

В.А. ВАСЮК, В.М. ГЕНЕРАЛОВА,
Н.П. ВЕДЕНІЧЕВА, Г.І. МАРТИН,
Л.І. МУСАТЕНКО

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601, Україна
hormon@botany.kiev.ua

УЧАСТЬ АБСЦИЗОВОЇ КИСЛОТИ В РЕГУЛЯЦІЇ РОСТУ ПЕРВИННОГО ЛИСТКА *PHASEOLUS VULGARIS* L.

Ключові слова: фітогормони, абсцизова кислота, первинний листок, клітинний ріст

Абсцизова кислота (АБК) є одним з компонентів гормонального комплексу, який регулює процеси росту і розвитку рослинних організмів. АБК стимулює перехід насіння і бруньок до стану спокою, бере участь у стресових реакціях і формуванні стійкості клітин відносно несприятливих факторів [2, 21]. Вважають, що наявність значної кількості АБК у тканинах і органах у період інтенсивного росту може свідчити про її важливу роль у регуляції вказаних процесів [4]. Однак саме ця функція АБК найменш досліджена. Одним з можливих шляхів з'ясування регуляторної ролі окремих фітогормонів у процесах росту та метаболізму рослин є дослідження їхньої реакції на екзогенну обробку фітогормонами. Показано, що обробка проростків томатів розчином АБК активувала синтез стресових білків [12], контролювала синтез целюлози і геміцелюлоз при формуванні клітинної оболонки листків ячменю [3], збільшувала оводненість проростків пшениці, проте не впливала на схожість насіння, висоту рослин і площу їх першого листка [7]. АБК залежно від концентрації збільшувала деградацію хлорофілу або зупиняла його розпад у сегментах листків ячменю [18], впливала на накопичення біомаси та синтез етилену у мутантів арабідопсису [9], гальмувала транспірацію у проростках рису [19], а також фотосинтез і транспірацію в листках квасолі, цукрового буряка та кукурудзи і стимулювала закриття їхніх продихів [22]. На основі аналізу літературних повідомлень можна дійти висновку про різноманітний ефект впливу АБК. Без сумніву, будь-які структурні та функціональні зміни в органах рослин залежать від змін їх гормонального статусу.

Об'єкт та методика досліджень

Ми використали первинний листок *Phaseolus vulgaris* L. як модельну систему, на якій можна з'ясувати особливості росту та стан фітогормонального комплексу після інкубації насіння в розчині АБК. Насіння *Ph. vulgaris* сорту Білозерна замочували у воді (контроль) і розчині АБК 10^{-6} М (дослід) протягом 3 год., переносили у кювети і після кільчення висаджували у ґрунт для пророщування при 22 °С і 16-годинному фотоперіоді. Первинні листки для

© В.А. ВАСЮК, В.М. ГЕНЕРАЛОВА, Н.П. ВЕДЕНІЧЕВА, Г.І. МАРТИН, Л.І. МУСАТЕНКО, 2005

дослідження відбирали на початку стадій мітотичної активності, коли спостерігався пік інтенсивного поділу клітин та зрілості. В ці періоди визначали площу листків, масу їх сирої і сухої речовини та вміст вологи. Паралельно робили висічки з листків, фіксували їх і вміщували у парафін. Із такого матеріалу виготовляли анатомічні препарати, які аналізували за допомогою мікроскопа NU-2. Фітогормони (ІОК, АБК, зеатин, зеатинрибозид та зеатинглюкозид) виділяли, як описано раніше [6], та кількісно визначали на високоефективному рідинному хроматографі фірми «Pye Unicam»: гібереліноподібні речовини (ГПР) — методом біотестів, сумарну активність виражали в еквівалентах ГК₃. Етилацетатна фракція (ЕФ) містила переважно вільні, а бутанольна (БФ) — зв'язані форми ГПР типу глюкозидів. Кількісні дані обробляли статистично ($P = 2,3-3,7\%$).

Результати досліджень та їх обговорення

Ріст первинного листка квасолі відбувається як внаслідок поділу, так і розтягування клітин. Особливості росту детально розглянуто у попередній праці [11].

