



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

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601, Україна

**ФІЗІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РОСТУ
ПЕРВИННОГО ЛИСТКА *PHASEOLUS
VULGARIS* L. В УМОВАХ ВОДНОГО
ДЕФІЦИТУ ПІСЛЯ ІНКУБАЦІЇ
НАСІННЯ В РОЗЧИНІ АБК**

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

Система гормональної регуляції є посередником між генетичною програмою онтогенезу й умовами навколишнього середовища [6, 13]. Вона досить лабільна, здатна швидко перебудовуватись і трансформувати зовнішні сигнали таким чином, що вони починають гальмувати або стимулювати ріст рослин і розвиток пристосувальних реакцій [7, 8, 15]. Відомо, що в умовах абіогенних та біогенних стресів індукується синтез абсцизової кислоти (АБК). Цей фітогормон ініціює зміну осмотичного потенціалу рослин, збільшення провідності коренів, експресію певних генів, забезпечує вихід Ca^{+2} з ендоплазматичного ретикулума і вакуолей та підвищення його концентрації в цитоплазмі, завдяки чому відбувається адаптація листків, закриваються продири та знижується транспірація [10, 13].

Негативний вплив посухи можна упередити екзогенною обробкою рослин відповідними аналогами регуляторів росту. Так, замочування насіння у розчинах

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

регуляторів росту цитокінінового типу збільшувало його схожість та кількість життєздатних проростків [24]. Обробка насіння АБК нормалізувала біохімічні процеси синтезу білків та протеолітичну активність у рослин за умов посухи і затоплення [18, 25], впливала на проростання насіння та ультраструктуру проростків [14]. Відомо, що для нормального розвитку і високої продуктивності рослин має значення не тільки їхня здатність переживати складні умови, а й відновлювати нормальний онтогенез. Незважаючи на значний обсяг інформації щодо морфологічних, анатомічних і фізіологічних змін у рослинах під час посухи [5, 7], мало уваги приділяється адаптивним механізмам, особливо участі в них системи фітогормональної регуляції. Нашою метою було дослідження впливу передпосівної обробки насіння квасолі розчином АБК на розвиток і гормональний комплекс первинних листків проростків, що формувалися в умовах недостатнього водозабезпечення.

Матеріал і методи досліджень

Відкаліброване насіння *Phaseolus vulgaris* L. сорту Білозерна інкубували на воді і в розчині 10^{-6} М АБК (протягом 3 год.), пророщували на фільтрувальному папері, змоченому водою (21 год.), а потім висаджували у ґрунт. Рослини вирощували при 22 °С і 16-годинному фотоперіоді протягом 14 діб. Дефіцит води був наслідком припинення поливу впродовж 2-х діб на стадії росту листків поділом клітин (5-та доба). Вологість ґрунту при цьому знижувалась на 50 % від початкової. Після відновлення поливу (7-ма доба) ріст рослин відбувався за нормальних умов до завершення морфогенезу первинних листків (14-та доба). Морфоанатомічні дослідження і фіксування матеріалу для визначення ендогенного вмісту вільних та зв'язаних форм гормонів проводили на стадії поділу клітин до поливу, після його припинення і в період повної зрілості інтактного первинного листка. Фітогормони екстрагували етанолом [16]. Індолілоцтову (ІОК) та абсцизову (АБК) кислоти визначали після кислотнo-лужної переекстракції водного залишку і доочищення за допомогою тонкошарової хроматографії. Цитокініни виділяли з водного залишку бутанолом з наступною очисткою із застосуванням іонообмінної і тонкошарової хроматографії. Гібереліноподібні речовини (ГПР) екстрагували етилацетатом та бутиловим спиртом. Етилацетатна фракція (ЕФ) містила переважно вільні, а бутанольна (БФ) — зв'язані форми ГПР типу глюкозидів. Кількісне визначення ІОК, АБК та цитокінінів проводили на високоефективному рідинному хроматографі фірми «Pye Unicam», ГПР — методом біотестів, сумарну активність виражали в еквівалентах ГК₃. Анатомію листків досліджували методом світлової мікроскопії. Кількісні дані обробляли статистично (P 2,6—3,5 %).

