

УДК 577.24: 581.143

**ВПЛИВ ЗЕАТИНУ І БЕТАСТИМУЛІНУ
НА ВМІСТ ФОТОСИНТЕТИЧНИХ ПІГМЕНТІВ І ДНК
В ОНТОГЕНЕЗІ ЛИСТКІВ ЦУКРОВОГО БУРЯКА (*BETA VULGARIS L.*)**

© 2009 р. Н. М. Топчій

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
(Київ, Україна)

Вивчали вплив бетастимуліну і зеатину на динаміку вмісту хлорофілів *a* і *b* та хлоропластної ДНК в листках цукрового буряка (*Beta vulgaris L.*) протягом онтогенезу. В оброблених рослинах спостерігалось підвищення досліджуваних показників функціональної активності асиміляційного апарату.

Ключові слова: *Beta vulgaris L.*, ДНК, зеатин, бетастимулін, хлорофіл

Хлоропласти є внутрішньоклітинними органелами рослин, які містять цілісний ензиматичний комплекс для процесу фотосинтезу. Як відомо, рослинні клітини містять два геноми: ядерний і пластомний (мітохондріальний та хлоропластний). Нині досить актуальним є питання дослідження структури хлоропластного геному та його взаємодії з іншими геномами у клітині.

До складу хлоропластного геному входить хлоропластна ДНК, стан і кількість якої впливає на його функціонування. Відомостей про те, яку роль відіграє цей геном в молекулярно-генетичних процесах, в тому числі, в старінні рослинних клітин і в організмі в цілому поки що недостатньо (Cullics et al., 2009; Ravi et al., 2008; Woodson, Chory, 2008; Xiong et al., 2009).

Цукровий буряк є важливою стратегічною культурою нашої держави. Для підвищення його продуктивності досить актуальним є гальмування процесів старіння листків, продовження тривалості їх життя. Як відомо, процеси старіння виникають у рослин на молекулярному рівні, задовго до візуального їх прояву (Бердишев та ін., 2007; Тищенко та ін., 2001; Топчій, 2001; Jones, 2001; Rennell, Lamb, 1997). Вікові зміни структури ядерного і хлоропластних

геномів, їх взаємодія протягом старіння на даний час на вищих рівнях організації майже не вивчені. Є невелика кількість розрізнених експериментальних даних і припущень (Бердишев та ін., 2007; Cullics et al., 2009; Jones, 2001; Woodson, Chory, 2008). Проте, без спеціальних досліджень вікових змін компонентів хлоропластного геному неможливо зрозуміти на генетичному рівні механізми старіння рослин.

На даний час старіння листка – спеціалізованого фотосинтетичного органу – розглядається як форма запрограмованої загибелі клітин (ЗЗК) (Бердишев та ін., 2007; Тищенко та ін., 2001; Jones, 2001; Mittler et al., 1997; Rennell, Lamb, 1997). Головним молекулярно-генетичним критерієм незворотного переходу клітин на шлях загибелі є порушення полімерності молекул ДНК.

Збільшення продуктивності культурних рослин, зокрема, цукрового буряка, можна досягти за допомогою стимуляції фізіологічних процесів регуляторами росту рослин (PPR). До таких препаратів належать бетастимулін та зеатин. Встановлений позитивний їх вплив на продуктивність цукрового буряка в Україні (Сакало, Курчий, 2007; Сакало и др., 2001). Ці препарати використовуються в мікродозах як при обприскуванні посівів (5-15 мл/га), так і при інкрустації насіння (10-20 мл/т) (Сакало, Курчий, 2007; Сакало и др., 2001).

Мета даної роботи – дослідити динаміку кількості хлорофілів *a* і *b* та хлоропластної ДНК

Адреса для кореспонденції: Топчій Наталія Миколаївна, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, Київ-33, 01033, Україна
e-mail: topchiy_nataliya@univ.kiev.ua

(хпДНК) в листках цукрового буряка; вивчити вплив бетастимуліну і зеатину на ці показники протягом онтогенезу.

МЕТОДИКА

У роботі використовували листки рослин цукрового буряка (*Beta vulgaris L.*) 1-го року вегетації сортів Білоцерківський однонасінний-45 та Уладівська однонасінна-35. Вони обидва є диплоїдними, урожайно-цукристого напрямку, виведені методом індивідуально-групового добору, відрізняються вищою стійкістю до захворювань листків та цвітущості порівняно зі стандартами. Рослини вирощували в умовах вегетаційних дослідів у 16-кілограмових посудинах з темно-сірим опідзоленим ґрунтом при природному освітленні.

