



Н.П. ВЕДЕНІЧЕВА, Л.І. МУСАТЕНКО

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

**ЛОКАЛІЗАЦІЯ І ДИНАМІКА
ЦИТОКІНІНІВ У ПЕРІОД
ФОРМУВАННЯ РЕПРОДУКТИВНИХ
ОРГАНІВ *ZEA MAYS* L.**

Ключові слова: кукурудза, цитокініни, морфогенез, органи, репродуктивний розвиток, цвітіння

Участь цитокінінів як одного з важливих компонентів гормональної системи рослин у контролі генеративних процесів показана багатьма дослідженнями. Так, екзогенні цитокініни за сприятливих умов стимулювали цвітіння різних видів рослин [16]. Обробка суцвіття бензиламінопурином значно зменшувала опадання квіток та підвищувала закладання плодів у сої [12]. У рослин, які культивували *in vitro*, виявлено залежність переходу до цвітіння від наявності і концентрації цитокінінів у живильному середовищі [13, 20]. У дефіцитних за вмістом цитокінінів мутантів арабідопсису цвітіння затримувалося на 3 місяці, хоча їх флоральний фенотип не відрізнявся від норми [21]. Екзогенна обробка цитокінінами прискорювала зацвітання пізньоквітучих мутантів томатів [13]. Водночас рослини салату та гороху, збагачені цитокінінами за рахунок оверекспресії генів їх синтезу, затримували цвітіння [19]. Участь цитокінінів у контролі цвітіння показана як для фотоперіодично залежних, так і нейт-

ральних щодо тривалості дня рослин, проте динаміка їх вмісту в органах була різною: якщо у перших за умов флоральної стимуляції спостерігалось суттєве підвищення рівня цих гормонів в апексах, то у других наприкінці вегетативного росту він різко знижувався в апікальній меристемі пагонів. Зовсім не досліджений розподіл цитокінінів у процесі переходу до генеративного розвитку рослин з інтеркалярним типом росту. Класичним об'єктом таких досліджень є кукурудза — рослина, що завжди привертала увагу як одна з надзвичайно важливих сільськогосподарських культур. Відомі дослідження динаміки цитокінінів у вегетативних органах проростків кукурудзи на ранніх етапах розвитку [6, 8], їх метаболізму та особливостей цитокінінового сигналіngu [18, 22], розподілу цитокінінів уздовж стебла у період вегетативного росту [15]. Проте відсутні відомості щодо динаміки цитокінінів в органах кукурудзи при переході до цвітіння, не вивчалася можлива участь цих фітогормонів у встановленні корелятивних зв'язків між ними. Крім того, враховуючи, що кукурудза — однодомна рослина, її квітки і колоски одностатеві, можна припустити існування певних відмінностей у розподілі гормонів між органами при переході до репродукції.

Тому нашою метою було дослідження якісного складу і кількісного вмісту ендогенних цитокінінів у вегетативних та репродуктивних органах *Zea mays* L. у період формування квіток і переходу до цвітіння, що є важливим для розкриття особливостей онтогенетичного розвитку цієї рослини.

Матеріал та методи дослідження

Об'єктом дослідження були рослини кукурудзи *Z. mays* сорту Буковинська Т 11, які вирощували за умов польового досліду на експериментальній базі Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України у Феофанії.

Матеріал відбирали у періоди: 1) початку формування квіток (стадія розгортання 5-го листка); 2) формування пиляків (стадія розгортання 7-го листка); 3) посиленого росту суцвіть і виходу волоті (стадія розгортання 11-го листка). Аналізували волоть, листок біля волоті, качан, листок біля качана, корінь, міжвузля біля волоті та біля качана.

Цитокініни екстрагували 80 %-м етиловим спиртом. З водного залишку їх виділяли водонасиченим бутанолом (рН 8) з додатковою очисткою за допомогою іонообмінної хроматографії на Dowex 50WX8. Тонкошарову хроматографію цитокінінів проводили у системі розчинників ізопропанол : аміак : вода (10:1:1). Маркерами були стандартні розчини зеатину, зеатинрибозиду та зеатинглюкозиду (Sigma, США). Кількісно цитокініни визначали за методом високоефективної рідинної хроматографії на хроматографі фірми Pye Unicam з УФ детектором при 269 нм. Детальніше методика описана раніше [7].