Результати дослідження та їх обговорення

Інкубація сухого насіння квасолі на початку пророщування в розчині АБК сприяла збільшенню вологості, біомаси, площі і товщини листків, кількості

продихів, клітин палісади та їх діаметра. На стадії активного поділу клітин підвищувався рівень усіх фітогормонів та їхніх форм [3].

Водний дефіцит затримував розвиток рослин: вони відставали у рості, не утворювали третього міжвузля, довжина гіпокотила не досягала значень контрольних рослин в обох варіантах досліду (таблиці 1, 2). У результаті знижувалася вологість листків, що призводило до збільшення (на 23 %) кількості клітин палісади на 1 мм зрізу, зменшення біомаси і площі первинного листка (відповідно, на 31 і 27 % у рослин, насіння яких пророщували на воді, і на 20 та 17 % — в разі обробки насіння АБК) (табл. 3). Однак товщина листової пластинки та кількість продихів збільшувалися у варіанті,

Таблиця 1. Довжина гіпокотила *Phaseolus vulgaris* L. при інкубації насіння в 10^{-6} М АБК за умов водного дефіциту, см

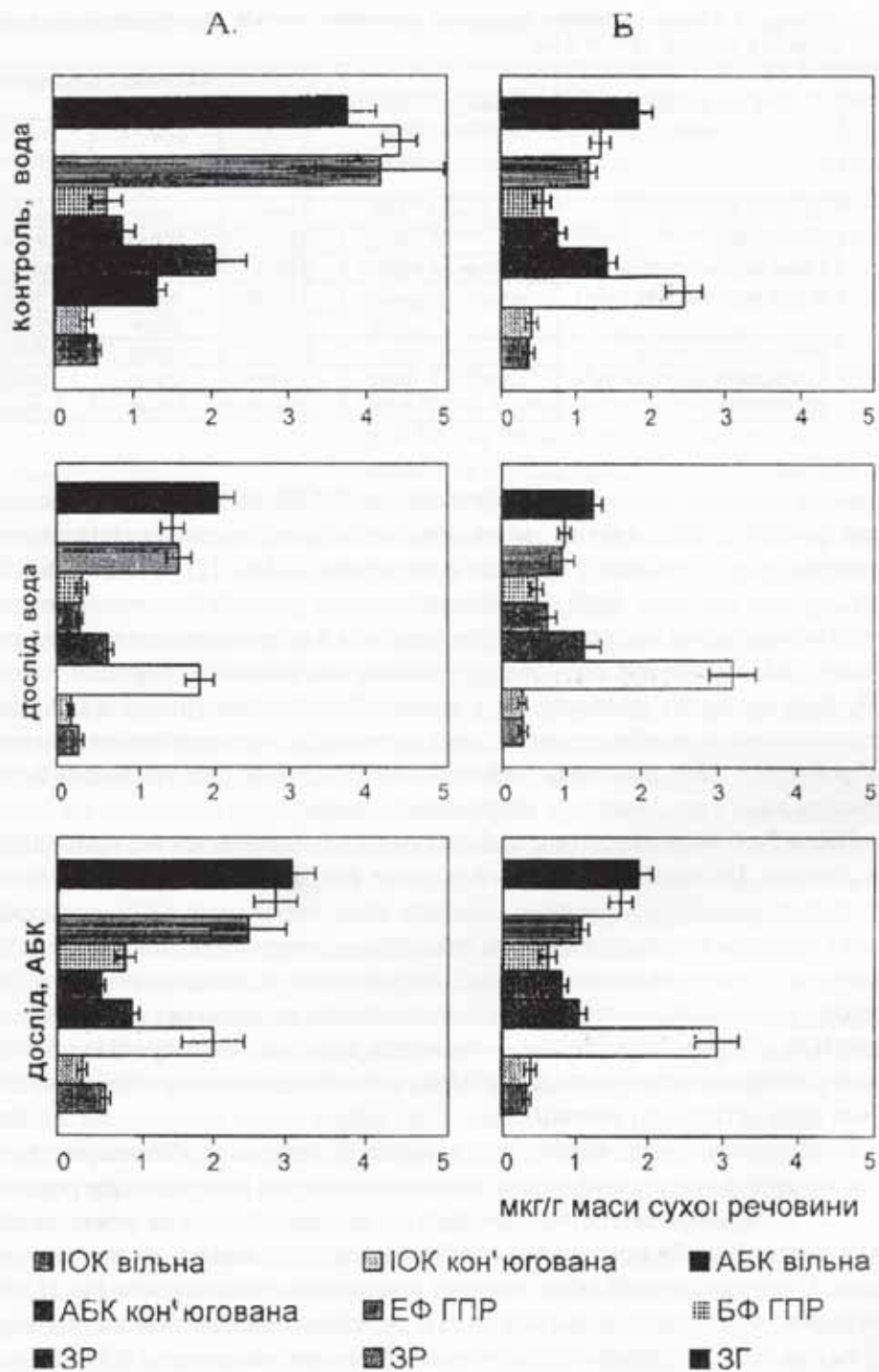
Варіант досліду		До дії водного дефіциту	Припинення поливу		Відновлення поливу		
		вік рослин, доби					
		5	6	7	8	10	14
Контроль, вода		4,4±0,5	7,3±0,4	8,2±0,4	9,0±0,1	9,2±0,1	9,3±0,3
Дослід	АБК	—	7,2±0,1	7,8±0,2	8,1±0,6	8,4±0,2	8,6±0,3
	вода	—	8,1±0,3	8,4±0,4	8,6±0,3	8,8±0,4	9,0±0,4

