

пункте испытания способствуют формированию узкой хвои с большим числом устьиц. Большой объем ассимилятов активно используется и для построения большой толщины клеточной стенки ранней древесины у южных климатипов [6].

Литература

1. *Apple M.E., Olszyk D.M., Ormond D.P., Lewis J., Southworth D., Tingey D.T.* Morphology and stomatal function of Douglas fir needles exposed to climate change, elevated CO₂ and temperature // *International Journal of Plant Science*. 2000. V. 161. № 1. P. 127-132.
2. *Beerling D.J.* Carbon isotope discrimination and stomatal responses of mature *Pinus sylvestris* L. trees exposed in situ for three years to elevated CO₂ and temperature // *Acta Oecologica*. 1997. V. 18. P. 697-712.
3. *Luomala E.-M., Laitinen K., Sutinen S., Kellomaki S., Vapaavuori E.* Stomatal density, anatomy and nutrient concentrations of Scots pine needles are affected by elevated CO₂ and temperature // *Plant, Cell and Environment*. 2005. V. 28. P. 733-749.
4. *Shavnin S.A., Marina N.V., Novoselova G.N., Usupov I.A., Ivanova L.A., Ronzhina D.A.* Impact of local warming on the physiological state of Scots pine needles // *Abstracts of International conference*. Ekaterinburg. Ural State Forest Engineering University. 2006. P. 85.
5. *Croxdale J.L.* Stomatal patterning in angiosperms // *American Journal of Botany*. 2000. V. 87. P. 1069-1080.
6. *Кузьмин С.Р., Ваганов Е.А., Кузьмина Н.А., Милютин Л.И.* Особенности трахеид древесины у климатипов *Pinus sylvestris* (*Pinaceae*) в географических культурах // *Ботанический журнал*, 2008, т.93, №1. С. 10-21.
7. *Правдин Л.Ф.* Сосна обыкновенная. Изменчивость, внутривидовая систематика и селекция. М.: Наука, 1964. 190 с.
8. *Мамаев С.А.* Формы внутривидовой изменчивости древесных растений. М.: Наука, 1973. 282 с.
9. *Kouwenberg L.L.R, Kürschner W.M., Visscher H.* Changes in stomatal frequency and size during elongation of *Tsuga heterophylla* needles // *Annals of Botany*. 2004. V. 94. № 4. P. 561-569.
10. *Bohlenius H., Huang T., Charbonnel-Campaa L., Brunner A.M., Jansson S., Strauss S.H., Nilsson O.* CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees // *Science*. 2006. V. 312. P. 1040-1043.

Резюме

Stomatal density, needle length and width of different Scots pine provenances were studied in the provenance trial. It was determined that the closest relation is between stomatal density and needle length. Stomatal density and needle length are under great genetic control and closely related by positive correlation. Needle width is to a greater extent under control of temperature factor in the place of trial.

КУРЧИЙ В.М., САКАЛО В.Д., ТОПЧИЙ Н.Н., ТИЩЕНКО Е.Н.

Институт физиологии растений и генетики Национальной Академии наук Украины, Украина 03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17

ВЛИЯНИЕ 6-БЕНЗИЛАМИНОПУРИНА И ЗЕАТИНА НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В СТАРЕЮЩИХ ЛИСТЯХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Процесс старения листьев рассматривается как форма программированной клеточной гибели и сопровождается генетическими, биохимическими и структурными изменениями [8]. На клеточном уровне программа старения развёртывается упорядоченным образом, где одними из первых постепенно начинают разрушаться хлоропласты. Вместе с тем нами показано, что в стареющих листьях сахарной свеклы

нарушению структуры хлоропластов предшествует изменение в реализации генетических программ развития. В связи с этим было предположено участие метилирования ДНК в дифференциальной экспрессии генов.

Ядерно-цитоплазматическая система взаимосвязей сигналов и метаболитов, участвующих в процессе старения, ещё далека от полного понимания. Представляет интерес сахароза как сигнальная молекула, синтез которой ферментом сахарозофосфатсинтазой (СФС, К.Ф. 2.4.1.14) тесно связан с функционированием фотосинтетического аппарата. [7]. Продукты ее гидролиза – гексозы участвуют в регуляции метаболизма стареющих органов и тканей. С процессом старения связывают активацию фермента гексокиназы (К.Ф. 2.7.1.1), так как образуемые им фосфорилированные сахара негативно влияют на экспрессию генов, ответственных за синтез хлорофиллсвязывающих белков [5]. Снижение экспрессии гена гексокиназы, наоборот, тормозит процессы старения [11].