Результати досліджень та їх обговорення

Кукурудза — рослина з різностатевими суцвіттями, органогенез яких відбувається паралельно з вегетативним ростом стебла і послідовним розгортанням листків. Для дослідження ми обрали три стадії росту рослини, що передують цвітінню і на яких волоть та качани формуються подібним чином [5].

Дослідження розпочали, коли спостерігалось розгортання 5-го листка, посилений ріст 4—6 міжвузлів, а також формування колосків у волоті та качані. В цей період найвищий рівень усіх досліджених цитокінінів виявлено в коренях рослин та листках біля волоті (табл. 1). Листки біля качана містили втричі менше зеатинрибозиду та вдвічі — зеатину порівняно з листками коло волоті, а найменшим їх вміст був у тканинах волоті та качана, що розвиваються. В качані зеатин не виявлено зовсім і дещо неочікуваним було накопичення зеатинглюкозиду.

Подальший розвиток рослин кукурудзи характеризувався посиленням росту середніх міжвузлів стебла, розгортанням 7-го листка, формуванням пиляків та пилку у волоті, утворенням рильцевих горбочків та рильця у качані. Рівень ендогенних цитокінінів у вегетативних органах у цей період був нижчим, аніж на попередній стадії розвитку (табл. 2). У коренях та листках біля волоті майже втричі знижувався вміст зеатинрибозиду, в листках поблизу качана — не так помітно, але значно зменшувалася концентрація зеатинглюкозиду, у коренях — до нуля. В генеративних органах рівень цитокінінів був незначним, але він підвищувався порівняно з попередньою стадією розвитку: в качані більш як удвічі зростав рівень зеатинрибозиду і визначався зеатин, у волоті підвищувався вміст зеатину. У волоті з'являвся зеатинглюкозид, а в качані його концентрація різко падала.

Таблиця 1. Вміст цитокінінів в органах кукурудзи сорту Буковинська на стадії формування віток і розгортання 5-го листка, нг/г сирової речовини

Орган	Зеатинрибозид	Зеатин	Зеатинглюкозид
Волоть	21 ± 3	14 ± 2	0
Листок біля волоті	306 ± 14	225 ± 9	242 ± 8
Качан	58 ± 6	0	426 ± 10
Листок біля качана	106 ± 5	122 ± 12	174 ± 5
Корінь	330 ± 11	461 ± 16	502 ± 17

Таблиця 2. Вміст цитокінінів в органах кукурудзи сорту Буковинська на стадії формування пиляків і розгортання 7-го листка, нг/г сирової речовини

Орган	Зеатинрибозид	Зеатин	Зеатинглюкозид
Волоть	28 ± 6	59 ± 3	39 ± 3
Листок біля волоті	81 ± 3	150 ± 5	68 ± 3
Міжвузля біля волоті (5-те)	29 ± 7	69 ± 1	0
Качан	138 ± 9	85 ± 3	48 ± 3
Листок біля качана	69 ± 4	112 ± 6	52 ± 3
Міжвузля біля качана (7-ме)	10 ± 1	25 ± 4	5 ± 1
Корінь	115 ± 6	290 ± 11	0

Процес інтенсивного росту стебла за рахунок верхніх, особливо «волоттевого», міжвузлів і розгортання 11-го листка супроводжувався активним ростом генеративних органів і завершувався виходом волоті та початком цвітіння. Тривало зниження концентрації цитокінінів у тканинах листків як біля волоті, так і поблизу качана (табл. 3). У репродуктивних органах, навпаки, накопичувалися (максимально — у качані) активні форми цитокінінів — зеатинрибозид та зеатин. У коренях рівень цитокінінів майже не змінювався порівняно з попередньою стадією розвитку.

У міжвузлях біля волоті (5-те) і качана (7-ме) на другому етапі досліджень вміст зеатинрибозиду був незначним і знижувався на третьому етапі (таблиці 2, 3). Рівень зеатину в міжвузлях був у декілька разів вищим і залишався стабільним, зеатинглюкозид практично відсутній.