Таблиця 2. Довжина міжвузлів рослин *Ph. vulgaris* при інкубації насіння в 10^{-6} М АБК за умов водного дефіциту, см

Варіант досліду		Вік рослин, доби					
		8		10		14	
		перше	перше	друге	перше	друге	третє
Контроль, вода		1,7±0,3	3,8±0,2	1,6±0,3	3,9±0,5	2,1±0,2	0,2±0,1
Дослід	вода	1,5±0,2	3,2±0,2	0,9±0,2	3,4±0,2	1,6±0,1	—
	АБК	2,0±0,1	3,7±0,5	1,4±0,1	4,5±0,4	2,1±0,2	—

Таблиця 3. Морфологічні показники первинного листка *Ph. vulgaris* за умов водного дефіциту після інкубації насіння в розчині 10^{-6} М АБК

Етап досліду, доби	Варіант, обробка сухого насіння		Площа листка, см ²	Біомаса листка, г	Маса сухої речовини, %	Вологість, % до маси сир. речовини
До дії водного дефіциту (5-та доба)	контроль	вода	10,1±0,8	0,104±0,05	15,1±0,5	84,9±5,0
		АБК	11,2±0,9	0,107±0,04	11,5±0,6	88,5±6,0
	дослід	вода	27,5±2,0	0,419±0,07	10,8±0,8	89,2±3,0
Після водного дефіциту, стадія поділу клітин (7-ма доба)	контроль	вода	20,1±3,0	0,292±0,05	10,8±0,4	83,0±6,0
		АБК	22,8±4,0	0,334±0,03	11,3±0,6	88,3±5,0
	дослід	вода	58,3±1,0	1,072±0,04	9,3±0,2	90,7±5,0
Регідратація, стадія завершення росту листків (14-та доба)	контроль	вода	47,9±4,0	0,739±0,05	10,3±0,7	89,7±4,0
		АБК	57,2±2,0	0,891±0,06	9,7±0,8	90,3±6,0



