



УДК 581.1

© 2010

О. В. Кириченко, М. В. Волкогон

Вплив аглютиніну зародків пшениці при передпосівній обробці насіння на рівень цитокінінів і ауксинів у листі рослин

(Представлено академіком НАН України В. В. Моргуном)

Досліджено вплив аглютиніну зародків пшениці при передпосівній обробці насіння на вміст фітогормонів-активаторів (цитокінінів та ІОК), флавоноїдів і хлорофілу в листі рослин пшениці, а також азотфіксувальну активність ризосферних мікроорганізмів. Встановлено зрушення ендogenous фітогормонального балансу листя рослин у фазу трубкування в напрямі істотного зростання рівня цитокінінів (утричі) та ІОК (удвічі), наслідком чого є зміна морфофізіологічних показників розвитку рослин, зокрема: збільшення вмісту хлорофілу і флавоноїдів у листі, активне формування рослинами вегетативної маси і зерна та підвищення азотфіксувальної здатності ризосферних мікроорганізмів.

Рослинні лектини є біологічно активними речовинами [1], які здатні прямо або опосередковано впливати на ростові процеси рослин і їхню продуктивність [2]. Позитивний ефект специфічного лектину на рослину може бути пов'язаний як з активацією розвитку та функціональної активності агрономічно корисних ризосферних мікроорганізмів в умовах *in vitro* та *in situ* [3], так і з прямим впливом аглютиніну на ростові процеси рослин, а саме на поділ і розтяг клітин, подібним до дії фітогормонів [1, 2, 4, 5]. Роботи останніх років свідчать про залучення рослинних лектинів і фітогормонів у регуляцію процесів росту і розвитку рослин [1, 4–6]. Так, обробка проростків пшениці аглютиніном, виділеним з її зародків, стимулювала мітотичну активність меристематичних клітин коренів рослин [4, 5]. У попередніх наших роботах показано, що результатом впливу аглютиніну при передпосівній обробці насіння були зміни основних фізіолого-біохімічних процесів і підвищення продуктивності рослин пшениці [2, 3, 7]. Оскільки в реалізації генетичної програми розвитку рослин визначальну роль відіграють фітогормони [6], ми припустили можливість зміни ендogenous балансу гормонів у вегетуючих рослинах за дії лектину пшениці на насіння.

У даному повідомленні наведено результати дослідження впливу аглютиніну зародків пшениці (АЗП) при передпосівній обробці насіння на вміст фітогормонів, флавоноїдів і хло-

рофілу в листі, формування рослинами вегетативної маси, а також азотфіксувальну активність ризосферних мікроорганізмів пшениці у фазу трубкування.

Рослини пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Рання 93 вирощували в умовах вегетаційного дослідження на ґрунтовому субстраті. Обробку насіння дослідного варіанту проводили розчином (10 мкг/мл) лектину пшениці (АЗП, “Лектинотест”, Львів, Україна), контрольного варіанту — водою. Для аналізу відбирали рослини і ризосферний ґрунт у фазу трубкування пшениці — одну з визначальних фаз розвитку рослин. Урожай оцінювали у фазу повної стиглості зерна пшениці.

Аналіз рослин на вміст фітогормонів проводили методом кількісної спектроденситометричної тонкошарової хроматографії [8]. Для цього фітогормони з рослинної наважки екстрагували 96% спиртом; етанольний екстракт випарювали на ротаційному випарювачі (HEIDOLPH Laborporta 4000 efficient, Німеччина) і повторно розчиняли в 1,5 мл спирту. Етанольний екстракт очищували шляхом хроматографування на пластинках “Сорфбіл ПТСХ-АФ-А-УФ” (Росія) у різних системах розчинників (хлороформ ($R_f = 0$), аміак 12,5% ($R_f = 1$) та етилацетат:оцтова кислота (19 : 1). Після очищення зони, значення R_f яких збігаються з нанесеними раніше стандартами фітогормонів, знімали і елюювали, причому зеатин елюювали спиртом, а ІОК і АБК — етилацетатом. Елюат ІОК і АБК рехроматографували на пластинках з оксидом кремнію (Merck № 105 554, Німеччина) у системі розчинників хлороформ:етилацетат:оцтова кислота (100 : 100 : 1), а елюат зеатину — на пластинках з оксидом алюмінію (Merck № 105 550, Німеччина) у системі розчинників хлороформ:оцтова кислота (19 : 1). Кількісне детектування фітогормонів здійснювали за допомогою сканувального спектроденситометра “Camag TLC Scanner” (Швейцарія).

