



М.М. МУСІЄНКО, В.В. ЖУК, Л.М. БАЦМАНОВА

Навчально-науковий центр «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, 01601, Україна
zhuk_bas@voliacable.com

ПРОТЕКТОРНА РОЛЬ ЦИТОКІНІНУ ЗА ДІЇ ТЕПЛОВОГО СТРЕСУ НА РОСЛИНИ ПШЕНИЦІ

К л ю ч о в і с л о в а: БАП, гіпертермія, хлорофіл, H_2O_2 , антиоксидантні ферменти

Вступ

Надмірне підвищення температури навколишнього середовища належить до найпоширеніших стресових чинників. У злаків у період вегетативного росту високотемпературний стрес поряд з інгібуванням фотосинтетичної асиміляції CO_2 і посиленням дихання спричиняє порушення гормонального гомеостазу в напрямку зменшення вмісту цитокінінів і зростання кількості абсцизової кислоти (Chernyad'ev, 2009. Varnabas et al., 2008). Одним із наслідків дії високої температури є деструктивні зміни у фотосинтетичному апараті, які зумовлюють зменшення фотохімічної ефективності фотосистеми II як чутливого компонента фотосинтезу (Varnabas et al., 2008).

У процесі функціонування фотосинтетичного апарату та інших систем клітини утворюється

значна кількість активних форм кисню (АФК), які передусім виконують сигнальні функції (Hung et al., 2005). Найбільш розповсюдженим і довгожиттєвим з-поміж них є пероксид водню (H_2O_2), що аквапориновими каналами здатен транспортуватися на далекі відстані. Надлишок АФК може спричинити окиснювальний стрес, у захисті від якого задіяні системи скавенджерів ферментної та неферментної природи (Колупаєв, Косаківська, 2008).

З відкриттям акцепторів цитокінінів остаточно доведена їхня участь у регуляції розвитку хлоропластів, диференціації судин, старінні листків, відповіді на абіотичні стреси (Haberger, Kieber, 2002). Визначна роль у цих процесах належить ароматичним цитокінінам, які функціонують у надземній частині рослин. Цитокініновий сигнал запускає каскад фосфорилування і трансдукується за допомогою трансферних білків до ядра (Argueso et al., 2010). Найбільш ранню реакцію на дію цитокіні-

© М.М. МУСІЄНКО, В. В. ЖУК, Л. М. БАЦМАНОВА, 2014

нів відзначають протягом 30 хв і виявляють її унаслідок залучення транскрипційних факторів, які ініціюють цю хвилю відповіді. Швидка регуляція численних генів, локалізованих у хлоропластному геномі, дала підстави вважати, що цитокініновий сигнал швидко досягає цієї органели і впливає на транскрипцію пластидного геному (Kudo et al., 2010).

Показано, що висока температура спричиняє різке зменшення вмісту ендogenous цитокінінів (Wahid et al., 2007). Встановлено, що обробка рослин цитокініном індукуює збільшення рівня HY5 білка, який є контрольним у двокомпонентному сигнальному шляху відповіді цих фітогормонів на стрес (Werner, Schmulling, 2009). Цитокініни можуть впливати на кількість хлоропластів через GRF транскрипційні фактори, які безпосередньо регулюють експресію генів, залучених до поділу пластид, а додавання екзогенного цитокініну збільшувало число хлоропластів (Okazaki et al., 2009). З'ясовано, що екзогенний цитокінін БАП підвищував активність комплексу антиоксидантних ферментів у відокремлених листках пшениці у процесі їхнього старіння (Zavaleta-Mancera et al., 2007). Дослідження протекторної функції екзогенних цитокінінів проводились здебільшого за дії таких абіотичних чинників, як дефіцит води і засолення (Cherpyad'ev, 2009). Останнім часом з'явилися відомості про участь зеатину у підвищенні антиоксидантної активності *Agrostis stolonifera* L. за високої температури (Wang et al., 2012). Однак значення цитокінінів у захисті рослин пшениці від гіпертермії залишається майже нез'ясованим. Нашими попередніми дослідженнями встановлено, що в умовах природної посухи обробка рослин озимої пшениці у фазі виходу в трубку цитокініном 6-бензиламінопурином (БАП) підвищувала їхню продуктивність і стійкість шляхом пригальмування старіння прапорцевого листка, збільшення кількості та маси зерен у колоску (Мусієнко, Жук, 2011). Однак захисна дія ароматичних цитокінінів за високотемпературного стресу все ще недостатньо досліджена. Метою цієї роботи було з'ясування протекторної дії БАП у разі гіпертермії на клітини листкового мезофілу рослин пшениці.

Об'єкти та методи досліджень

Об'єктом вивчення були рослини озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Поліська 90, яку вирощували в умовах водної культури протя-

гом 14 діб до фази двох листків, після чого рослини дослідних варіантів обробляли обприскуванням 10^{-4} М водним розчином 6-бензиламінопурину (БАП — $C_{12}H_{11}N_5$). Частину оброблених і необроблених рослин прогрівали у повітряному термостаті за температури 45° С протягом трьох годин. Температуру в термостаті контролювали термометром на рівні рослин. Вологість повітря вимірювали психрометром, вона коливалась у межах 70—80 %. Передня стінка термостата була скляною і рослини перебували в умовах природного освітлення. За добу після дії високої температури та протягом наступних двох діб відбирали зразки тканин першого листка для визначення вмісту фотосинтетичних пігментів, пероксиду водню, активності антиоксидантних ферментів. Пігменти екстрагували з рослинного матеріалу 96 % етанолом і визначали спектрофотометричним методом (Wintermans, Mots, 1965; Brouers, Michel-Wolwertz, 1983). Вміст пігментів обчислювали з розрахунку на масу сухої речовини. Досліди повторювали тричі.

Живі клітини зрізів листків завтовшки 40—50 мкм досліджували за допомогою лазерного конфокального мікроскопа LSM510 META («Carl Zeiss», Germany) з використанням об'єктива LD Plan-Neofluor 40x/0,6 Corr (Wymer et al., 1999). Флуоресценція хлорофілу збуджувалась за довжини хвилі 543 нм і реєструвалася в діапазоні від 560 до 700 нм.

Вміст ендogenous перекису водню (H_2O_2) визначали після гомогенізації з калій-фосфатним буфером (рН 6,5) та центрифугування за 6000 г протягом 25 хв. До супернатанту додавали 0,1 % розчин сульфату титану в 20 % розчині сірчаної кислоти. Оптичну густину комплексу жовтого забарвлення вимірювали за 410 нм на спектрофотометрі (Chen, Као, 1999). Вміст H_2O_2 встановлювали з урахуванням коефіцієнта екстинкції $0,28 \text{ мкмоль}^{-1}\text{см}^{-1}$. Результати виражали в $\mu\text{М } H_2O_2/\text{г}$ сирової маси.

Визначення активності антиоксидантних ферментів проводили після гомогенізації рослинного матеріалу в калій-фосфатному буфері (рН=7,0) на холоді (Rios-Gonzalez et al., 2002). Гомогенат центрифугували 20 хв при 12000 г за температури 4° С. Активність аскорбатпероксидази (АПО) (КФ 1.11.1.11) визначали за методом Накано й Асада (Nacano, Asada, 1981). До супернатанту додавали калій-фосфатний буфер (рН 7,0), аскорбат до концентрації 0,5 мМ і для запуску реакції — 0,1 мМ

