

## ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ЦИТОКІНІНУ ТА ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ НА СТРУКТУРУ МЕЗОФІЛУ ЛИСТКА ТА МОРФОