

Н.П. ВЕДЕНІЧЕВА

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

ЦИТОКІНІНИ В ОРГАНАХ *PHASEOLUS VULGARIS* L. У РЕПРОДУКТИВНИЙ ПЕРІОД РОЗВИТКУ

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

Морфогенез рослин з вегетативного на репродуктивний змінюється в апікальних стеблових меристемах під впливом гормональних речовин, що утворюються в інших частинах організму. Відповідно до цього апікальні меристеми дають початок органам, які відрізняються за фізіологічними функціями: замість листків і стебла з'являються квітки. Фізіологічну природу зацвітання рослин широко вивчали у фотоперіодично залежних рослин: вони сприймають світловий сигнал листками (листова фаза фотоперіодичної реакції), після чого у стебловій бруньці вегетативний морфогенез змінюється на генеративний (стеблова фаза фотоперіодичної реакції). Більшість сільськогосподарських рослин є фотоперіодично нейтральними, перехід до цвітіння у них не поділяється на дві фази, а відбувається водночас у листках та стеблі і залежить від вікових змін [6, 7]. Вікова індукція призводить до утворення відповідного гормонального комплексу в листках та стеблах за будь-якої тривалості дня [8].

Серед гормонів, що беруть участь у регуляції репродуктивних процесів у вищих рослин, важливе місце посідають цитокініни. Їх включення до процесів контролю цвітіння досліджували переважно у фотоперіодично залежних рослин. Найкраще вивченим об'єктом з цього погляду є гірчиця (*Sinapis alba* L.), цвітіння якої стимулюється одним лише довгим днем. При цьому рівень цитокінінів суттєво підвищується у листках та їх флоемному соці, що збігається з рухом флорального стимулу [9]. У подальшому вміст цитокінінів зростає в апікальній меристемі пагона на стадії ранньої активації мітотичного поділу клітин [17]. Нанесення екзогенних цитокінінів на вегетативні органи рослин гірчиці, котрі вирощували за короткого дня, індукувало в апікальній меристемі пагонів клітинні та молекулярні зміни, характерні для переходу до цвітіння [10].

Аналіз динаміки ендогенних цитокінінів у фотоперіодично залежних рослин інших видів показав подібну картину — підвищення вмісту гормонів в апексах у разі флоральної стимуляції [19]. Екзогенні цитокініни також стимулювали цвітіння у різних видів рослин за сприятливих для цього умов [18].

Набагато менше відомостей щодо ролі цитокинінів у регуляції цвітіння нейтральних до тривалості дня рослин. Показано, що у фотоперіодично нейтральних тютюнів наприкінці вегетативного росту різко знижується вміст цитокинінів в апікальній меристемі пагонів [14]. Створення градієнта цвітіння у рослин тютюну Трапезонд пов'язане з активністю цитокинінів у стеблі, а їх нанесення на листки стимулювало активний ріст пагона і зацвітання [5]. У корневих ексудатах сої максимум цитокинінів припадав на перші доби цвітіння, а потім знижувався удвічі. Обробка суцвіття бензиламінопурином значно зменшувала опадання квіток та підвищувала закладку плодів [12]. У багатьох роботах встановлена залежність переходу до цвітіння у рослин, що вирощувалися *in vitro*, від наявності і концентрації цитокинінів у живильному середовищі [15, 22]. Наведені дані вказують на важливу роль цитокинінів як компонентів системи, котра контролює генеративні процеси у фотоперіодично нейтральних рослин, хоча чіткої картини в цьому випадку немає. Так, існують сумніви щодо можливості регуляції цвітіння цитокинінами, синтезованими в коренях [11]. Суперечливі дані стосовно ролі цитокинінів у зацвітанні отримані при дослідженні трансгенних рослин. Мутанти арабідопсиса, дефіцитні за вмістом цитокинінів, демонстрували затримку цвітіння на 3 місяці, хоча їх флоральний фенотип не відрізнявся від норми [25]. Додаткове надходження цитокинінів у пізно квітучих мутантів томатів прискорювало зацвітання [15]. Водночас рослини салату та гороху, збагачені цитокинінами за рахунок оверекспресії генів синтезу цитокинінів, затримували цвітіння [20].

Враховуючи брак та неоднозначність даних щодо участі цитокинінів у репродуктивних процесах нечутливих до тривалості дня рослин, ми поставили за мету вивчити якісний склад і кількісний вміст ендogenous цитокинінів у вегетативних та репродуктивних органах рослин *Phaseolus vulgaris* L. під час формування квіток, цвітіння і закладання плодів, що також є важливим для розуміння всієї картини онтогенетичного розвитку рослин.