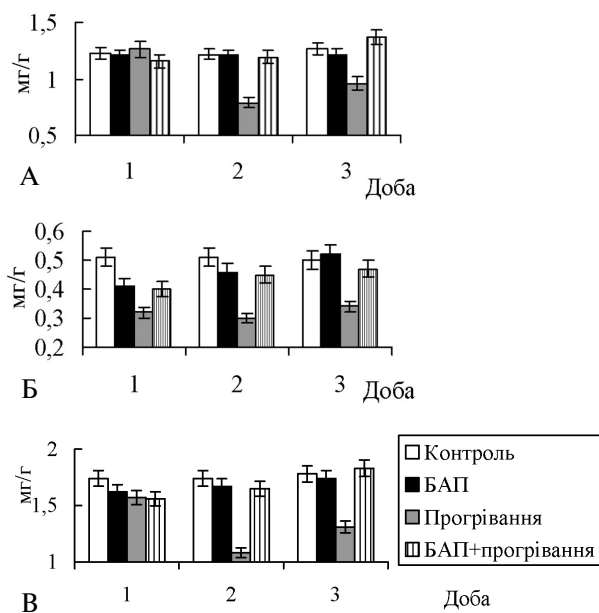


Рис. 1. Вплив високої температури та БАП на вміст хлорофілів: А — хлорофілу *a*, Б — хлорофілу *b*, В — хлорофілів *a+b* у листках пшениці сорту Поліська 90

Fig. 1. Effect of high temperature and BAP on chlorophyll content: A — chlorophyll *a*, B — chlorophyll *b*, C — chlorophyll *a+b* in wheat leaves, variety Poliska 90

H_2O_2 . Падіння оптичної густини аскорбату вимірювали за 290 нм. Для визначення активності каталази (КАТ) (КФ 1.11.1.6) до супернатанту додавали 50 мМ калій-фосфатний буфер (pH=7,0), реакцію запускали додаванням 0,03 % H_2O_2 (Uradhuaya et al., 1985). Зміну оптичної густини розчину вимірювали за довжини хвилі 240 нм. Усі отримані дані обробляли статистично з використанням критерію Стьюдента ($P \leq 0,05$) за допомогою програмного пакета Microsoft Excel.

Результати досліджень та їх обговорення

Дослідженнями з'ясовано, що вміст хлорофілу *a* в першому листку пшениці сорту Поліська 90 після дії високої температури протягом двох діб зменшувався вдвічі (рис. 1, А). Вплив екзогенного БАП в умовах гіпертермії загальмував деградацію хлорофілу *a* і його рівень залишався близьким до контролю. Вміст хлорофілу *b* після гіпертермії також знизився більш як удвічі порівняно з відповідними значеннями контролю (рис. 2, Б). Обробка рослин БАП до стресу зменшувала деградацію хлорофілу *b* і стимулювала відновлення його кількості.

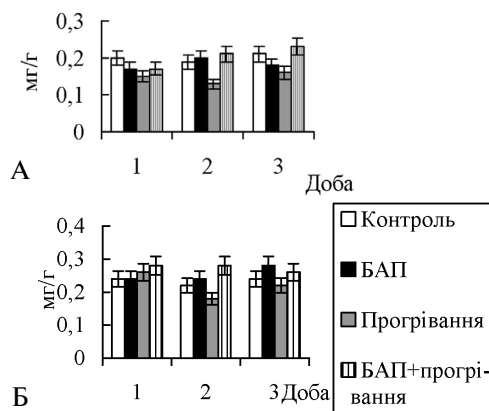


Рис. 2. Вплив високої температури та БАП на вміст протохлорофілів (А) і каротиноїдів (Б) у листках пшениці сорту Поліська 90

Fig. 2. Effect of high temperature and BAP on protochlorophyll (A) and carotenoid (B) content in wheat leaves variety Poliska 90

На третю добу після стресового періоду вміст хлорофілу *b* в оброблених БАП рослин пшениці наближався до значень контролю. Вплив гіпертермії спричиняв найрізкіше зменшення кількості протохлорофілу і каротиноїдів на другу добу після стресу (рис. 2, А, Б). Екзогенний БАП підвищував концентрацію протохлорофілу і каротиноїдів здебільшого на третю добу відновного періоду.

Вмісту ендогенного H_2O_2 зростав майже вдвічі впродовж першої доби після дії високотемпературного стресу у варіанті без обробки БАП (рис. 3). Незначне збільшення концентрації H_2O_2 відзначено в листках після обробки рослин БАП протягом однієї доби порівняно зі значеннями контролю.