Обробка насіння квасолі розчином АБК впливала на ріст і зміну морфофізіологічних показників первинних листків (табл. 1). Використання розчину фітогормону призводило до незначного збільшення площі первинних листків та маси їх сирої речовини, однак вміст сухої речовини листків зменшувався. Аналіз морфо-анатомічних показників показав, що використання АБК протягом періоду росту спричинило збільшення товщини листків, діаметра клітин палисадної та кількості хлоропластів губчастої паренхіми, значного зростання кількості продихів, особливо на верхньому боці (табл. 2). Однак висота клітин палисадної паренхіми не змінювалася. Проаналізувавши морфо-анатомічні показники первинного листка квасолі, можна припустити, що збільшення товщини і площі листків дослідного варіанта відбувається внаслідок розвитку міжклітинників, від чого залежить інтенсивність метаболізму листків, бо вони відповідають за газообмін клітин. Можливо, з цими змінами пов'язано також збільшення кількості продихів, які регулюють водообмін і надходження CO₂ у клітини мезофілу.

Таблиця 1. Морфо-фізіологічні показники первинного листка *Ph. vulgaris* L. після інкубування насіння в розчині АБК

Стадія росту	Варіант	Площа листка, см ²	Маса листка, г	Маса сухої речовини, %	Вологість, %
Початок поділу клітин	контроль	10,1±1	0,104±0,02	15,1±1,0	84,9±7
	дослід	11,2±1	0,107±0,04	11,5±0,6	88,5±6
Максимум поділу клітин	контроль	27,5±1	0,419±0,05	10,8±0,8	89,2±5
	дослід	28,3±3	0,422±0,06	9,2±0,7	90,8±7
Завершення росту листків	контроль	58,3±2	1,072±0,10	9,3±0,2	90,7±4
	дослід	59,5±3	1,232±0,40	7,3±0,6	92,7±2

Таблиця 2. Морфо-анатомічні показники первинних листків *Rh. vulgaris* після інкубації насіння в розчині АБК

Стадія росту	Варіант	Товщина листка, мкм	Кількість прорихів на 1 мм ²		Палисадна паренхіма		Кількість хлоропластів на зрілі клітини		Кількість клітин палисади на 1 мм зрізу
			верхня епідерма	нижня епідерма	висота клітини, мкм	діаметр клітини, мкм	палисадна паренхіма	губчаста паренхіма	
Початок поділу клітин	контроль дослід	130±3	55±3	307±9	47,4±5	15,6±2	12±0,3	4±0,2	50±6
		132±1	108±3	385±4	47,0±3	16,3±2	10±0,1	5±0,3	51±6
Максимум поділу клітин	контроль дослід	140±3	33±2	244±10	50,3±6	19,2±2	12±0,3	5±0,1	40±5
		170±4	78±2	291±6	50,8±4	19,1±3	11±0,2	6±0,4	39±7
Завершення росту листків	контроль дослід	156±11	28±2	187±11	50,7±4	24,8±3	11±0,3	5±0,3	32±3
		171±4	46±4	259±7	48,1±4	25,2±1	11±0,4	6±0,4	32±4