Отримані результати показали, що концентрації зеатинрибозиду та зеатину в коренях і листках на початку дослідження були подібні до визначених наприкінці проростання насіння [1]. У подальшому вегетативний ріст кукурудзи та формування генеративних органів супроводжувалися суттєвими змінами вмісту як вільних, так і зв'язаних цитокінінів в окремих частинах рослини. У вегетативних органах (листки, корені, міжвузля) поступово знижувався рівень цитокінінів, що, як відомо, є характерною ознакою зрілих тканин і супроводжує вікові зміни у рослин [3]. Справді, після виходу волоті ріст стебла і листків кукурудзи практично припиняється [5], що, очевидно, пов'язано з початком їх старіння.

Раніше було показано наявність концентраційного градієнта зеатину та зеатинрибозиду вздовж стебла кукурудзи: вміст цитокінінів знижувався у базипетальному напрямку у 10 разів; верхні, тобто молодші, міжвузля містили більше гормонів, ніж старі. Градієнт цитокінінів існує і в кожному окремому міжвузлі [15]. Це, найімовірніше, пов'язано з мітотичною активністю меристеми. Як відомо, значний вміст цитокінінів характерний саме для тканин з високим мітотичним індексом, де ці гормони є регуляторами клітинного циклу [3]. На жаль, досі не встановлено, чи здатні інтеркалярні меристеми стебла кукурудзи синтезувати цитокініни і чи можуть вони таким чином продукува-

Таблиця 3. Вміст цитокінінів в органах кукурудзи сорту Буковинська на стадії посиленого росту суцвіть і розгортання 11-го листка, нг/г сирової речовини

Орган	Зеатинрибозид	Зеатин	Зеатинглюкозид
Волоть	86 ± 5	147 ± 7	58 ± 4
Листок біля волоті	44 ± 3	76 ± 5	30 ± 3
Міжвузля біля волоті (11-те)	11 ± 2	88 ± 6	0
Качан	352 ± 7	402 ± 14	0
Листок біля качана	18 ± 3	20 ± 2	сліди
Міжвузля біля качана (7-ме)	0	31 ± 2	0
Корінь	133 ± 8	191 ± 9	0

ти пул цитокінінів, який надходить у генеративні органи. Отримані нами дані вказують на таку можливість, оскільки вміст зеатину в міжвузлях у кілька разів перевищував концентрацію зеатинрибозиду. Для стебла рослин з апікальним типом росту характерне протилежне співвідношення цих форм. Це було одним з непрямих доказів того, що зеатинрибозид є метаболітом, у формі якого цитокініни рухаються стеблом від коренів з ксилемним потоком [14]. Проте, якщо припустити можливість утворення цитокінінів *de novo* в інтеркалярних меристемах кожного міжвузля, стає зрозумілою вища концентрація в них зеатину — одного з первинних продуктів синтезу цитокінінів [4].

Вважається, що основним інструментом регуляції рівня цитокінінів у кукурудзи є фермент цитокініноксидаза, який відповідає за їх деградацію і активністю якого визначається розвиток вегетативних органів [11]. За нашими даними, у вегетативних і репродуктивних органах кукурудзи міститься значна кількість зв'язаної форми цитокінінів — зеатинглюкозиду, яка суттєво змінюється протягом вегетації. Це означає, що вміст ендогенних цитокінінів залежить і від активності інших ферментів, а саме глюкозилтрансфераз та глюкозидаз, які каталізують, відповідно, синтез і розпадання глюкозильних форм, і таким чином нівелюють надлишок синтезованих *de novo* вільних цитокінінів чи, навпаки, підвищують їх вміст за рахунок гідролізу зв'язаних.