На другу добу вміст ендогенного H_2O_2 після впливу високої температури залишався на такому ж високому рівні, як і першої доби. Протягом третьої доби після стресового періоду відзначено

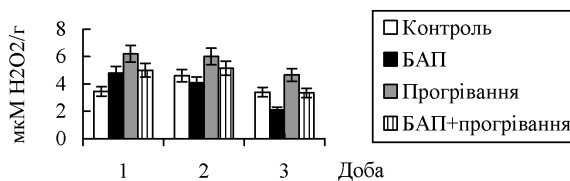


Рис. 3. Вміст H_2O_2 в листках після дії БАП та високої температури на рослини пшениці сорту Поліська 90

Fig. 3. H_2O_2 content in leaves after BAP and high temperature treatment on wheat plants, variety Poliska 90

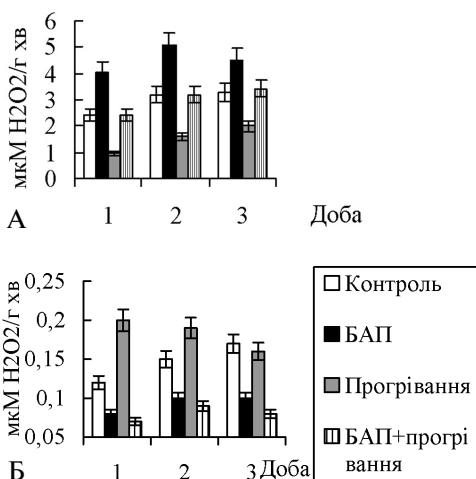


Рис. 4. Вплив гіпертермії та БАП на активність А — АПО, Б — КАТ у листках пшениці сорту Поліська 90

Fig. 4. Effect of high temperature and VAP on A — APX, B — CAT activities in wheat leaves, variety Poliska 90

зменшення ендogenous вмісту H_2O_2 в усіх варіантах. Найвищі рівні концентрації H_2O_2 зафіксовані за дії високотемпературного стресу і спостерігалися протягом двох діб після прогрівання рослин.

Дослідження активності ферментів, які утилізують переважну кількість ендogenous H_2O_2 , допомогло встановити, що активність АПО найбільше зростала після дії БАП (рис. 4, А).

Рівень активності АПО, у разі обробки рослин БАП за умов високотемпературного стресу був близьким до показника контролю. Протягом трьох діб відновного періоду активність АПО збільшувалась у контрольному варіанті, після прогрівання і сумісної дії БАП та гіпертермії. Після прогрівання у необроблених БАП рослин найбільше зростала активність КАТ (рис. 4, Б). Дія БАП значно знижувала цей показник, що вказує на зменшення активності утилізації продуктів деградації клітин у пероксисомах. Однак у першому листку рослин контрольного варіанта активність КАТ підвищувалась більш як удвічі протягом другої і третьої діб дослідження, що може пояснюватися прогресивним старінням тканин.

Дослідження, проведені з використанням методу конфокальної лазерної мікроскопії, дали змогу з'ясувати, що у першого листка пшениці рослин контрольного варіанта частина хлоропластів втрачала здатність до червоної флуоресценції (рис. 5).

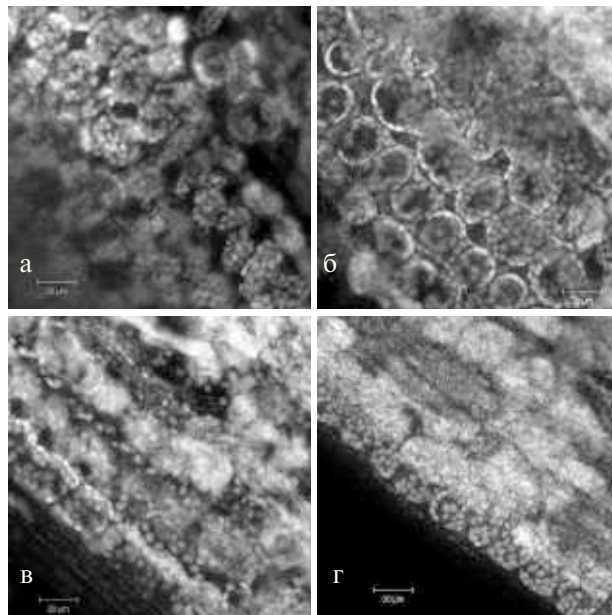


Рис. 5. Вплив високої температури та БАП на клітини листкового мезофілу пшениці сорту Поліська 90 (а — контроль, б — прогрівання, в — БАП, г — БАП+прогрівання, розмір шкали — 20 мкм)