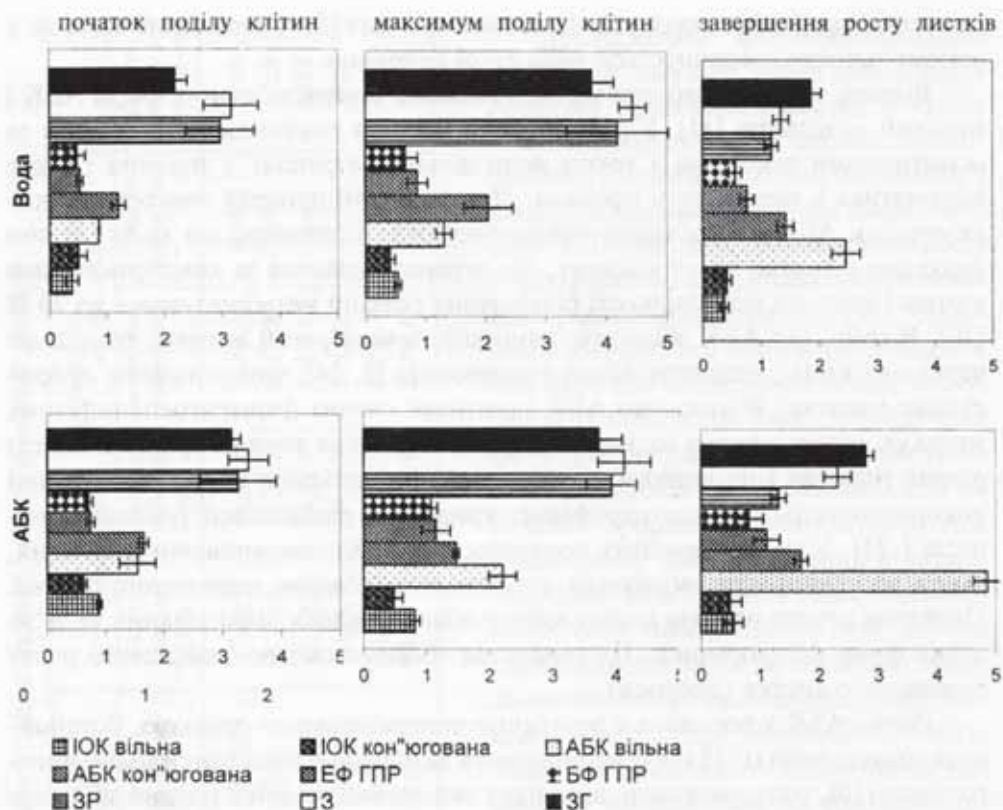
Дослідження фітогормонального комплексу показало, що на ранній стадії розвитку первинного листка в ньому кількісно переважають зеатин, зеатин-рибозид і зеатинглюкозид порівняно з кількістю вільних і зв'язаних форм АБК, ІОК і ГПР (рисунок). Коли процес росту листків досягає максимальної інтенсивності, співвідношення між фітогормонами зберігається близьким до такого, яке було на попередній стадії росту, однак їх кількісний вміст підвищується. У зрілому листку значно знижувався вміст цитокінінів, особливо їх кон'югованої форми — зеатинглюкозиду. Враховуючи факт взаємовпливу індивідуальних компонентів гормонального комплексу, можна припустити, що той самий фізіологічний ефект може стимулюватися змінами концентрації окремих складових рістрегулюючої системи. Саме високий вміст цитокінінів порівняно з ауксинами, як правило, пов'язують з індукцією морфогенетичних процесів [16]. На 8-добових проростках *Triticum durum* L. показано, що при збільшенні вмісту АБК водночас знижується рівень зеатину [15]. Встановлено, що рівень вільної АБК у первинних листках поступово підвищувався і за час росту досягав максимального значення, збільшуючись удвічі. Щоб пояснити це, слід згадати, що листок відіграє важливу роль у встановленні донорно-акцепторних взаємовідносин, які регулюються цим гормоном [2, 3]. Молодий листок акцептує поживні речовини, що надходять з інших частин рослини, і з розвитком асимілюючої і провідної систем він набуває донорських функцій. Тому на перших етапах розвитку проростка АБК стимулює вплив асимілятів із сім'ядолей у зародкову вісь, а коли розвиваються фотосинтезуючі листки —

стимулює транспорт продуктів фотосинтезу з них [5], у результаті чого, як у даному випадку, зменшується маса сухої речовини.

Відомо, що сухе насіння містить високий рівень зв'язаних форм АБК і низький — вільних [11]. У разі обробки насіння розчином АБК гормон за осмотичними законами з током води вільно потрапляє у насіння і може включатися у метаболічні процеси. При вивченні процесу «використання» екзогенної АБК на рослинах соняшнику було показано, що коли гормон надходив у листки через ксилему, він перерозподілявся за компартментами клітин і залежно від швидкості біохімічних реакцій метаболізувався до 70 % [20]. Відомо, що АБК збільшує проникність мембран й активує транспорт через них калію, підвищує водну проникність [2, 24], чим стимулює проростання насіння. Відомо, що АБК пригнічує синтез ферментоспецифічних молекул, однак у перші години інкубування насіння вона не зупиняє синтез різних гідролаз і не впливає на розщеплення запасних макромолекул, які використовуються при автотрофному живленні в разі ініціації ростових процесів [21]. У наших дослідках показано, що АБК, потрапляючи в насіння, також до певної міри змінювала гормональний баланс первинного листка. Протягом усього періоду поділу клітин збільшувалися рівні вільних та зв'язаних форм фітогормонів. Ця тенденція зберігалась і по завершенні росту первинного листка (рисунок).