Паралельно зі зниженням рівня цитокінінів у вегетативних органах кукурудзи він підвищується у генеративних. У більшості рослин утворення флоральної меристеми стимулюється або тривалістю дня, або віковими змінами залежно від фотоперіодичної чутливості [9]. В обох випадках це пов'язане з коливаннями рівнів цитокінінів. Конуси наростання генеративних органів можна виявити ще в зародку зернівки кукурудзи, і для розвитку волоті і качана не потрібна флоральна стимуляція, хоча його швидкість залежить від тривалості дня, особливо на початкових етапах органогенезу [5]. Встановлено, що у фотоперіодично залежних рослин закладання і розвиток генеративних органів супроводжується підвищенням вмісту цитокінінів в апексах [17]. Ми також з'ясували, що в качані та волоті поступово підвищується вміст зеатину та зеатинрибозиду, хоча кількість останнього залишається значно меншою у волоті. Крім того, в качані на початкових етапах розвитку рослин достатньо великою є концентрація зеатинглюкозиду. На думку Берньє, дія цитокінінів у репродуктивному процесі строго залежна від певної їх концентрації, а будь-які відхилення та супероптимальні дози справляють інгібіторний ефект [10]. Тому можна припустити, що закладання генеративних органів кукурудзи не потребує великої кількості цитокінінів, а її підвищення у процесі розвитку вказує на посилення регуляторної ролі цих гормонів при переході до цвітіння.

Встановлено, що кількаразове збільшення вмісту зеатину і зеатинрибозиду у зав'язях пшениці в період активізації яйцеклітини та її запліднення, найвірогідніше, відбувається за рахунок гормонів, які надходять від материнської рослини [2]. Ми виявили, що зростання вмісту цитокінінів у генеративних органах не супроводжувалося його підвищенням у коренях та нижніх міжвузлях, тобто цілком ймовірним є те, що репродуктивні органи кукурудзи

цілковито або частково забезпечуються цитокинінами автономно, за рахунок синтезу *in situ*.

Таким чином, результати аналізу динаміки цитокинінів в органах кукурудзи засвідчують, що в процесі репродукції відбувається їх суттєвий перерозподіл між органами рослини, а також змінюються співвідношення активних і зв'язаних форм. На відміну від рослин з апікальним типом росту репродуктивні органи кукурудзи, ймовірно, є незалежнішими від надходження цитокинінів з коренів материнської рослини і набувають здатності до автономного їх продукування у процесі розвитку. Високі рівні зеатину і зеатинрибозиду, характерні як для вегетативних, так і репродуктивних органів у період їх інтенсивного росту і розвитку, свідчать про посилення в цей період індукції експресії генів, сигналом для яких є цитокиніни, і активацію синтезу білків, що кодуються цими генами. Відповідне посилення метаболізму — необхідний чинник для забезпечення інтенсивного росту і розвитку рослини.

1. Васюк В.А., Веденічева Н.П., Генералова В.М. та ін. Фітогормони осьових органів проростків кукурудзи в гетеротрофний період росту // Укр. ботан. журн. — 2006. — **63**, № 6. — С. 829—836.
2. Гусаковская М.А., Блинцов А.Н. Пространственно-временное распределение содержания зеатина и зеатинрибозидов в период активности яйцеклетки в завязях растений с половым и апомиктическим типами репродукции // Физиол. раст. — 2004. — **51**, № 2. — С. 249—255.
3. Иванова А.Б., Анцыгина Л.Л., Ярин А.Ю. Современные аспекты изучения фитогормонов. Цитокинины // Цитология. — 2001. — **43**, № 6. — С. 537—43.
4. Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. Новейшие достижения и перспективы в области изучения цитокининов // Физиол. раст. — 2002. — **49**, № 4. — С. 626—640.
5. Куперман Ф.М., Ржанова Е.И., Мурашов В.В. и др. Биология развития культурных растений. — М.: Высш. шк., 1982. — 343 с.
6. Москалева О.В., Каравайко Н.Н. Динамика эндогенных фитогормонов в развивающихся проростках кукурузы // Физиол. раст. — 1990. — **37**, № 6. — С. 1113—1120.
7. Мусатенко Л.И., Веденічева 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.
8. Полевой В.В., Полевой А.В. Фитогормоны этиолированных проростков кукурузы // Физиол. раст. — 1992. — **39**, № 6. — С. 1165—1171.
9. Чайлахян М.Х. Регуляция цветения высших растений // Гормональная регуляция онтогенеза растений. — М.: Наука, 1984. — С. 9—28.
10. Bernier G., Kinet J.-M., Sachs R.M. The physiology of flowering. — Boca Raton (Fla): CRC Press, 1981, V. II. — 231 p.
11. Brugère N., Jiao Sh., Hantke S. et al. Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid and abiotic stress // Plant Physiology. — 2003. — **132**, № 3. — P. 1228—1240.
12. Carlson D.R., Dyer D.J., Cotteman C.D., Durley R.C. The physiological basis for cytokinin induced increase in pod set in IX93-100 soybeans // Plant Physiol. — 1987. — **84**, N 1. — P. 233—239.
13. Dielen V., Lecouvet V., Dupont S., Kinet J.-M. *In vitro* control of floral transition in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), the model for autonomously flowering plants, using the late flowering *uniflora* mutant // J. Exp. Bot. — 2001. — **52**. — P. 715—723.
14. Dodd I.C., Beveridge C.A. Xylem-borne cytokinins: still in search of a role? // J. Exp. Bot. — 2006. — **57**, N 1. — P. 1—4.