Матеріал та методи дослідження

Об'єктом дослідження були дорослі рослини квасолі *Phaseolus vulgaris* L. сорту Білозерна. Рослини вирощували за умов польового досліду на експериментальній базі Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України у Феофанії.

Матеріал відбирали у періоди бутонізації, початку цвітіння, запилення квіток і початку закладання плодів. Відбирали трійчастий листок і міжвузля біля суцвіття, бутони, корінь, квітки до та після запилення.

Цитокиніни екстрагували 80 %-м етиловим спиртом. З водного залишку їх виділяли водонасиченим бутанолом при рН 8, з додатковою очисткою за допомогою іонообмінної хроматографії на Dowex 50WX8. Тонкошарову хроматографію цитокинінів проводили у системі розчинників ізопропанол:аміак:вода (10:1:1). Як маркери використовували стандартні розчини зеатину, зеатинрибозиду та зеатинглюкозиду (Sigma, США). Кількісне визначення

цитокінінів проводили методом високоефективної рідинної хроматографії на хроматографі фірми Рye Unicam з УФ детектором при 269 нм [4].

Результати досліджень та їх обговорення

У період утворення бутонів вміст зеатину і зеатинрибозиду був найвищим у листках і коренях. У листках відзначено також порівняно великий вміст зв'язаної форми цитокінінів — зеатинглюкозиду. У міжвузлях і бутонах зафіксовані лише невеликі кількості зеатину та зеатинрибозиду (рис. 1). На початку цвітіння спостерігалось незначне зниження рівнів вільних цитокінінів у листках і коренях, трохи підвищувався їх вміст у квітках (рис. 2). Концентрація цитокінінів в органах суттєво змінювалася після запилення квіток і початку закладання плодів. При цьому вміст усіх цитокінінів значно знижувався у листках і підвищувався у коренях, у міжвузлях зростав рівень зеатинрибозиду. Найбільше кількість зеатинрибозиду та зеатину зростала в репродуктивних органах (рис. 3). Концентрація зеатинглюкозиду була значною лише в листках на початку дослідження (рисунки 1, 2). Після запилення він виявлявся також у міжвузлях та квітках (рис. 3).

Загалом можна сказати, що на початку репродуктивного періоду для рослин квасолі характерна тенденція до зменшення вмісту активних форм цитокінінів у листках і його підвищення в коренях і квітках. Слід відзначити, що концентрації цитокінінів в органах квасолі на цьому етапі онтогенезу були не високі порівняно з виявленими на початку розвитку насіння або

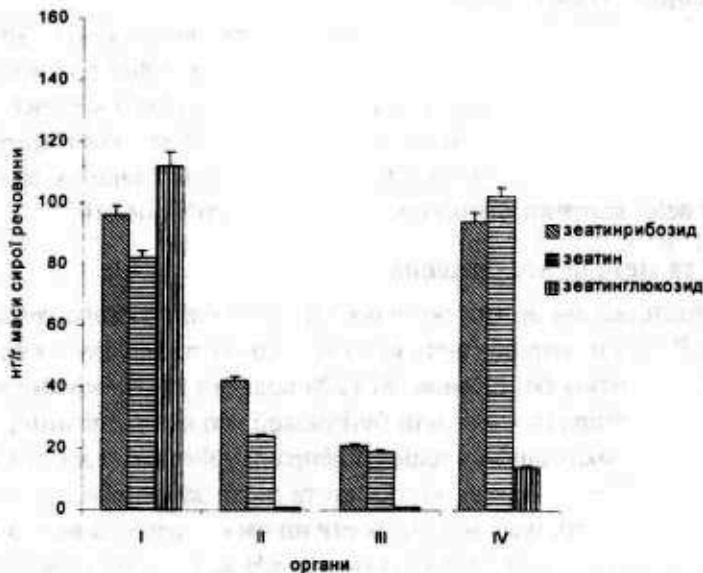


Рис. 1. Вміст цитокінінів в органах *Ph. vulgaris* у фазу бутонізації: I — трійчастий листок біля суцвіття, II — міжвузля біля суцвіття, III — бутони, IV — корінь

Fig. 1. Cytokinins content in *Ph. vulgaris* organs at the stage of budding: I — trifoliate leaf near inflorescence, II — internode near inflorescence, III — buds, IV — roots