Рослини оброблялися фізіологічно активними речовинами – зеатином (1×10^{-6} моль/л) і бетастимуліном (4×10^{-5} моль) в період формування 6-8-го листків (перед початком процесів накопичення цукру). Як контроль використовували необроблені рослини.

Вміст хлорофілу *a* і *b* в листках визначали безмацераційним методом після екстракції висічок певної маси і площі диметилсульфоксидом (ДМСО) (Hiscox, Izraelstam, 1979). Коефіцієнти екстинції вимірювали за довжини хвилі 645, 652 і 663 нм на спектрофотометрі «М-40» («Carl Zeiss», Jena).

хпДНК виділяли методом Трібоуша (Triboush et al., 1998). Якість препаратів ДНК визначали за спектральними показниками на спектрофотометрі «М-40» («Carl Zeiss», Jena). Кількість ДНК (С) (у мг/г сирової речовини) розраховували за формулою:

$$C = (A_{260} - A_{280}) \times 10,1 \times V / 19, \text{ де}$$

A_{260} і A_{280} – оптична густина при 260 і 280 нм, відповідно,

10,1 – перерахунковий коефіцієнт,

V – об'єм екстракту,

19 – питома густина екстинції.

У таблиці представлені середні значення з трьох біологічних повторень. Достовірність різниці отриманих результатів оцінювали з використанням критерію Стьюдента.

У роботі використовувались реактиви фірми «Serva» (Німеччина).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У таблиці представлені результати досліджень впливу обробки цукрового буряка в період утворення 6-8-го листків бетастимуліном і зеатином на динаміку вмісту фотосинтетичних пігментів та кількості хпДНК.

Бетастимулін і зеатин стимулювали утворення хлорофілу *a* і *b* і стримували його руйнування протягом вегетації у рослин обох сортів, причому більшу активність виявляв бетастимулін. Наприкінці вегетації вміст хлорофілу *a* під впливом бетастимуліну був приблизно в 1,3, а зеатину – в 1,2 раза більшим, ніж у контролі.

Вміст хлорофілу *b* був більшим протягом всього онтогенезу листків у варіантах з використанням РРР. Зокрема, значне збільшення цього показника (приблизно в 1,4 раза) було зареєстроване наприкінці вегетації у варіанті з бетастимуліном для обох сортів. При порівнянні результатів видно, що досліджувані показники контрольних та оброблених рослин були вищими у сорту Уладівська однонасінна-35.

РРР виявляли позитивний вплив на вміст хпДНК протягом онтогенезу листків. Як видно з таблиці, вміст ДНК був досить високим протягом вегетації. У міру старіння листків, зменшення кількості хлорофілу супроводжувалося зменшенням кількості хпДНК. Але за впливу бетастимуліну наприкінці вегетативного періоду її вміст був приблизно в 1,5 і 1,4 раза вищим від контролю у листках рослин сортів Уладівська однонасінна-35 і Білоцерківський однонасінний-45, відповідно.

З літературних джерел відомо, що для більшості рослинних клітин кількість хпДНК може складати 1-10 % від сумарної ДНК (в одному хлоропласті може бути декілька десятків молекул хпДНК) (Антонов, 2000).

У листках деяких вищих рослин, великих за розміром, значну частину сумарної ДНК може складати хлоропластна ДНК (її майже вдвічі більше, ніж ядерної), що пов'язане з великою кількістю хлоропластів, в яких містяться сотні копій хпДНК. У середніх листках кількість хпДНК може бути такою самою, як і ядерної, а в малих – 1/3 всієї ДНК.

Вміст хпДНК у клітині листків шпинату, наприклад, становить $0,91 \times 10^{-12}$ г на 1 г сирової речовини (приблизно 21 % від загальної кількості ДНК), в той час як яДНК – $3,43 \times 10^{-12}$ г на 1 г сирової речовини; у гороху вміст хпДНК складає $1,43 \times 10^{-12}$ г на 1 г сирової речовини (12 % від за-