15. Hansen C.E., Wenzler H., Meins F. Jr. Concentration gradient of *trans*-zeatin riboside and *trans*-zeatin in the maize stem // *Plant Physiol.* — 1984. — **75**. — P. 959—963.
16. Kinet J.-M., Lejeune P., Bernier G. Shoot-root interaction during floral transition: a possible role for cytokinins // *Environmental and Experimental Botany.* — 1993. — **33**. — P. 459—469.
17. Machácková I., Krekule J., Eder J., Seidova F., Strnad M. Cytokinins in photoperiodic induction of flowering in *Chenopodium* species // *Physiol. Plant.* — 1993. — **87**. — P. 160—166.
18. Martin R.C., Mok M.C., Habben J.E., Mok D.W.S. A maize cytokinin gene encoding an O-glucosyltransferase specific to *cis*-zeatin // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* — 2001. — **98**, № 10. — P. 5922—5926.
19. McCabe M.S., Garratt L.C., Schepers F., Jordi W.J.R.M. et al. Effects of PSAG12-*IPT* gene expression on development and senescence in transgenic lettuce // *Plant Physiol.* — 2001. — **127**. — P. 505—516.
20. Taylor N.J., Light M.E., Van Staden J. In vitro flowering of *Kniphofia leucocephala*: influence of cytokinins // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 2005. — **83**, N 3. — P. 327—333.
21. Werner T., Motyka V., Strnad M., Sch Müller T. Regulation of plant growth by cytokinin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2001. — **98**. — P. 10487—10492.
22. Yonekura-Sakakibara K., Kojima M., Yamaya T., Sakakibara H. Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to *cis*-zeatin // *Plant Physiol.* — 2004. — **134**. — P. 1654—1661.

Рекомендує до друку
М.М. Мусієнко

Надійшла 19.09.2008

Н.П. Веденичева, Л.И. Мусатенко

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

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ДИНАМИКА ЦИТОКИНИНОВ В ПЕРИОД ФОРМИРОВАНИЯ РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНОВ *ZEA MAYS* L.

Изучено распределение цитокининов в листьях, корнях, отдельных междоузлиях, початке и метелке кукурузы в период вегетативного роста и органогенеза репродуктивных органов. Показано, что содержание зеатина и зеатинрибозида в листьях, корнях и междоузлиях в ходе развития уменьшается, а в початке и метелке — повышается. Предполагается возможность автономного (полного или частичного) синтеза цитокининов в репродуктивных органах, что обеспечивает высокий уровень метаболизма в период активного роста.

Ключевые слова: кукуруза, цитокинины, морфогенез, органы, репродуктивное развитие, цветение.

N.P. Vedenicheva, L.I. Musatenko

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

CYTOKININS LOCALIZATION AND DYNAMICS DURING FORMATION OF REPRODUCTIVE ORGANS IN *ZEA MAYS* L.

Cytokinins distribution in leaves, roots, some internodes, male and female inflorescences during vegetative growth and organogenesis of reproductive organs of *Zea mays* L. was studied. Decrease in zeatin and zeatin riboside contents in leaves, roots and internodes has been shown. Levels of these hormones increased in both male and female inflorescences during their development. It can be assumed that cytokinins biosynthesis in reproductive organs is partly or completely autonomous, which is a factor that provides high metabolic level during active growth.

Key words: *Zea mays* L., cytokinins, morphogenesis, organs, reproductive development, flowering.