Флавоноїди виділяли з листя пшениці за методикою [9]. Вимірювання сумарної кількості флавоноїдів проводили спектрофотометрично в УФ-області спектра при довжині хвиль 225–410 нм. При цьому було враховано, що різні класи фенольних сполук відрізняються один від одного за спектром поглинання і дають максимуми поглинання, які належать до I і II смуг [9]. Вміст суми флавоноїдів (%) розраховували в перерахунку на рутин (стандарт) і абсолютно суху рослинну речовину.

Вміст хлорофілу визначали за Арноном після екстракції рослинного матеріалу в диметилсульфоксиді [10] і виражали в міліграмах на грам сирової рослинної сировини (листя).

Азотфіксувальну активність ризосферного комплексу мікроорганізмів (корені рослин з ґрунтом) тестували ацетиленовим методом [11] і оцінювали за кількістю етилену (наномоль), який утворювався з ацетилену за участю нітрогенази на одну рослину.

Статистичне оброблення результатів здійснювали з використанням програми *Statgraphyc Plus*. У таблицях і на рисунку наведені середні арифметичні значення та стандартна похибка середнього ($M \pm m$).

У листі пшениці ярої у фазу трубкування виявлено наявність цитокінінів, зокрема зеатину і зеатинрибозиду, ауксинів, зокрема ІОК (табл. 1), а також слідові кількості АБК. У листі рослин контрольного варіанта кількість зеатину та зеатинрибозиду становила відповідно 0,695 і 1,392 мкг/г сирової маси листків, вміст ІОК — 4,484 мкг. За дії лектину пшениці відмічено істотне (в 2,5 раза) підвищення рівня фітогормонів-активаторів (див. табл. 1). Листя рослин містило зеатину та зеатинрибозиду відповідно в 2,4 та 3,4 раза більше, ніж у контрольному варіанті. Рівень ІОК зростає удвічі. У рослинах цитокініни можуть знаходитись як у вільній формі, зокрема зеатин, так і у вигляді рибозидів (зеатинрибозид) або глюкозидів. За рахунок приєднання вуглеводів до молекули фітогормону в клітинах регулюється рівень активних цитокінінів [6]. У рослин контрольного варіанта співвідношення

Таблиця 1. Вміст фітогормонів у листі пшениці ярої сорту Рання 93 у фазу трубкування рослин при екзогенному впливі аглютиніну зародків пшениці (АЗП) на насіння

Обробка насіння	Зеатин		Зеатинрибозид		Зеатин + + зеатинрибозид		ІОК		Зеатин + + зеатинрибозид + ІОК	
	мкг/г	%	мкг/г	%	мкг/г	%	мкг/г	%	мкг/г	%
Вода (контроль)	0,70 ± 0,04	100	1,39 ± 0,07	100	2,09 ± 0,05	100	4,48 ± 0,22	100	6,57 ± 0,33	100
АЗП	1,70 ± 0,09*	243	4,70 ± 0,24*	338	6,40 ± 0,16*	306	9,47 ± 0,49*	211	16,26 ± 0,81*	248

* Тут і в табл. 2 різниця порівняно з контролем вірогідна ($P < 0,05$).

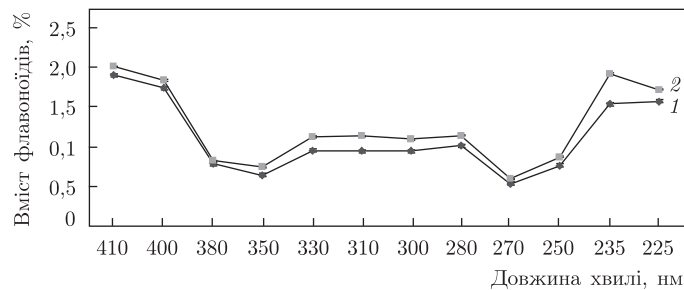


Рис. 1. Вміст суми флавоноїдів (%) у перерахунку на рутин і абсолютно суху рослинну речовину в листі пшениці сорту Рання 93 у фазу трубкування.