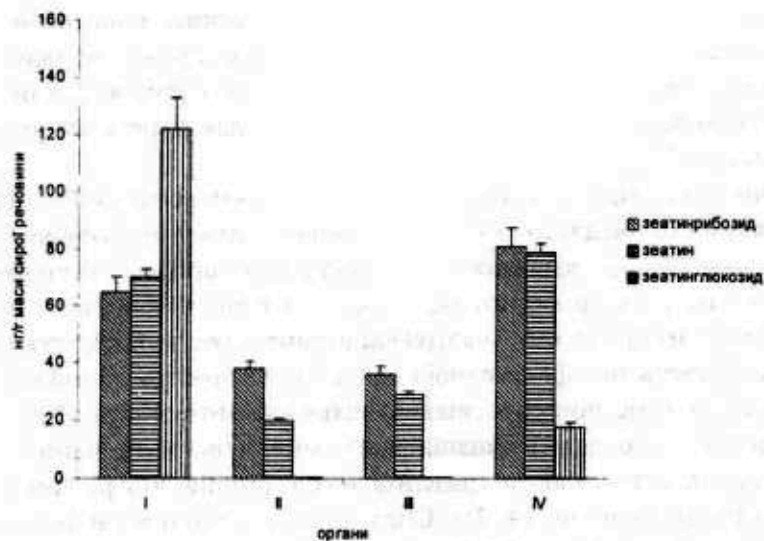


Рис. 2. Вміст цитокінінів в органах *Ph. vulgaris* на початку цвітіння: I — трійчастий листок біля суцвіття, II — міжвузля біля суцвіття, III — квітки, IV — корінь

Fig. 2. Cytokinins content in *Ph. vulgaris* organs at the beginning of flowering: I — trifoliate leaf near inflorescence, II — internode near inflorescence, III — flowers, IV — roots

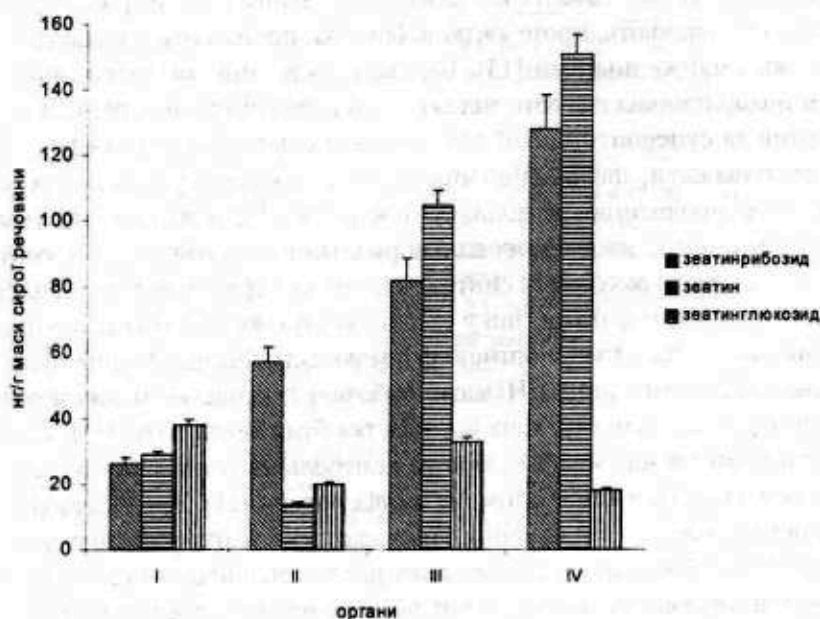


Рис. 3. Вміст цитокінінів в органах *Ph. vulgaris* у період запилення квіток та початку закладання плодів: I — трійчастий листок біля суцвіття, II — міжвузля біля суцвіття, III — квітки після запилення, IV — корінь

Fig. 3. Cytokinins content in *Ph. vulgaris* organs at the stage of pollination and fruit setting: I — trifoliate leaf near inflorescence, II — internode near inflorescence, III — flowers after pollination, IV — roots

перших стадіях проростання [24]. Це можна пояснити припиненням ростових процесів та зниженням мітотичної активності у вегетативних органах. Як відомо, великий вміст цитокинінів характерний саме для тканин з високим мітотичним індексом, де ці гормони виступають регуляторами клітинного циклу [3].

Зміни концентрації цитокинінів вказують, на яких саме етапах підвищується їх значущість або для яких процесів вони є лімітуючим фактором. Як видно на рисунках 1—3, розвиток репродуктивних органів супроводжується збільшенням у них рівня цитокинінів, що свідчить про участь останніх в управлінні цим процесом. Аналізуючи отримані результати, можна припустити, що формування флоральної меристеми у фотоперіодично нейтральних рослин квасолі не потребує значної кількості цитокинінів. З літературних даних відомо, що диференціація апікальної меристеми пагонів вимагає, найімовірніше, локального градієнта цих гормонів або різного розподілу метаболітів цитокинінів [14, 25]. Справді, як показано в нашій роботі, концентрації різних форм цитокинінів змінюються дещо по-різному: якщо у бутонах переважав зеатинрибозид, то в запилених квітках — зеатин, змінювалося також співвідношення активних та іммобільної форм (зеатин+зеатинрибозид/зеатинглюкозид). Нерівномірність розподілу окремих цитокинінів в органах квасолі на стадії бутонізації була продемонстрована раніше [16]. У ході розвитку рослин томатів концентрації зеатину і зеатинрибозиду в ксилемному соці варіюють, проте квіткові бруньки починають закладатися, коли вони стають майже рівними [13]. Бернье вважає, що дія цитокинінів у репродукційному процесі є строго залежною від певної концентрації, а будь-які відхилення та супероптимальні дози справляють інгібіторний ефект [9].

Слід зауважити, що підвищення рівня цитокинінів у запилених квітках збігається зі збільшенням їх кількості в коренях. Це наводить на думку, що вміст цих гормонів, необхідних для нормального перебігу репродуктивного процесу, зростає за рахунок їх синтезу в коренях і транспорту по ксилемі. Це підтверджується тим фактом, що у стеблі (міжвузлях) домінував зеатинрибозид, який вважається транспортною формою цитокинінів. Раніше було показано можливість транспорту [³H]зеатинрибозиду із ксилемним соком до квіток і насіння у рослин люпину, хоча його частка була невеликою [21]. Беверидж зі співавторами вважає малоімовірним контроль цвітіння у гороху цитокинінами, що рухаються з ксилемним соком від кореня [11]. Але в період активізації яйцеклітини та її запліднення вміст зеатину і зеатинрибозиду у зав'язях пшениці та кульбаби зростає декілька разів і, найвірогідніше, цей процес регулюється гормонами, які надходять від материнської рослини [2]. Найвищі рівні цитокинінів містяться в насінні на ранніх стадіях ембріогенезу, завдяки чому його вважають ділянкою синтезу цитокинінів *de novo* [1]. Проте здатність до автономного синтезу цитокинінів, очевидно, з'являється вже після закладання плодів і початку їх розвитку [23]. За сучасними уявленнями, репродуктивний процес у квіткових рослин контролюється не тільки гормональною

системою рослини в цілому, а й підсистемами, локалізованими в різних органах (коренях, стеблі, листках, квітках) [2]. У рослин квасолі на стадії репродукції для цитокинінів такою підсистемою, напевно, є корені. Зіставляючи отримані нами дані з літературними, можна припустити, що цитокиніни необхідні не стільки для регуляції цвітіння, скільки для запліднення і початку розвитку плодів, і ця підвищена потреба у гормонах задовольняється за рахунок їх транспорту від основного місця синтезу — коренів. Це узгоджується з висновком деяких дослідників про те, що регуляторна роль цитокинінів у формуванні та розвитку репродуктивних органів менш важлива, ніж для вегетативного росту і розвитку рослин [14, 25].

Таким чином, результати аналізу змін просторово-часового розподілу цитокинінів в органах квасолі вказують на те, що процес репродукції контролюється цими гормонами як складовими гормональної системи, яка активується в репродуктивних органах, очевидно, у період запилення квіток і раннього ембріогенезу.