Fig. 5. Effect of high temperature and VAP on wheat leaf mesophyll cells, variety Poliska 90 (a — control, б — heating, в — VAP, г — VAP+heating, scale bar — 20 µm)

Найбільше таких клітин виявлено у губчастому мезофілі. Через добу після дії високої температури кількість функціональних хлоропластів у мезофілі зменшувалась порівняно з контролем. Клітини губчастого мезофілу виявили значнішу деструкцію, ніж стовбчастого.

Обробка рослин пшениці сорту Поліська 90 БАП підвищувала вміст життєздатних хлоропластів у клітинах листкового мезофілу. Метод конфокальної мікроскопії раніше виявився також корисним у вивченні деградації фотосинтетичного комплексу в ході старіння листків тополі (Keskitalo et al., 2005). Під впливом різних абіотичних чинників достовірно встановлено стимуляцію синтезу пігментів і відновлення фотосинтетичного апарату за дії БАП (Chernyad'ev, 2009). Стимуляція екзогенним цитокініном функціонування фотосинтетичного апарату проявилась також у виділенні додаткової кількості H_2O_2 . Посилення сигнальної функції H_2O_2 в умовах стресу стимулює відновні процеси та запуск захисних механізмів, як продемонстровано раніше іншими дослідниками на модельних об'єктах (Hung et al., 2005; Suzuki, Mittler, 2006). Індукція цитокініном системи скавенджерів

уможливило нейтралізацію надлишка АФК, про що свідчить підвищення активності АПО, яка є основним утилізатором H_2O_2 у хлоропластах. Отримані нами результати узгоджуються з дослідженнями, які продемонстрували пригальмування процесів старіння у відокремленому листку пшениці (Zavaleta-Mancera et al., 2007). Підтвердженням протекторної дії цитокініну є зменшення під впливом БАП активності КАТ, що переважно функціонує в пероксисомах й утилізує H_2O_2 , яка продукується в процесі розпаду клітинного матеріалу. Дія високої температури без обробки БАП спричиняла різке підвищення активності КАТ, що може обумовлюватися посиленням деструктивних процесів. Зростання активності КАТ відзначено також у контролі і свідчить про розвиток процесів старіння. Таким чином, екзогенний ароматичний цитокінін БАП зменшував деструктивний вплив високої температури шляхом захисту фотосинтетичного апарату, посилення синтезу хлорофілу, АФК-сигналіну й активності комплексу антиоксидантних ферментів. Цитокінін БАП пом'якшував ушкоджувальну дію стресу на клітинні структури, сприяв відновленню функціональної здатності клітин у післястресовий період, що пов'язано зі здатністю БАП безпосередньо включатись у пул ендогенних цитокінінів і брати участь у сигнальних і регуляторних процесах.