Рівень АБК у рослинах є генетично детермінованою ознакою. Встановлені локуси генів (QTL), які відповідають за кількісні показники цього фітогормону [10], тому, можливо, внаслідок екзогенної обробки рослин збільшувалася кількість АБК шляхом зміни геному й активації локусу, що призводило до змін гормонального комплексу і клітинної структури. Відомо, що майже 90 % АБК локалізується у хлоропластах мезофіту. Обробка насіння АБК не спричинювала збільшення кількості хлоропластів у листку. Тому підвищення вмісту АБК у листках може відбуватися або за рахунок інтенсифікації її синтезу в хлоропластах, або надходження з коренів.

Є думка, що рослини, яким властивий більший вміст АБК, є стійкішими до різних типів зовнішніх впливів [6, 9]. Високим рівнем АБК характеризуються рослини C_3 -типу посухонестійких сортів, а рослини C_4 -типу — посухостійких [2]. Обробка огірків АБК підвищувала їхню стійкість до високих температур [13]. Показано, що за підвищеного вмісту ІОК, АБК і цитокінінів у трансгенних рослин із модифікованими генами синтезу цитокінінів (*ipt*-ген) та ауксинів (*iaaAu* і *iaaH*-гени) спостерігається посилення стійкості до нестачі води [8]. За несприятливих умов у рослинах посилюється синтез АБК, яка розподіляється в тканинах між різними компартментами [23]. За умов посухи та підвищеної температури АБК індукує закривання продохів, зменшує транспірацію шляхом регуляції їх іонних каналів [17, 24] і в такий спосіб впливає на ростові процеси. Під впливом екзогенної АБК змінюється морфогенез, потовщується листок, підвищується вміст АБК та цитокінінів, що характерно для стійких до посухи рослин. Разом з тим збільшення кількості продохів, маси листка й оводненості не можна вважати адаптаційними ознаками. Зростання



Фітогормони первинного листка *Phaseolus vulgaris* L. після обробки насіння розчином 10^{-6} М АБК. Умовні позначення: 1 – ІОК вільна; 2 – ІОК кон'югована; 3 – АБК вільна; 4 – АБК кон'югована; 5 – ЕФ ГПР; 6 – БФ ГПР; 7 – ЗР; 8 – З; 9 – ЗГ
 Phytohormones primary leaf *Phaseolus vulgaris* L. after seeds incubation in 10^{-6} M ABA. Symbols indicate: 1 – IAA free; 2 – IAA bound; 3 – ABA free; 4 – ABA bound; 5 – ethylacetate fraction GLS; 6 – butanol fraction GLS; 7 – ZR; 8 – Z; 9 – ZG

у листках кількості продохів і вмісту АБК може регулювати водоутримуючу властивість клітин. Хоча є думка, що чіткої кореляції між вмістом АБК і швидкістю продохів немає, оскільки інгибування біосинтезу АБК соняшнику тетрацикліном не призводило до їх закривання [20]. Стійкість рослин може посилюватися і шляхом активації антиоксидантних систем, індукції експресії різних груп генів, акумуляції низькомолекулярних сполук, стресових білків [1, 13] та лектинів [14], що створює гомеостатичний стан і дозволяє протидіяти різним умовам навколишнього середовища. Можна припустити, що внаслідок екзогенної обробки АБК рослини набувають толерантності і можуть швидше адаптуватися до стресових умов.

