek K. Response of maize plants to the toxic influence of lead and to the low temperature // Materials of the Conf. on Progress in Plant Science from Plant Breeding to Growth Regulation. -17-19 June. -1996. - Mosonmagyarovar. - P.18-21.

5. Сех О.К., Терек О.І., Троян В.М. Біологічна активність АБК та цитокінінів у меристемах коренів кукурудзи в онтогенезі рослин в умовах гіпотермії // "Вивч. онтогенезу рослин природних та культурних флор у ботанічних закладах Євразії ". 8-ма міжн. конф., Київ. -1995. -с.124.

6. Sekh O., Terek O., Terek K. Stress reactions of Zea mays plants to the toxic influence of lead and low temperature // Relationship in environmental protection. -Wroclaw. -23-25 мая. -1996. -1P.

7. Sekh O., Terek O., Troyan V. "The increase of biological activity of cytokinins and abscisic acid in Zea mays root meristematic cells under the low temperature stress" // Conf. on Progress in Plant Science from Plant Breeding to Growth Regulation. -17-19 June. -1996. -Mosonmagyarovar. -p.30.

8. Sekh O., Terek O., Terek K., Romaniuk N., Tsvilyniuk O., Troyan V. Influence of the low temperature and lead on Zea mays plants //10<sup>th</sup> FESPP Congress, Plant Physiol. and Biochem. -1996, Sp. Issue. -p.250.

9. Сех О.К., Терек О.І., Троян В.М. Біологічна активність АБК та інтенсивність синтезу білка у меристемах коренів кукурудзи в умовах

гіпотермії // Тез. доп. VI конф. молодих вчених (9-11 жовтня, Київ, Ін-т фізіології рослин та генетики НАН України). -Київ, 1996. -с. 47-48.

### АННОТАЦІЯ

Сех О.К. "Синтез белка в меристемах корней кукурузы под влиянием гипотермии и фитогормонов." Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.12 - физиология растений, Киевский университет имени Тараса Шевченка, Киев, 1997.

По материалам диссертации опубликовано 9 работ. Получены новые данные о реакции клеточной популяции меристемы корня проростков кукурузы на действие низкой температуры. Обнаружено, что снижение митотической активности в меристеме сопровождается повышением количества фитогормонов АБК, цитокининов и уменьшением количества ИУК. Баланс эндогенных фитогормонов изменялся в сторону возрастания количества ингибитора роста. На фоне снижения интенсивности синтеза белка изменялся его полипептидный состав. Выделено и охарактеризовано группу "стрессовых" белков, активация которых происходит сразу после действия гипотермии и группу белков "раннего периода адаптации" клеток меристемы к данному фактору. С использованием разных способов воздействия АБК ( $10^{-6}M$ ) и 6-БАП ( $10^{-11}M$ ) показано также, что повышение эндогенного уровня АБК и цитокининов способствует сохранению более высокого уровня синтеза белка, тогда как поддерживать митотическую активность меристемы на контрольном уровне способен только цитокинин.

Sekh O.K. "Protein synthesis in maize root meristems under the hypotherm conditions and phytohormone treatment." Thesis for Ph.D. degree in biological sciences by speciality: 03.00.12 - plant physiology. Taras Shevchenko University, Kyiv, 1997.

After thesis materials 9 scientific articles were published. Novel data about maize seedlings root meristematic cells reaction to the influence of low positive

temperature were obtained. It was shown that mitotic activity decrease is accompanied with ABA and cytokinins accumulation and IAA reduction. Endogenous phytohormonal balance decreased towards growth inhibitor accumulation. Reduction of protein synthesis intensity is accompanied with the changes in the polypeptide profiles. A group of "stress" proteins, activated after the short-term period under the hypotherm condition and the group of "early adaptation proteins" were separated and characterized. With the help of various ABA ( $10^{-6}$ M) and 6-BAP ( $10^{-11}$ M) treatment it was also shown that increased endogenous ABA and cytokinins levels have protective effect on protein synthesis. However to maintain the mitotic activity on the control level is 6-BAP characteristic feature.

**Ключові слова:** меристеми, гіпотермія, абсцизова кислота, цитокініни, ауксини, синтез білка, поліпептидний склад.

890.78.2A

Зам. N 135

Формат 60 x 84/16

Ум.друк. арх. 1.5

Підписано до друку 24.02.1997

Тираж 100

---

Ротапринт ЛНБ ім. В.Стефаніка НАН України  
290005 Львів-5, вул. Лермонтова, 15.

434943