Варіант: 1 — обробка насіння водою, 2 — лектином пшениці. Абсолютні значення вмісту флавоноїдів менші за наведені в 100 разів. Різниця порівняно з контролем (обробка насіння водою) вірогідна ($P < 0,05$)

активної (зеатин) і рибозидної (зеатинрибозид) форми цитокінінів становило 1 : 2. Обробка насіння лектином призвела до істотного підвищення вмісту зв'язаної форми цитокінінів (у 3,4 раза більше контролю), тоді як кількість зеатину збільшилась удвічі. Рослини містили зеатину в 2,8 раза менше, ніж зеатинрибозиду. Вміст ІОК був в 1,5 раза більшим за сумарну кількість зеатину й зеатинрибозиду, тоді як у контролі кількість ауксинів перевищувала вміст цитокінінів у 2,2 раза, що вказує на зрушення балансу гормонів у бік зростання пулу цитокінінів.

Захист активної форми ІОК у рослинах від інактивації пероксидазами здійснюють фенольні сполуки, зокрема флавоноїди, які пригнічують перетворення ауксинів в інертні метаболіти [6]. Нами показано, що поряд з підвищенням вдвічі рівня ІОК (див. табл. 1) у листі пшениці під впливом лектину збільшується вміст флавоноїдів (рис. 1), які захищають ІОК від швидкого розпаду.

Отже, за дії лектину пшениці на насіння відбувається зміна балансу фітогормонів у напрямі максимального накопичення цитокінінів (при перевазі запасної форми зеатинрибозиду) на тлі майже однакового підвищення вмісту активної форми зеатину й ІОК (в 2,8 і 2,2 раза відповідно). При цьому в загальному пулі гормонів-активаторів зростає частка цитокінінів порівняно з ІОК. Саме високий рівень цитокінінів у рослині пов'язують з індукцією морфогенетичних процесів. Так, встановлено [12], що збільшення вмісту гормонів даного класу сприяло формуванню генеративних органів та урожаю пшениці, зокрема за рахунок підвищення кількості зерен у колосі. Можливо, що екзогенний лектин за рахунок впливу на фітогормональний баланс у рослинах залучається до регуляції (координації) різноманітних фізіологічних програм, що контролюються фітогормонами. Доказом даного припущення є результати дослідження фізіолого-біохімічних показників розвитку рослин й азотфіксувальної здатності ризосферних мікроорганізмів (табл. 2).

У листі рослин цитокініни беруть участь у хлоропластогенезі, стимулюють синтез хлорофілу та фотосинтетичну активність рослин [13], активність РНК-полімерази, результатом чого є активація синтезу РНК і білка [6]. У наших попередніх роботах показано [3, 7], що за дії екзогенного лектину на насіння пшениці ярої мало місце істотне зростання порівняно з контролем рівня сумарної РНК (в 2,4 раза) та ендогенної лектинової активності (в 1,5–3,5 раза) у листі рослин у фазу трубкування, що може бути наслідком значного підвищення кількості цитокінінів (у 3,1 раза, див. табл. 1). Рівень ІОК при цьому збільшувався лише вдвічі, але абсолютне значення вмісту ІОК було більшим за показник сумарної кількості зеатину та зеатинрибозиду на 54%. Результатом істотного підвищення рівня ци-

Таблиця 2. Фізіологічні показники розвитку рослин пшениці ярої сорту Рання 93 і азотфіксувальна активність ризосферних мікроорганізмів за екзогенної дії лектину пшениці

Обробка насіння	Фаза трубкування рослин							
	Вміст хлорофілу		Маса рослини				Нітрогеназна активність мікроорганізмів	
	мг/г листя	%	надземна частина		корінь		нмоль C ₂ H ₄ /(рослину · год)	%
			г	%	г	%		
Вода (контроль)	1,73 ± 0,01	100	4,06 ± 0,26	100	1,60 ± 0,12	100	1,42 ± 0,25	100
АЗП	2,21 ± 0,04*	128	4,93 ± 0,26*	121	1,93 ± 0,25	121	2,33 ± 0,13*	164
Обробка насіння	Фаза повної стиглості зерна (середнє за 4 роки)							
	Кількість зерен у колосі				Маса зерен колоса			
	штук		%		г		%	
Вода (контроль)	22,5 ± 1,6		100		0,88 ± 0,05		100	
АЗП	28,1 ± 2,5*		125		1,08 ± 0,05*		123	

токінінів у листі пшениці за дії АЗП (див. табл. 1), може бути також і збільшення (на 28% порівняно з контролем) вмісту зелених фотосинтетичних пігментів хлорофілів у листках пшениці у фазу трубкування (див. табл. 2). Рослини дослідного варіанта активно формували вегетативну масу (див. табл. 2), що може бути наслідком підвищеного в 2,5 раза вмісту гормонів-активаторів (див. табл. 1).