Фітогормони первинного листка *Phaseolus vulgaris* L. після обробки насіння 10^{-6} М АБК за умов водного дефіциту: А — стадія поділу клітин; Б — завершення росту листка
 Phytohormones primary leaf *Phaseolus vulgaris* L. after seeds incubation in 10^{-6} M ABA under water deficit: A — stage of cell division; Б — stage of leaf maturity

Таблиця 4. Морфоанатомічні показники первинних листків *Ph. vulgaris* за умов водного насіння в розчині 10^{-6} М АБК

Етап дослід, доби	Варіант, обробка сухого насіння		Товщина листка, мкм	Кількість продохів на 1 мм^2	
				верхня епідерма	нижня епідерма
До дії водного дефіциту (5-та доба)	контроль	АБК	130±2	55±2	307±5
		вода	132±1	108±3	385±4
Після водного дефіциту, стадія поділу (7-ма доба)	дослід	контроль, вода	140±4	33±2	244±10
		вода	136±4	43±2	274±5
		АБК	154±3	80±4	400±8
Регідратація, стадія завершення росту листків (14-та доба)	дослід	контроль, вода	165±11	28±2	259±7
		вода	156±9	23±2	188±9
		АБК	178±4	46±4	225±14

коли для ініціації проростання застосовували АБК (табл. 4). Використання фітогормону та несприятливі умови практично не впливали на кількість хлоропластів, яка становила у палісадній паренхімі — 11—12, у губчастій — 5—6 шт. на зріз клітини. Такі морфоанатомічні та фізіологічні зміни корелюють зі зменшенням кількості всіх фітогормонів в обох варіантах дослід, крім вільної АБК. Зниження рівня фітогормонів у листках після обробки насіння АБК було не таким істотним, як у рослин без обробки (рисунок). За умов недостатнього водозабезпечення вміст зеатину та зеатинрибозиду знизився в оброблених АБК рослинах майже до 4 мкг/г маси сух. речовини без дії дефіциту води і до 3 мкг/г — після впливу посухи.

Після 2 діб обмеженого водозабезпечення відновлювався нормальний полив рослин. На стадії зрілого листка, коли вже завершився його інтенсивний ріст та розвиток, в особин, насіння яких обробляли АБК, ряд показників, зокрема загальна кількість продохів, діаметр палісадної паренхіми, вологість, біомаса та площа листків, наближались до показників контролю. Подібну тенденцію спостерігали відносно вмісту як вільних, так і зв'язаних форм ІОК, ГПР та цитокінінів — гормонів, кількість яких здебільшого корелює з інтенсивністю росту, а їх обмежений синтез може призвести до зниження продуктивності рослин.

Використання регуляторів росту в умовах біотичних та абіотичних стресів дає можливість регулювати окремі ланки онтогенезу і тому є одним із шляхів та методів управління ростом і розвитком рослин. Регуляція росту та розвитку синтетичними препаратами набуває дедалі більшого практичного значення. Передпосівна обробка насіння аналогами фітогормонів [4, 23, 26], поверхнево-активними речовинами [1], розчинами фітоактивних полімерів [17] та іншими сполуками, які регулюють фізіологічні процеси [29], сприяла адаптації, прискоренню росту та підвищенню продуктивності рослин шляхом стабілізації водного режиму, активації фотосинтезу, зміни фітогормонального балансу.