ТОПЧІЙ

Вміст фотосинтетичних пігментів і кількість хпДНК в листках цукрових буряків

Варіант	мг/г сирової речовини			мг/дм ² сирової речовини			хпДНК, 10 ⁻¹² г/г сирової речовини
	хл. a	хл. b	хл. a+b	хл. a	хл. b	хл. a+b	
Сорт Білоцерківський однопасічний-45							
10.07.07							
Контроль	1,02±0,01	0,28±0,03	1,30±0,02	4,00±0,02	1,00±0,03	5,00±0,01	0,68±0,02
Бетастимулін	1,22±0,02	0,31±0,01	1,53±0,03	4,21±0,04	1,08±0,02	5,29±0,03	0,77±0,01
Зеатин	1,19±0,02	0,30±0,03	1,49±0,01	4,11±0,02	1,05±0,04	5,16±0,01	0,73±0,03
8.08.07							
Контроль	1,45±0,04	0,35±0,02	1,80±0,02	4,54±0,01	1,21±0,04	5,75±0,03	0,82±0,01
Бетастимулін	1,69±0,03	0,40±0,04	2,09±0,03	4,73±0,03	1,38±0,02	6,11±0,01	0,96±0,04
Зеатин	1,59±0,01	0,38±0,03	1,97±0,01	4,54±0,02	1,32±0,01	5,86±0,03	0,92±0,01
5.09.07							
Контроль	0,77±0,03	0,21±0,01	0,98±0,02	3,45±0,03	0,48±0,01	3,93±0,02	0,32±0,01
Бетастимулін	0,98±0,01	0,27±0,03	1,25±0,01	3,75±0,02	0,55±0,02	4,30±0,03	0,44±0,03
Зеатин	0,89±0,01	0,27±0,03	1,16±0,02	3,61±0,05	0,55±0,01	4,16±0,01	0,40±0,05
Сорт Уладівська однопасічна-35							
9.07.08							
Контроль	1,33±0,02	0,32±0,04	1,65±0,01	4,38±0,00	1,18±0,01	5,56±0,01	0,78±0,01
Бетастимулін	1,36±0,05	0,37±0,03	1,73±0,01	4,55±0,02	1,25±0,01	5,80±0,01	0,84±0,01
Зеатин	1,35±0,03	0,37±0,02	1,72±0,00	4,53±0,01	1,25±0,01	5,78±0,02	0,83±0,04
11.08.08							
Контроль	1,47±0,01	0,41±0,01	1,88±0,02	4,74±0,00	1,37±0,04	6,14±0,01	0,82±0,01
Бетастимулін	1,72±0,05	0,49±0,01	2,31±0,01	4,83±0,02	1,47±0,01	6,31±0,01	0,96±0,03
Зеатин	1,67±0,01	0,45±0,02	2,12±0,01	4,79±0,01	1,43±0,03	6,22±0,01	0,92±0,01
5.09.08							
Контроль	0,79±0,01	0,23±0,04	1,02±0,01	3,47±0,02	0,50±0,01	3,97±0,02	0,38±0,01
Бетастимулін	1,01±0,02	0,31±0,01	1,32±0,03	3,77±0,01	0,64±0,00	4,41±0,03	0,55±0,01
Зеатин	0,95±0,01	0,29±0,05	1,24±0,01	3,65±0,01	0,59±0,01	4,24±0,01	0,41±0,00

гальної кількості ДНК) і $10,5 \times 10^{-12}$ г яДНК на 1 г сирової речовини (Антонов, 2000).

Відомо, що протягом росту клітин мезофілу розтягуванням в листках деяких вищих рослин (цукрового буряка, пшениці, гороху) хлоропласти здатні до поділу. Так, в клітинах листків цукрового буряка протягом такого типу росту кількість хлоропластів на 1 г сирової речовини збільшується від 11 до 65 (Антонов, 2000). До того ж, синтезується ще певна кількість хпДНК, на відміну від гороху і шпинату, і загальний вміст її на 1 г сирової речовини збільшується від 1100 до 1900 копій, а число копій геному в хлоропластах зменшується з 104 до 29 (Ravi et al., 2008). Можливо, що зменшення числа копій хлоропластного геному під час поділу хлоропластів і збільшенні їх розміру характер-

не для стадії росту клітин листків вищих рослин.

Денатурація хпДНК під час руйнування хлоропластів, найбільш ймовірно, відбувається в результаті змін в білках, які стабілізують її структуру, і знижують іонні сили. Деградація хпДНК протягом ЗЗК є мало вивченим процесом. Проте, під час ЗЗК, що індукується вірусом тютюнової мозаїки, підвищується вміст мономерних форм хпДНК, яка в нормі є мультимерною (Mittler et al., 1997).

Отже, обробка рослин бетастимуліном і зеатином уповільнювала руйнування хлоропластів і ДНК протягом онтогенезу. Такі ефекти можуть позитивно позначатися на продуктивності. Підвищення виходу цукру за рахунок збільшення маси коренеплодів під

ВПЛИВ ЗЕАТИНУ І БЕТАСТИМУЛІНУ

впливом бетастимуліну для даних сортів було встановлено В.Д. Сакало зі співавторами (Сакало, Курчий, 2007; Сакало и др., 2001).