Зокрема, передпосівна обробка насіння *Ph. vulgaris* розчином АБК фізіологічної концентрації забезпечувала стабільне підвищення вмісту ендогенної АБК та інших фітогормонів як на початку, так і при завершенні росту та розвитку листка, сприяла утворенню більшої кількості продохів, що дає можливість регулювати водний режим первинного листка. Аналіз кількісних змін гормо-

нального комплексу первинного листка показав, що завершення його росту характеризується підвищенням вмістом вільної АБК, яка може використовуватися при подальшому формуванні як справжніх листків, так і інших органів.

1. Заякин В.В., Нам И.Я. Стимуляция абсцизовой кислотой поступления ассимилятов из оболочки семени к развивающемуся зародышу люпина // Физиол. растений. — 1998. — 45, № 1. — С. 100—107.
2. Кефели В.И., Коф Э.М., Власов П.В. и др. Природный ингибитор роста — абсцизовая кислота. — М.: Наука, 1989. — 182 с.
3. Киселева И.С., Каминская О.А. Гормональная регуляция утилизации ассимилятов в листьях ячменя в связи с формированием донорной функции // Физиол. растений. — 2002. — 49, № 4. — С. 596—602.
4. Курчій Б.О. Вміст абсцизової кислоти в рослинах озимого жита на різних стадіях онтогенезу // Физиол. и биохим. культ. растений. — 2000. — 32, № 6. — С. 444—448.
5. Мартын Г.И., Берестецкий В.А., Мусатенко Л.И. и др. Влияние абсцизовой кислоты на прорастание семян фасоли // Физиол. и биохим. культ. растений. — 1991. — 23, № 6. — С. 546—551.
6. Мусатенко Л.И., Веденичева Н.П., Васюк В.А. и др. Комплекс фитогормонов в проростках различных по устойчивости к повышенным температурам гибридов кукурузы // Физиол. растений. — 2003. — 50, № 4. — С. 499—504.
7. Пустовойтова Т.Н., Меликсетян Н.А. Торможение роста абсцизовой кислотой и засухоустойчивость проростков пшеницы // Физиол. растений. — 1985. — 32, № 1. — С. 169—175.
8. Пустовойтова Т.Н., Баврина Т.В., Миляева Э.Л. и др. Влияние трансформации растений табака *Nicotiana glauca* Spreng et Comes на строение листьев и засухоустойчивость // Тр. II Междунар. конф. по анатом. и морфол. раст. (Санкт-Петербург, 14—18 октября 2002 г.). — СПб: Изд-во БИН, РАН, 2002. — С. 377.
9. Ракитина Т.Я., Ракитин В.Ю., Власов П.В. и др. Влияние АБК на индуцированное ультрафиолетом выделение этилена у *etr* и *ctr* мутантов *Arabidopsis thaliana* // Физиол. растений. — 2004. — 51, № 5. — С. 737—741.
10. Сагуенети М., Тубероза Р., Стефанели С. и др. Использование рекомбинантной инбредной популяции для локализации генов, ответственных за содержание абсцизовой кислоты в листьях растений ячменя (*Hordeum vulgare* L.), подвергнутых обезвоживанию // Физиол. растений. — 1994. — 41, № 5. — С. 654—658.
11. Ситник К.М., Мусатенко Л.И., Мартин Г.И. та ін. Клітинний ріст і фітогормональний комплекс первинного листка *Phaseolus vulgaris* L. // Укр. ботан. журн. — 2002. — 59, № 3. — С. 239—246.
12. Таланова В.В., Титов А.Ф. Действие экзогенных гормонов и ингибиторов синтеза белка при повреждающих растения томатов низких и высоких температурах // Физиол. и биохим. культ. растений. — 1989. — 21, № 1. — С. 45—48.
13. Таланова В.В., Топчиева Л.В., Титов А.Ф. Влияние АБК на устойчивость проростков огурца к высокой температуре и хлоридному засолению // Физиол. и биохим. культ. растений. — 2003. — 35, № 2. — С. 124—131.
14. Тимофеева О.А., Хохлова Л.П., Трифонова Т.В. и др. Индуцированные модификаторами цитоскелета изменения активных лектинов при адаптации растений к низким температурам и обработке АБК // Физиол. растений. — 1999. — 46, № 2. — С. 181—186.
15. Фархутдинов Р.Г., Теплова И.Р., Митриченко А.Н. и др. Влияние высокой температуры воздуха на содержание абсцизовой кислоты и цитокининов и водный обмен проростков пшеницы // Изв. РАН. Сер. Биол. — 2003. — № 2. — С. 195—200.
16. Bangert F., Cruber Li C.-I. Auxin/Cytokinin interaction in the regulation of correlative events, in particular correlative dominance // Biol. Plantarum. — 1999. — 42, N 1. — P. 39—44.
17. Davies W.J., Metcalfe J., Lodge T.A. et al. Plant growth substances and the regulation of growth under drought // Aust. J. of Plant Physiol. — 1986. — 13. — P. 105—125.