дефіциту після інкубації

Палісадна паренхіма		Кількість клітин палісади на 1 мм зрізу
висота клітини, мкм	діаметр клітини, мкм	
47.4±2	15.6±1	50±6
47.0±3	16.3±2	51±6
50.3±3	19.2±2	40±5
50.2±3	16.9±2	49±7
49.9±5	17.3±2	49±6
50.7±4	24.8±3	32±3
48.0±3	20.2±3	35±4
51.0±6	20.6±2	36±4

Екзогенна АБК здатна пом'якшувати вплив стресів на рослини. Обробка рослин її розчинами за умов високотемпературного стресу стабілізувала життєдіяльність двотижневих проростків томату [21], спричинювала закриття продохів і підвищення термостабільності фотосинтетичних мембран листків ячменю [27], збільшувала теплостійкість листків *Cucumis sativus* L., *Triticum aestivum* L. та *Hordeum vulgare* L., що, на думку деяких авторів, пояснюється синтезом мРНК та білків [2]. Однак є докази того, що механізм впливу АБК на резистентність рослин не пов'язаний з синтезом білка. Встановлено, що при

гіпертермії дія екзогенної АБК на стійкість рослин виявлялася у присутності циклогексиміду — інгібітора синтезу білка [9] і не впливала на синтез білків теплового шоку [12]. Реакція рослин на обробку фітогормоном залежить від його концентрації. Відомо, що АБК у концентраціях 10^{-3} — 10^{-5} М пригнічувала ріст та розвиток рослин і не впливала на стійкість до перегріву [19].

Встановлена обернена залежність між вмістом АБК та цитокінінів. Оскільки АБК і цитокініни мають спільного попередника, то припускають, що синтез певного гормону може залежати від нагальних потреб організму. Є дані, які засвідчують, що накопичення АБК може активувати процеси, спрямовані на зниження концентрації цитокінінів у рослинах за стресових умов [11]. Припускають, що АБК діє на ключовий фермент синтезу цитокінінів — аденілатізопентенілтрансферазу, кодовану генами, які були нещодавно виділені у *Arabidopsis thaliana* [28]. Обробка проростків кукурудзи високими концентраціями АБК спричинювала зниження у них вмісту цитокінінів [22]. Як було показано раніше, стадія максимальної мітотичної активності листків квасолі характеризується високим вмістом цитокінінів і АБК, що пояснюється активними процесами, які відбуваються в листку [20]. Неприятливі умови пригнічують інтенсивність накопичення цитокінінів, а екзогенна АБК послаблює негативний вплив стресу на їх рівень.

В результаті проведених експериментів із застосуванням фізіологічної концентрації АБК для обробки насіння встановлено, що вона активувала продукування та накопичення ендогенних ІОК, ГПР і цитокінінів у первинних листках *Ph. vulgaris* і це сприяло адаптації після перебування рослин у стані помірного водного дефіциту, а також захисні механізми, які зменшували гальмівну дію стресу на ріст листків. Таким чином, обробка насіння АБК не повною мірою перешкоджала впливу водного дефіциту, але дозволяла запобігати суттєвим негативним змінам росту листків, а їх морфоанатомічні та фізіологічні показники на стадії зрілого листка були близькими до таких у контрольних рослин.