1. Веденичева Н.П., Мусатенко Л.И. Цитокинины в семенах при созревании и прорастании // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1990. — 22, № 4. — С. 327—335.
2. Гусаковская М.А., Блинов А.Н. Пространственное и временное распределение свободной и связанной форм АБК в завязях пшеницы и одуванчика в период активности яйцеклетки // Физиол. раст. — 2006. — 53, № 3. — С. 397—401.
3. Иванова А.Б., Анцыгина Л.Л., Ярин А.Ю. Современные аспекты изучения фитогормонов. Цитокинины // Цитология. — 2001. — 43, № 6. — С. 537—43.
4. 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.
5. Негрецкий В.А. Роль цитокининов в зацветании растений на примере формирования физиологического градиента цветения у фотопериодически нейтрального табака Трапезонд // Доп. НАН України. — 2002. — № 4. — С. 182—186.
6. Полевой В.В. Фитогормоны. — Л.: Из-во Ленингр. ун-та, 1982. — 248 с.
7. Чайлахян М.Х. Генетическая и гормональная регуляция роста, цветения и проявления пола у растений // Физиол. раст. — 1978. — 25, № 5. — С. 952—974.
8. Чайлахян М.Х. Регуляция цветения высших растений // Гормональная регуляция онтогенеза растений. — М.: Наука, 1984. — С. 9—28.
9. Bernier G., Kinet J.-M., Sachs R.M. The physiology of flowering. — Boca Raton (Fla): CRC Press, 1981, V. II. — 231 p.
10. Bernier G., Corbesier L., Perilleux C. The flowering processes: on the track of controlling factors in *Sinapis alba* // Физиол. раст. — 2002. — 49, № 3. — С. 445—450.
11. Beveridge C.A., Murfet I.C., Kerhoas L. et al. The shoot controls zeatin riboside export from pea roots: evidence from the branching mutant *rms 4* // Plant J. — 1997. — 11. — P. 339—345.
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. Davey J.E., Van Staden J. Cytokinin translocation: changes in zeatin and zeatin riboside levels in the root exudate of tomato plants during their development // Planta. — 1976. — 130, N 1. — P. 69—72.

14. Dewitte W., Chiappetta A., Azmi A., Witters A. et al. Dynamics of cytokinins in apical shoot meristem of a day-neutral tobacco during floral transition and flower formation // *Plant Physiol.* — 1999. — 119. — P. 111–121.
15. 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.
16. Hammerton R.D., Nicander B., Tillberg E. Identification of some major cytokinins in *Phaseolus vulgaris* and their distribution // *Physiol. Plant.* — 1996. — 96, N 1. — P. 77–84.
17. Jacquard A., Detry N., Dewitte W., Van Onckelen H.A. et al. In situ localization of cytokinins in the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral transition // *Planta.* — 2002. — 214. — P. 970–973.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Summons R.E., Latham D.S., Gollnow B.I. et al. Cytokinin translocation and metabolism in species of the Leguminosae: studies in relation to shoot and nodule development // *Metabolism and molecular activities of cytokinins* / Ed. by J. Guern, C. Péaud-Lenoël. — Berlin: Springer-Verlag, 1981. — P. 69–79.
22. 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.
23. Van Staden J., Davey J.E. The synthesis, transport and metabolism of endogenous cytokinins // *Plant, Cell and Environment.* — 1979. — N 2. — P. 93–100.
24. Vedenicheva N., Vizarova G., Musatenko L. Cytokinins of maturing and germinating french bean seeds // *Biologia.* — 1991. — 46, N 1. — P. 23–30.
25. Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmylling T. Regulation of plant growth by cytokinin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2001. — 98. — P. 10487–10492.

Рекомендує до друку
Є.Л. Кордюм

Надійшла 12.03.2007

Н.П. Веденичева

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

ЦИТОКИНИНЫ В ОРГАНАХ *PHASEOLUS VULGARIS* L. В РЕПРОДУКТИВНЫЙ ПЕРИОД РАЗВИТИЯ

Изучено распределение цитокининов в листьях, стебле, корнях и цветках фасоли в период репродуктивного развития. Показано уменьшение содержания зеатина и зеатинрибозидов в листьях после начала цветения. В цветках и корнях уровень этих гормонов повышался после опыления. Предполагается, что увеличение концентрации активных форм цитокининов происходит за счет их транспорта из корней и связано с процессом закладки семян и плодов.

Ключевые слова: фасоль, цитокинины, морфогенез, органы, репродуктивное развитие, цветение

V.P. Vedenicheva

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

CYTOKININS IN *PHASEOLUS VULGARIS* L. ORGANS DURING THE REPRODUCTIVE PERIOD OF DEVELOPMENT

Cytokinins distribution in *Ph. vulgaris* leaves, stem, roots and flowers during plants reproductive development was studied. Decrease in zeatin and zeatin riboside content in leaves after flowering beginning was shown. These hormones levels increased after pollination. It can be assumed that increase in active cytokinins concentrations was a result of their transport from roots and was connected with seeds and fruits setting.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, cytokinins, morphogenesis, organs, reproductive development, flowering.