Несмотря на то, что старение является генетически запрограммированным процессом, оно может индуцироваться/модулироваться разными факторами и подвергаться гормональному контролю [1, 8]. Хотя известно, что фитогормоны регулируют транспорт ассимилятов из листьев, принимают участие в регуляции метаболизма, направленного на образование их транспортных форм, взаимодействуют с сахарами в процессе старения [10], сведения об изменениях углеводного метаболизма немногочисленны. Кроме того, в обсуждаемом аспекте слабо изученными являются изменения в уровне метилирования ДНК.

Целью данной работы было изучение влияния гормонов цитокининовой природы (БАП, зеатин) на биохимические процессы, связанные с синтезом сахарозы, ее метаболизмом, а также с метилированием ДНК при старения листьев сахарной свеклы.

Материалы и методы

Сахарную свеклу (*Beta vulgaris* L.) сорта Уладовская односемянная 35 (УО-35) выращивали в вегетационных сосудах (15 кг). Растения дважды в течение вегетации обрабатывали растворами цитокининов (БАП – $4 \cdot 10^{-5}$ М, зеатина $1 \cdot 10^{-6}$ М): в период образования 6-8 листа и в начале периода интенсивного сахаронакопления. В качестве контроля использовали растения, обработанные водой. Для исследования брали 13-14 листья разного возраста – ювенильные (5-дневные), растущие и закончившие рост (25-, 45-дневные) и стареющие (60-дневные). Выделение СФС и определение ее активности проводили по методу Губера с соавт. [6], гексокиназы по [3].

Ядра и яДНК из листьев сахарной свеклы выделяли частично модифицированным нами методом [2, 4]. Используемый метод позволяет получать неповрежденные ядра, в которых отсутствуют цитоплазматические примеси. Рестрикцию ДНК проводили рестриктазами *MspI*, *HpaII*, *XhoI*, *PvuII*, *SalI*, *Sau3A I*, *MboI*, *PstI* (“Fermentas”, Литва). На 1 мкг ДНК брали 4-10 единиц активности рестриктаз и инкубировали в течение 8-12 часов при 37 °С. Электрофорез ДНК проводили в 0,8 %-ном агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия в 1хТВЕ при 3-4 В/см в течение 3-4 часов.

Результаты и обсуждение

В процессе старения листа происходит частичное разрушение ядер. Так, в старом, (60-ти дневном) листе их содержание составляет 65 % от максимального, отмеченного в молодом развивающемся (5-ти дневном) листе (табл. 1).

Таблица 1

Влияние экзогенных фитогормонов на содержание ядер ($\times 10^{-7}$ на 1 г ткани) в онтогенезе листьев сахарной свеклы

Варианты	Возраст листа, дни				
	5	25	45	60	%
контроль	9,10 ± 0,02	7,90 ± 0,02	6,70 ± 0,01	5,90 ± 0,01	65,0
БАП	8,80 ± 0,02	8,00 ± 0,03	7,50 ± 0,02	6,80 ± 0,02	77,3

зеатин	8,70 ± 0,01	8,10 ± 0,03	7,70 ± 0,02	6,30 ± 0,01	72,4
--------	-------------	-------------	-------------	-------------	------

Под влиянием фитогормонов цитокининовой природы процессы разрушения ядер в стареющих листьях сахарной свеклы замедляются: БАП сдерживает разрушение ядер на 12,3 %, зеатин – на 7,4 %. При этом фрагментации яДНК – одного из основных критериев перехода клеток на путь запрограммированной клеточной гибели, не наблюдается. Это свидетельствует о замедлении процессов старения листьев под влиянием фитогормонов (БАП и зеатин).

Метилирование ДНК рассматривается в качестве одного из таких факторов, которые берут участие в процессах генетической регуляции старения эукариот [1]. Для растений роль ферментативно модифицированных остатков цитозина остаётся недостаточно изученной. Мы изучали природу последовательностей ДНК в процессе старения листьев сахарной свёклы на этапе, когда происходят изменения в реализации генетических программ старения и поддерживается целостность молекул ДНК. Среди проанализированных последовательностей, являющихся сайтами узнавания рестриктаз *MspI/HpaII*, *XhoI*, *SalI*, *PstI*, *PvuII*, *HhaI*, *Sau3AI/MboI*, наблюдается как повышение, так и снижение уровня метилирования ДНК. Последнее характерно для пары изошизомеров *Sau3AI/MboI*. БАП и зеатин не влияли на характер паттернов гидролизированных фрагментов ДНК, что указывает на отсутствие взаимосвязи этих фитогормонов и ферментативной модификации цитозина. Совпадение таких событий, как избирательное метилирование/ деметилирование сайт-специфичных последовательностей ДНК и дифференциальная инактивация/активация транскрипции генов не исключает участия 5мС в эпигенетических аспектах регуляции, связанных с образованием гетерохроматина.