Азотфіксувальна активність ризосферних мікроорганізмів пшениці у фазу трубкування у варіанті з обробкою насіння лектином підвищилася в 1,6 раза порівняно з контролем (див. табл. 2). Ми вважаємо, що позитивна зміна даного показника може визначатися, по-перше, високим рівнем ІОК у рослинах (удвічі більше за контроль), одним з результатів чого є активне формування кореневої системи рослини-хазяїна — місця контакту та життєдіяльності ґрунтових азотфіксувальних мікроорганізмів, по-друге, високим вмістом цитокінінів (утричі більше за контроль), наслідком дії яких є підвищення рівня хлорофілу в листі та інтенсифікація фотосинтетичних процесів. Стимуляція фотосинтезу, у свою чергу, забезпечує збільшення кількості фотоасимілятів, основна частина яких формує продуктивний потенціал рослини, а частина з кореневими виділеннями надходить до ґрунту та визначає розвиток і фізіологічну активність ризосферної мікрофлори. Результатом зміни фітогормонального балансу пшениці у фазу трубкування в напрямі зростання рівня цитокінінів та ІОК може бути відмічене нами підвищення показників кількості та маси зерен у колосі рослин, які перевищували контроль на 25 і 23% відповідно (див. табл. 2, середнє за чотири роки).

Отже, зміна фізіолого-біохімічних показників розвитку рослин, зокрема вмісту РНК, ендогенної лектинової активності, рівня флавоноїдів і хлорофілу в листі, формування вегетативної маси та зерна рослинами, а також активація азотфіксувальної здатності ризосферних мікроорганізмів за дії лектину пшениці на насіння може бути наслідком участі АЗП у регуляції ендогенного гормонального пулу в рослинах у напрямі істотного підвищення рівня цитокінінів (утричі) та ІОК (удвічі).

Аналіз висвітлених у літературі даних свідчить про вплив екзогенного лектину пшениці на ростові процеси і гормональний стан коренів проростків рослин [4, 5]. Показано [4], що при інкубації тридобових проростків пшениці сорту Саратовская 29 з АЗП (1 мг/мл) протягом 24 год збільшилась мітотична активність клітин апікальної меристеми (мітотичний індекс підвищився на 2,5%, площа клітин у зоні розтягу — на 12 мкм²). При цьому встановлено специфічність ефекту АЗП, оскільки гліадин і бичачий сироватковий альбумін (БСА), які було взято як контрольні білки, не викликали змін у показниках росту клітин, а лектини інших рослин, зокрема ФГА (лектин квасолі) і КонА (лектин конвалії), що також, як і АЗП, мають властивості мітогенів, не чинили істотного впливу на ріст клітин пшениці. Методом імуноаналізу показано [5], що екзогенна дія АЗП призводила до накопичення ауксинів і цитокінінів у коренях проростків пшениці, на підставі чого зроблено припущення про те, що рістстимулююча дія АЗП базується на зміні балансу фітогормонів у бік транзитного накопичення ІОК і цитокінінів. Крім того, рослинні лектини здатні до безпосередньої взаємодії з фітогормонами. Встановлено [14], що лектин лімської квасолі зв'язує цитокініни через гідрофобні центри зв'язування, не займаючи ліганди, які взаємодіють з вуглеводами. АЗП у системі *in vitro* проявляє спорідненість до зеатину [15]. При заміні АЗП на гліадин або БСА не виявлено кількісних змін зеатину, що свідчить про специфічність АЗП-зеатинової взаємодії та про нездатність даних білків зв'язувати цитокініни. При внесенні в середовище інкубування АЗП і зеатину гаптену лектину пшениці N-ацетил-D-глюкозаміну не відмічено збільшення кількості фітогормону, що підтверджує

зв'язування лектину з гормонами по гідрофобних центрах, які не залежать від його сайтів зв'язування з вуглеводами.

Таким чином, отримані нами результати, а також дані інших дослідників свідчать про те, що складовими участі екзогенного лектину в гормональній регуляції розвитку рослин можуть бути, по-перше, сигнальна регуляція росту і розвитку рослин за рахунок безпосередньої взаємодії з фітогормонами по гідрофобних центрах зв'язування, по-друге, зміна ендogenous балансу фітогормонів у напрямку підвищення рівня цитокинінів і ауксинів, а також стимуляція поділу і росту клітин за рахунок мітогенної активності деяких лектинів (АЗП, ФГА, КонА).