1. Аксенова Л.А., Зак Е.А., Бочарова М.А. и др. Влияние предпосевной обработки семян пшеницы поверхностно-активными веществами на их прорастание при неблагоприятных условиях // Физиол. раст. — 1990. — 37, № 5. — С. 1007—1014.
2. Акимова Т.В., Балагурова Н.И., Титов А.Ф. и др. Повышение теплоустойчивости листьев при локальном прогреве проростков // Физиол. раст. — 2001 — 48, № 4. — С. 584—588.
3. Васюк В.А., Генералова В.М., Веденичева Н.П. та ін. Участь абсцизової кислоти в регуляції росту первинного листка *Phaseolus vulgaris* L. // Укр. ботан. журн. — 2005. — 62, № 4. — С. 574—580.
4. Григорюк І.А., Нижник Т.П., Курчий Б.А. Регуляція содержания абсцизової кислоти в листьях картофеля и помидоров полистимулином К, полистимулином А-6 и эмистиком в условиях засухи // Физиол. и биохим. культ. раст. — 2001. — 33, № 3. — С. 241—244.
5. Григорюк І.П., Жук О.І. Ріст пшениці і кукурудзи в умовах посухи та його регуляція. — К.: Наук. світ, 2002. — 118 с.
6. Иванова А.Б., Анцигина Л.Л., Ярин А.Ю. Современные аспекты изучения фитогормонов // Цитология. — 1999. — 41, № 10. — С. 835—847.
7. Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Бараненко В.В. и др. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. — Киев: Наук. думка, 2003. — 277 с.
8. Косаківська І.В. Фізіолого-біохімічні основи адаптації рослин до стресів. — К.: Сталь, 2003. — 192 с.
9. Критенко С.П., Титов А.Ф. Влияние абсцизової кислоти и цитокинина на биосинтез белка при холодовой и тепловой адаптации растений // Физиол. раст. — 1990. — 37, № 1. — С. 126—132.
10. Кудоярова Г.Р. Уровень фитогормонов в растении: способы регуляции, биологическая значимость // Экол. аспекты регул. роста и продукт. раст. — Ярославль, 1991. — С. 158—169.
11. Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Усманов И.Ю. Гормональная регуляция соотношения биомассы побег/корень при стрессе // Журн. общ. биол. — 1999. — 60, № 6. — С. 633—641.
12. Кузнецов В.В., Баврина Т.В., Фам З.Х. и др. Регулируют ли фитогормоны синтез белков теплового шока в растениях? // Докл. РАН. — 1997. — 356, № 2. — С. 427—430.
13. Кулаева О.Н., Прокопцева О.С. Новейшие достижения в изучении механизма действия фитогормонов // Физиол. раст. — 2004. — 69, № 3. — С. 293—310.
14. Мартин Г.И., Берестецкий В.А., Мусатенко Л.И. и др. Влияние абсцизової кислоти на прорастание семян фасоли // Физиол. и биохим. культ. растений. — 1991. — 23, № 6. — С. 546—551.
15. Мелехов Е.И. Принцип регуляции скорости процесса повреждения клеток и реакция защитного торможения метаболизма (РЗТМ) // Журн. общ. биол. — 1985. — 46, № 2. — С. 174—189.
16. Мусатенко Л.И., Веденичева Н.П., Васюк В.А. и др. Комплекс фитогормонов в проростках различных по устойчивости к повышенным температурам гибридов кукурузы // Физиол. раст. — 2003. — 50, № 4. — С. 499—504.
17. Нижник Т.П., Уманець Н.О., Григорюк І.П. та ін. Вплив регуляторів росту на інтенсивність фотосинтезу, водний дефіцит та вміст хлорофілу в листках сортів картоплі за умов посухи // Наук. вісн. Ужгор. ун-ту. Сер. біол. наук. — 2000. — Вип. 7. — С. 61—65.
18. Платонов А.В., Бахтенко Е.Ю. Физиологическая реакция зерновых культур на неблагоприятные условия водоснабжения и значение АБК в формировании устойчивости // Интрод., акклим. и культ. раст. — Калининград.: Гос. ун-т, 1998. — С. 94—103.
19. Пустовойтова Т.Н., Меликсетян Н.А. Торможение роста абсцизової кислотою і засухоустойчивість проростков пшениці // Физиол. раст. — 1985. — 32, № 1. — С. 169—175.
20. Сытник К.М., Мусатенко Л.І., Мартин Г.І. та ін. Клітинний ріст і фітогормональний комплекс первинного листка *Phaseolus vulgaris* L. // Укр. ботан. журн. — 2002. — 59, № 3. — С. 239—246.
21. 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. раст. — 1989. — 21, № 1. — С. 48.
22. Теплова И.Р., Кудоярова Г.Р., Никитина В.С. Изменение гормонального баланса этилированных проростков кукурузы под действием экзогенных гормонов // Иммуноферм. анализ регуляторов роста раст. Применение в физиол. раст. и экол. — Уфа: Изд-во БНЦ УрО АН СССР, 1990. — С. 78—82.