18. *Frommhold I.* Chlorophyll degradation: effects of different concentration of abscisic acid in barley leaf segment // *Biochem. Physiol. Pflanzen.* — 1989. — **184**, N 3/4. — P. 329–331.
19. *Hsy Y.T., Kao C.H.* Role of abscisic acid in cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings // *Plant, Cell and Environment.* — 2003. — **26**, N 6. — P. 867–874.
20. *Jia W., Zhang J.* Stomatal closure is induced rather by prevailing xylem abscisic acid than by accumulated amount of xylem-derived abscisic acid // *Physiol. Plant.* — 1999. — **106**, N 2. — P. 268–275.
21. *Leung J., Girandot J.* Abscisic acid and signal transduction // *An. Rev. Plant Physiol., Plant Mol. Biol.* — 1998. — **49**. — P. 199–222.
22. *Pospisilova J., Batkova P.* Effects of pre-treatments with abscisic acid and/or benzyladenine on gas exchange of French bean, sugar beet, and maize leaves during water stress and after rehydration // *Biol. Plantarum.* — 2004. — **48**, N 3. — P. 395–399.
23. *Sauter A., Davies W.J., Hartung W.* The long distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot // *J. of Exper. Botany.* — 2001. — **52**, № N 363. — P. 1991–1997.
24. *Schroeder Y.I., Kwar Y.M., Allen G.Y.* Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants // *Nature.* — 2001. — **410**, N 3. — P. 327–330.

Рекомендує до друку
К.М. Ситник

Надійшла 21.03.2005

V.A. Vasjuk, V.N. Generalova, N.P. Vedenicheva, G.I. Martyn, L.I. Musatenko

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

УЧАСТИЕ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА ПЕРВИЧНОГО ЛИСТА *PHASEOLUS VULGARIS* L.

Изучали особенности роста и состояние фитогормонального комплекса (методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и биотестовым) первичного листа *Phaseolus vulgaris* L. после инкубации семян в растворе 10^{-6} М АБК. Предпосевная обработка семян приводила к изменению синтеза эндогенных фитогормонов (ИУК, АБК, цитокининов и гиббереллиноподобных веществ), вызывала стабильное увеличение их количества как в начале, так и при завершении роста и развития листа, способствовала увеличению количества устьиц, толщины и площади листа. Обсуждается роль АБК в наблюдаемых изменениях анатомии листа и фитогормонального комплекса. Предполагается, что экзогенная АБК способствует формированию толерантности растений и ускоряет процессы адаптации к стрессовым условиям.

V.A. Vasjuk, V.N. Generalova, N.P. Vedenicheva, G.I. Martyn, L.I. Musatenko

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

ABA PARTICIPATION IN REGULATION OF *PHASEOLUS VULGARIS* L. PRIMARY LEAF GROWTH

Phaseolus vulgaris L. primary leaf growth and phytohormonal complex were studied after seeds incubation in 10^{-6} M ABA by HPLC and bioassays. As a result of seeds imbibition in ABA solution changes in endogenous phytohormones (IAA, ABA, cytokinins and gibberellin-like substances) synthesis, stable increase in phytohormones quantity during leaf growth and development, formation of the greater stomata amount, increase in leaf thickness and area were observed. The role of ABA in leaf anatomy and phytohormonal complex changes is discussed. Exogenous ABA is supposed to be a promoter of plant tolerance and adaptation to stress conditions.