Таким чином, отримані результати свідчать, що обробка цукрових буряків бетастимуліном і зеатином в період утворення 6-8-го листків продовжувала функціональну активність листків, сприяла підтриманню високого вмісту хлорофілів *a* і *b* та хлДНК протягом онтогенезу.

ЛІТЕРАТУРА

- Антонов А.С. Основы геносистематики высших растений. – М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2000. – 135 с.
- Бердихев Г.Д., Топчий Н.М., Тищенко О.М., Демидов С.В. Зміни структури хроматину протягом старіння. – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – 104 с.
- Сакало В.Д., Курчий В.М. Регуляція углеводного метаболізму ендогенної сахарозой в листях сахарної свеклы // Физиология и биохимия культурных растений. – 2007. – Т. 39, № 6. – С. 506-513.
- Сакало В.Д., Пономаренко С.П., Курчий В.М. Регуляція емистимом С і бетастимуліном метаболізму сахарози і продуктивності сахарної свеклы // Агрехимия. – 2001. – № 10. – С. 49-55.
- Тищенко О.М., Топчий Н.М., Демидов С.В. Фрагментація ДНК при старінні листків цукрового буряка (*Beta vulgaris* L.) // Вісн. Київ. націон. ун-ту ім. Тараса Шевченка. Сер. Біологія. – 2001. – Вип. 33. – С. 22-25.
- Топчий Н.М. Деградація ДНК у процесі старіння листків цукрового буряка (*Beta vulgaris* L.) // Укр. біохім. журн. – 2001. – Т. 73, № 3. – С. 116-120.
- Cullics C.A., Vorster B.J., Van Der Vyver C., Kunert K.J. Transfer of genetic material between the chloroplast and nucleus: how is it related to stress in plants? // Ann. Botany. – 2009. – V. 103. – P. 625-633.
- Hiscox J.D., Izraelstam L.F. A method for the extraction of chlorophyll from leaves tissues without maceration // Can. J. Bot. – 1979. – V. 57, № 12. – P. 1332-1334.
- Jones A. Programmed cell death in development and defense // Plant Physiol. – 2001. – V. 125, № 1. – P. 94-97.
- Mittler R., Simon L., Lam E. Pathogen-induced programmed cell deaths in tobacco // J. Cell Sci. – 1997. – V. 110. – P. 1333-1344.
- Ravi V., Khurana J. P., Tyagi A. K., Khurana P. An update on chloroplast genom // Plant Systematics and Evolution. – 2008. – V. 271. – P. 101-122.
- Rennell R., Lamb C. Programmed cell death in plants // Plant Cell. – 1997. – V. 9, № 7. – P. 1157-1168.
- Triboush S.O., Danilenko N.G., Davydenko O.G. A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower // Plant Mol. Biol. Report. – 1998. – № 16. – P. 183-189.
- Woodson J., Chory J. Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes // Nature Rev. Genet. – 2008. – V. 9, № 5. – P. 383-395.
- Xiong A., Peng R., Zhuang J., Gao F. Gene duplication, transfer and evolution in the chloroplast genome // Biotech. Adv. – 2009. – V. 27. – P. 340-347.

Надійшла до редакції
25.08.2009 р.

INFLUENCE OF ZEATIN AND BETASTIMULIN ON CONTENT OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS AND DNA DURING ONTOGENESIS OF SUGAR BEET (*BETA VULGARIS* L.) LEAF

N. M. Topchiy

Taras Shevchenko Kyiv National University
(Kyiv, Ukraine)

The influence of betastimulin and zeatin on the content of chlorophyll and chloroplast DNA in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves during ontogenesis has been studying. The functional activity of the assimilation complex increased in the treated plants.

Key words: *Beta vulgaris* L., DNA, zeatin, betastimulin, chlorophyll

ТОПЧИЙ

**ВЛИЯНИЕ ЗЕАТИНА И БЕТАСТИМУЛИНА
НА СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ И ДНК
В ОНТОГЕНЕЗЕ ЛИСТЬЕВ САХАРНОЙ СВЁКЛЫ (*BETA VULGARIS L.*)**

Н. Н. Топчий

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
(Киев, Украина)*

Изучали влияние бетастимулина и зеатина на динамику содержания хлорофиллов *a* и *b* и хлоропластной ДНК в листьях сахарной свеклы (*Beta vulgaris L.*) в течение онтогенеза. В обработанных растениях наблюдалось увеличение исследуемых показателей функциональной активности ассимиляционного аппарата.

Ключевые слова: *Beta vulgaris L.*, ДНК, зеатин, бетастимулин, хлорофилл