В стареющих листьях происходит снижение уровня хлорофилла, который в 60-ти дневном листе составляет 27 % от максимального, отмеченного в 25-ти дневном. Цитокинины сдерживали разрушение хлорофилла: в старом листе под влиянием БАП содержание хлорофилла составляло 39 % от максимального, зеатина – 42 % (табл. 2).

С состоянием фотосинтетического аппарата тесно связана функциональная активность фермента синтеза сахарозы – СФС. Активность СФС не постоянна. Максимальная удельная активность обнаружена в 25-ти дневном листе, когда он уже выполняет донорную функцию. В старом листе (60 дней) удельная активность СФС составляла 26 % от максимальной. Обработка БАП стимулировала СФС в зрелых (45-ти дневных) и стареющих (60-ти дневных) листьях в 2-3 раза. Под влиянием зеатина в молодых листьях (5-25-ти дневных) изменений активности СФС практически не наблюдалось. В молодых листьях незначительную активацию ферментов БАП-ом и ее полное отсутствие при обработке зеатином, можно объяснить тем, что СФС подвержена сложной системе эндогенной регуляции и тесно связана с фотосинтезом, уровень хлорофилла в этих листьях также практически не изменялся под влиянием цитокининов (см. табл. 2). Таким образом, экзогенные цитокинины (БАП, зеатин) оказывали существенное влияние на СФС, поддерживая на более высоком уровне удельную активность фермента в зрелых и стареющих листьях.

Таблица 2

Удельная активность сахарозофосфатсинтазы и содержание хлорофилла в онтогенезе листьев сахарной свеклы

Варианты	Возраст листа, дни			
	5	25	45	60
Хлорофилл (a+v), мг/дм ²				
Контроль	3,87 ± 0,1	5,65 ± 0,05	1,9 ± 0,03	1,54 ± 0,02
БАП	3,91 ± 0,3	5,40 ± 0,1	2,5 ± 0,05	2,1 ± 0,07
Зеатин	3,80 ± 0,4	5,46 ± 0,06	2,64 ± 0,04	2,3 ± 0,03
СФС(мкмоль сахарозы /мг белка · час)*				
Контроль	0,77 ± 0,02/ 100	2,2 ± 0,06/ 100	1,1 ± 0,02/ 100	0,58 ± 0,01/ 100

БАП	0,9 ± 0,05/ 117	2,85 ± 0,05/ 130	3,3 ± 0,1/ 300	1,8 ± 0,02/ 310
Зеатин	0,68 ± 0,01/ 88	1,8 ± 0,04/ 82	3,2 ± 0,01/ 291	1,3 ± 0,01/ 224

*Примечание: за чертой в этой и в табл.3 - % от контроля

Важная роль в регуляции эндогенного уровня сахаров в фотосинтетических тканях и связанного с этим старением принадлежит гексокиназе, которая фосфорилируя глюкозу не только образует субстраты для гликолиза, но и участвует в регуляции старения [9].

В молодых (5-ти дневных) листьях экзогенные БАП и зеатин значительно активировали фермент (на 288 и 176 %), но общий уровень активности был не высоким (табл. 3). Активация БАП-ом гексокиназы в молодых листьях сопровождалась и повышением активности СФС, чего нельзя сказать про зеатин. По мере созревания и старения листьев активность гексокиназы стремительно повышалась и в 60-ти дневном листе ее уровень в 15,7 раза превышал активность 5-ти дневного. БАП и зеатин в старых листьях ингибировали гексокиназу на 40 %. То есть гормоны цитокининовой природы снижают степень активации гексокиназы в стареющих листьях.

Таблица 3

Удельная активность гексокиназы в онтогенезе листа сахарной свеклы (мкм продукта на 1 мг белка · мин)

Варианты	Возраст листа, дни			
	5	25	45	60
Контроль	0,67 ± 0,01/ 100	3,4 ± 0,05/ 100	7,3 ± 0,1/ 100	10,5 ± 0,5/ 100
БАП	2,6 ± 0,04*/ 388	2,8 ± 0,03/ 83	6,2 ± 0,1/ 85	6,4 ± 0,2/ 61
Зеатин	1,85 ± 0,05 /276	4,0 ± 0,02/ 119	6,4 ± 0,02/ 87	6,0 ± 0,2/ 57

Таким образом, экзогенные фитогормоны цитокининовой природы (БАП и зеатин) принимают участие в процессах поддержания целостности и стабильности молекул ДНК, оказывают существенное влияние на продление функциональной активности листьев сахарной свеклы путем активации синтеза сахарозы СФС-зой, снижают разрушение хлорофилла и ингибируют фермент гексокиназу, однако не оказывают влияние на избирательное метилирование сайт-специфичных последовательностей ДНК при старении листьев сахарной свёклы.