Висновки

Попередня обробка рослин пшениці ароматичним цитокініном БАП за високотемпературного стресу сприяла збереженню і швидшому відновленню фотосинтетичного апарату листка пшениці. Захисна дія БАП в умовах гіпертермії пов'язана зі стимуляцією активності АПО. Під впливом високої температури зростала активність КАТ і зменшувалась — АПО, що регулювало ендогенний рівень активних форм кисню, зокрема H_2O_2 , в умовах стресу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Колунаєв Ю.Є., Косаківська І.В. Роль сигнальних систем і фітогормонів у реалізації стресових реакцій рослин // Укр. ботан. журн. — 2008. — 65, № 3. — С. 418—430.
- Мусієнко М.М., Жук В.В. Вплив екзогенного цитокініну на стійкість пшениці за умов посухи // Вісн. аграр. науки. — 2011. — 3. — С. 34—36.
- Argueso Cr.T., Raines T., Kieber J.J. Cytokinin signaling and transcription networks // Curr. Opin. Plant Biol. — 2010. — 13. — P. 533—539.
- Barnabas B., Jager K., Feher A. Effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals // Plant Cell Environ. — 2008. — 31. — P. 11—38.
- Brouers M., Michel-Wolwertz M.-R. Estimation of protochlorophyll (ide) contents in plants in plant extracts: re-evaluation of molar absorption coefficient of protochlorophyll(ide) // Photosynth. Res. — 1983. — 4. — P. 265—270.
- Chernyad'ev I.I. The protective action of cytokinins on the photosynthetic machinery and productivity of plants under stress // Appl. Biochem. Microbiol. — 2009. — 45(4). — P. 351—362.
- Chen L.-M., Kao C.-H. Effect of excess copper on rice leaves: evidence for involvement of lipid peroxidation // Bot. Bull. Acad. Sin. — 1999. — 40. — P. 283—287.
- Haberer G., Kieber J.J. Cytokinins. New insight into classic phytohormones // Plant Physiol. — 2002. — 128. — P. 354—362.
- Hung S.-H., Yu Ch.-W., Lin Ch.Y. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants // Bot. Bull. Acad. Sin. — 2005. — 46. — P. 1—10.
- Keskitalo J., Bergquist G., Gardstrom P., Jansson S. A cellular timetable of autumn senescence // Plant Physiol. — 2005. — 139. — P. 1635—1648.
- Kudo T., Kiba H., Sakakibara T. Metabolism and long-distance translocation of cytokinins // J. Integr. Plant Biol. — 2010. — 52(1). — P. 53—60.
- Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts // Plant Cell Physiol. — 1981. — 22(5). — P. 867—880.
- Okazaki K., Kabeya Y., Suzuki K., Mori T., Ichikawa T., Matsui M., Nakanishi H., Miyagishima S. The PLASTID DIVISION 1 and 2 components of the chloroplast division in land plant differentiation // Plant Cell. — 21. — P. 1769—1780.
- Rios-Gonzalez K., Erdei L., Lips S.H. The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen sources // Plant Sci. — 2002. — 162. — P. 923—930.
- Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction // Physiol. Plant. — 2006. — 126. — P. 45—51.
- Upadhyaya A., Sankhla D., Davis T.D., Sankhla N., Smith B.N. Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves // J. Plant Physiol. — 1985. — 121(5). — P. 453—461.
- Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Foolad M.R. Heat tolerance in plants: an overview // Environ. Exper. Bot. — 2007. — 61. — P. 199—223.
- Wang K., Zhang X., Ervin E. Oxidative responses in roots and shoots of creeping bentgrass under high temperature: effects of nitrogen and cytokinin // J. Plant Physiol. — 2012. — 169. — P. 492—500.
- Werner T., Schmulling T. Cytokinin action in plant development // Curr. Opin. Plant Biol. — 2009. — 12. — P. 527—538.
- Wintermans J.F.G., de Mots A. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol // Biochem. Biophys. Acta. — 1965. — 109. — P. 448—453.
- Wymer C.L., Beven A.F., Boudonck K., Lloyd G.W. Confocal microscopy of plant cell // Methods Mol. Biol. — 1999. — 122. — P. 103—130.
- Zavaleta-Mancera H.A., Lopez-Delgado Y., Loza-Tavera Y., Mora-Tavera H., Trevilla-Garcia C., Vargas-Suarez M., Ougham H. Cytokinin promotes and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence // J. Plant Physiol. — 2007. — 164. — P. 1572—1582.

Рекомендує до друку
О.К. Золотарьова

Надійшла 11.11.2013 р.