Отже, екзогенна дія специфічного лектину (АЗП) на насіння пшениці є пролонгованою і виявляється у зміні ендogenous фітогормонального балансу листя рослин у фазу трубкування у напрямі істотного зростання рівня цитокинінів та ІОК при наявності слідових кількостей АБК, наслідком чого є збільшення вмісту хлорофілу і флавоноїдів у листі пшениці, активне формування рослинами вегетативної маси і зерна, а також підвищення азотфіксувальної активності ризосферних мікроорганізмів.

1. *Rudiger H., Gabius H.-J.* Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications // *Glycoconj. J.* – 2001. – **18**. – P. 589–613.
2. *Курченко О. В.* Practice of soybean and wheat lectins use for the plant growing // *Probl. biogeochem. and geochem. ecology.* – 2008. – **1**, No 5. – P. 99–105.
3. *Курченко О. В.* Вплив передпосівної обробки насіння пшениці аглютиніном пшеничних зародків на вміст хлорофілу і лектинову активність у листі та азотфіксувальну здатність ризосферних мікроорганізмів // *Укр. біохім. журн.* – 2008. – **80**, № 1. – С. 107–113.
4. *Безрукова М. В., Авальбаев А. М., Кильдибекова А. Р. и др.* Взаимодействие лектина пшеницы и 24-эпибрассинолида в регуляции деления клеток корней пшеницы // *Докл. АН.* – 2002. – **387**, № 2. – С. 276–278.
5. *Безрукова М. В., Кильдибекова А. Р., Авальбаев А. М., Шакирова Ф. М.* Участие агглютинина зародыша пшеницы в регуляции деления клеток апикальной меристемы корней проростков // *Цитология.* – 2004. – **46**, № 1. – С. 35–38.
6. *Дерфлинг К.* Гормоны растений. Системный подход. – Москва: Мир, 1985. – 304 с.
7. *Курченко О. В., Тищенко О. М.* Вплив екзогенного специфічного лектину на ендogenous лектинову активність пшениці // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **77**, № 4. – С. 133–137.
8. *Савинский С. В., Драгозов И. В., Педченко В. К.* Определение зеатина, индоллил-3-уксусной и абсцизовой кислот из одной растительной пробы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Физиология и биохимия культ. растений.* – 1991. – **23**, № 6. – С. 606–614.
9. *Георгиевский В. П., Комиссаренко Н. Ф., Дмитрук С. Е.* Биологически активные вещества лекарственных растений. – Новосибирск: Наука, 1990. – 328 с.
10. *Hiscox J. D., Israelstam R. J.* The method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration // *Can. J. Bot.* – 1979. – **57**, No 12. – P. 1332–1334.
11. *Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C.* The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation // *Plant Physiol.* – 1968. – **43**, No 8. – P. 1185–1207.
12. *Гусаковская М. А., Блинцов А. Н., Ермаков И. П.* О гормональной регуляции развития завязи пшеницы *Triticum aestivum* // *Докл. АН.* – 2000. – **45**, № 5. – С. 689–692.
13. *Чернядьев И. И.* Фотосинтез и цитокинины // *Прикл. биохимия и микробиология.* – 1993. – **29**, № 5. – С. 644–673.
14. *Loris R., Hamelryck T., Vouckaert J., Wyns L.* Legume lectin structure // *Biochim. et biophys. acta.* – 1998. – **1383**. – P. 9–36.
15. *Авальбаев А. М., Кильдибекова А. Р., Безрукова М. В.* Изучение связывания агглютинина зародышей пшеницы (АЗП) с цитокининами методом иммуноанализа // *Биология – наука XXI века: VII Пушкинская школа – конф. молодых ученых, Пушкино, 14–18 апреля, 2003.* – Пушкино, 2003. – С. 44.

*Інститут фізіології рослин
і генетики НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 06.10.2009

O. V. Kyrychenko, M. V. Volkogon

Effect of wheat germ agglutinin at the presowing treatment of seeds on the level of cytokinins and auxins in leaves

We study the wheat germ agglutinin effect at the presowing treatment of seeds on the contents of plant hormones (cytokinins and IAA), flavonoids, and chlorophylls in leaves of wheat plants, as well as on the nitrogen fixation activity of rhizospheric microorganisms. The established alterations of the endogenic phytohormones balance have showed the significant raise of cytokinins (threefold) and IAA (twofold) levels which had resulted in changes of plant growth morpho-physiological indices: increase in the contents of chlorophylls and flavonoids in leaves, accumulation of vegetative mass and grains, and enhancement of the nitrogen fixation ability of rhizospheric microorganisms.