23. Троян В.М., Безвенок З.А. Листопад Т.А. Влияние предпосевной обработки семян физиологически активными веществами на генеративное развитие кукурузы // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1993. — 25, № 2. — С. 144—150.
24. Шматько И.Г., Григорюк И.А., Шведова О.Е. Устойчивость растений к водному и температурному стрессам. — Киев: Наук. думка, 1989. — 224 с.
25. Angelova Y.M., Petkova S.G., Popova N.I. et al. Influence of ABA and 4PU-30 on the growth, proteolytic activities and protein composition of maize seedlings // *Biologia plantarum*. — 2002. — 45, N 1. — P. 33—37.
26. Basra A.S., Dhilon R., Malik C.P. Influence of seed pre-treatments with plant growth regulators on metabolic alterations of germinating maize embryo under stressing temperature regimes // *Ann. Bot.* — 1989. — 64, № 1. — P. 37—41.
27. Ivanov A.C., Kitcheva M.I., Christova A.M. et al. Effects of abscisic acid treatment on the thermostability of the photosynthetic apparatus in barley chloroplasts // *Plant Physiol.* — 1992. — 98, № 4. — P. 1228—1232.
28. Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. Identification of genes encoding adenylateisopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme in *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem.* — 2001. — 276. — P. 26405—26410.
29. Trewavas A.J. Growth substances sensitivity: the limiting factors in plant development // *Physiol. plant.* — 1982. — 50, № 1. — P. 60—72.

Рекомендує до друку
Я.П. Ділух

Надійшла 28.04.2005

В.А. Васюк, В.Н. Генералова, Н.П. Веденичева, Г.И. Мартын, Л.И. Мусатенко, К.М. Сьтник
Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, г. Киев

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РОСТА ПЕРВИЧНОГО ЛИСТА
PHASEOLUS VULGARIS L. В УСЛОВИЯХ ВОДНОГО ДЕФИЦИТА
ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ СЕМЯН В РАСТВОРЕ АБК

Изучали влияние предпосевной обработки семян фасоли раствором АБК (10^{-6} М, 3 ч) на развитие и гормональный комплекс первичных листьев проростков, которые формировались в условиях недостаточного водообеспечения. Дефицит воды создавали на стадии митотической активности (5-е сут.), прекращая полив на 2-е сут., на 7-е сут. полив возобновляли, рост листьев продолжался до их полной зрелости (14 сут.). Установлено, что в условиях стресса экзогенная АБК способствовала увеличению толщины листовой пластинки, количества устьиц, не влияла на количество хлоропластов, в то же время нормализовала содержание фитогормонов (ИУК, ГПВ, цитокининов). Использование АБК не полностью предотвращало влияние водного дефицита, но способствовало стабилизации ростовых процессов, в результате чего морфоанатомические и физиологические характеристики листа на стадии его зрелости приближались к контрольным.

V.A. Vasjuk V.N. Generalova, N.P. Vedenicheva, G.I. Martyn, L.I. Musatenko, K.M. Sytnik
M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine Kyiv

PHASEOLUS VULGARIS L. PRIMARY LEAF GROWTH
UNDER DROUGHT AFTER SEEDS TREATMENT WITH ABA

Influence of seeds incubation in ABA solution (10^{-6} M) on *Phaseolus vulgaris* L. primary leaf development and phytohormonal complex under drought was studied. Water deficit was induced by cessation of watering during 2 days at the stage of intensive leaf cell division (5-th day of germination). As a result of seeds imbibition in ABA solution increase in leaf thickness, formation of the greater stomata amount, stabilization in endogenous phytohormones (IAA, cytokinins and gibberellin-like substances) content under stress conditions were observed. ABA did not affect the chloroplasts amount. Treatment with ABA did not prevent negative effect of water deficit completely but promoted the growth processes normalization. As a result morphological and anatomical leaf characteristics at the stage of maturity were comparable to control.