Литература

1. Ванюшин Б.Ф., Шортинг Б.Ю., Середина А.В., Александрушкина Н.И. Влияние фитогормонов и 5-ацитазина на апоптоз у этиолированных проростков пшеницы // Физиология растений. – 2002. – 46, № 4. – С. 558-564.
2. Искаков Б.К., Айтхожин М.А. Выделение белков информсом и анализ их с помощью двумерного электрофореза // Методы молекулярной биологии, биохимии и биотехнологии растений. Алма-Ата: Наука, 1988. – с.5.
3. Курсанов А.Л., Прасолова М.Ф., Павлинова О.А. Пути ферментативного превращения сахарозы в корне сахарной свеклы в связи с его аттрагирующей функцией // Физиология растений. – 1989. – 36, № 4. – С. 629-641.
4. Тищенко Е.Н., Топчий Н.Н. Старение листа сахарной свеклы: сайт-специфичность метилирования ДНК// Физиология и биохимия культ. растений. – 2001. – 33, №2. – С.170-175.
5. Daia N., Schaffer A., Petreicov M., Shahak L., et al. Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibit growth, reduces photosynthesis and induces rapid senescence // Plant Cell. – 1998. – 11, N 7. – P. 1253-1266.
6. Huber S.C., Nielsen T.H., Huber J.L.A. et al. Variation among species in light activation of sucrose phosphate synthase // Plant Cell Physiol. – 1989. – 30, N 2. – P. 277-285.
7. Paul M.J., Foyer C.H. Sink regulation of photosynthesis // J. Exp. Bot. – 2001. – 52, N 360. – P. 1383-1400.

8. *Quirino B.F., Noh G.S., Himelblau E., Amasino R.M.* Molecular aspects of leaves senescence // Elsevier Science. – 2000. – 5, N 7. – P. 278-282.
9. *Simeonova E., Mostowska A.* Biochemiczne i molekularne aspekty starzenia sie lisci // Post Biol. Komorki. – 2001. – 25, N 1. – P. 17-32.
10. *Wingler A., von Schaewen A., Leegood R.C., Lea P.J. and Quick P.* Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugar and light // Plant Physiol. – 1998. – 116. – P. 329-335.
11. *Xiao W., Sheen J., Jang J.C.* The role hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development // Plant Mol. Biol. – 2000. – 44, N 4. – P. 451-461.

Резюме

Изучено влияние БАП и зеатина на метаболические процессы стареющих листьев сахарной свеклы. Установлено, что к концу онтогенеза листьев происходит разрушение ядер и яДНК, снижение содержания хлорофилла, инактивация сахарозофосфатсинтазы, активация гексокиназы. БАП и зеатин регулируют эти процессы, повышая функциональную активность стареющих листьев. Однако, эти регуляторы роста не влияют на метилирование цитозина в сайт-специфичных последовательностях ДНК

Вивчено вплив БАП і зеатина на метаболічні процеси старіючих листків цукрових буряків. Установлено, що в кінці онтогенезу листків відбувається руйнування ядер і яДНК, зниження вмісту хлорофілу, інактивція сахарозофосфатсинтази, активація гексокінази. БАП і зеатин регулюють ці процеси, підвищуючи функціональну активність старіючих листків цукрових буряків. Проте ці регулятори росту не впливають на метилування цитозину в сайт-специфічних послідовностях ДНК.

The effect of both benzyladenine (BA) and zeatin on the metabolic processes in the senescencing leaves of sugar beet has been studied. In the end of leave ontogeny the degradation of nucleuses and nDNA, chlorophyll decreasing, sucrose phosphate synthase inactivation, and hexokinase activation are found. BA and zeatin regulate these processes by increasing functional activity of senescence leaves of the sugar beet. However, these plant regulators don't have affect on cytosine methylation of site-specific sequences.

ЛАВРИНЕНКО Ю.О.

*Институт землеробства південного регіону УААН,
Україна, 73483, Херсон, Наддніпрянське, ІЗПР*

ОЦІНКА СЕРЕДОВИЩА, ЯК ФОНУ ДЛЯ ДОБОРУ ГІБРИДІВ КУКУРУДЗИ

Ідентифікацію параметрів адаптивності генотипів кукурудзи необхідно проводити за результатами випробувань в екологічному градієнті, який формується за допомогою агротехнічних заходів і найбільш повно відображає спектр агрокліматичних умов можливого розповсюдження генотипу. Сучасні агроекономічні умови вимагають широкого набору генотипів кукурудзи, що мають специфічну адаптованість до ґрунтово-кліматичних та технологічних чинників. В умовах південного регіону України головним фактором ліміту врожайності є волога [1, 2].

Метою досліджень було визначення параметрів мінливості та адаптивності нових гібридів кукурудзи за врожайністю зерна залежно від вологозабезпеченості та погодних умов року в південному Степу України.

Матеріали та методи