Н.Н. Мусиенко, В.В. Жук, Л.М. Бацманова

Научно-учебный центр «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко

ПРОТЕКТОРНАЯ РОЛЬ ЦИТОКИНИНА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТЕПЛОВОГО СТРЕССА НА РАСТЕНИЯ ПШЕНИЦЫ

Исследовано протекторное действие цитокинина 6-бензиламинопурина (БАП) на растения пшеницы, которые подвержены тепловому стрессу. Показано, что обработка растений пшеницы БАП до стресса защищала от деструкции фотосинтетический аппарат листка и стимулировала его восстановление, повышала содержание пигментов. Защитное действие БАП связывали со стимуляцией активности основных антиоксидантных ферментов и регуляцией эндогенного уровня активной формы кислорода H_2O_2 в клетках мезофилла листьев пшеницы.

Ключевые слова: БАП, гипертермия, хлорофилл, H_2O_2 , антиоксидантные ферменты.

M.M. Musienko, V.V. Zhuk, L.M. Batsmanova

ESC «Institute of Biology», Taras Shevchenko National University of Kyiv

THE PROTECTIVE ROLE OF CYTOKININ UNDER THE HEAT STRESS ON WHEAT PLANTS

The protective role of cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) on wheat plants was studied under the heat stress conditions. It has been shown that treatment of wheat plants by BAP before stress protected the leaf photosynthetic apparatus from degradation and stimulated its recovery, increased pigments content. Protective effect of BAP was connected with antioxidant enzymes activity stimulation and endogenous content of reactive oxygen form H_2O_2 regulation in wheat mesophyll leaf cells.

Key words: BAP, hyperthermia, chlorophyll, H_2O_2 , antioxidant enzymes.

ОГОЛОШЕННЯ

SYNANTHROPIZATION OF FLORA AND VEGETATION

The 11th International Conference

11-13 September 2014 in Poznan

Poznań - Collegium Biologicum, Morasko - Umultowska 89 Obrzycko - The House of Creative Work and Leisure of Adam Mickiewicz University - Zamkowa 1

Adam Mickiewicz University in Poznań

Faculty of Biology, Department of Plant Taxonomy, Department of Plant Ecology and Environmental Protection, Botanical Garden

Committee of Botany of the Polish Academy of Sciences. Polish Botanical Society, Poznan Branch

would like to invite you to participate in the Conference on anthropogenic transformations of plant cover

CONFERENCE PROGRAM OUTLINE: Thursday 11 September 2014

- Plenary session dedicated to Professor dr. nab. Janusz B. Faliński on his 10th death anniversary
- Paper session 1: Anthropogenic transformations of flora
- Paper session 2: Anthropogenic transformations of vegetation
- Poster session

Friday 12 September 2014 .

- Paper session 3: Plant variability and microevolution in human-influenced ecosystems
- Paper session 4: Process and mechanisms of plant extinction
- Paper session 5: Process and mechanisms of plant invasion
- Poster session
- Ceremonial supper
- Transfer to the House of Creative Work and Leisure in Obrzycko

Saturday 13 September 2014

- Field trip: Notecka Forest — Warta Valley — Notec Valley

ORGANIZATIONAL INFORMATION

Organizational Committee: Zbigniew Celka (**Chairman**); Elzbieta Obarska & Natalia Olejnik (**Secretariat**); Julian Chmiel, Marlena Lembicz, Marek Kasproicz, Piotr Szkudlarz, Justyna Wiland-Szymańska

Address of the Conference Secretariat: Department of Plant Taxonomy, Faculty of Biology of Adam Mickiewicz University, Umultowska 89, 61-614 Poznań, Phone: +48 61 829 5696 /56S8 /5692 /5689, Fax: +48 61 8295636, e-mail: zcelka@amu.edu.pl, eobarska@amu.edu.pl

Costs of participation: registration fee - 250 PLN, PhD students & students - 150 PLN; meals (breakfasts in Poznań excluded) — 250 PLN, accommodation in Obrzycko — 60 PLN a night; accommodation in Poznań — please arrange on your own, organizers recommend: System Hotels (<http://www.quality-hotels.pl/poznan>)

For the detailed information on the Conference and registration please visit: www.synantrop.home.edu.pl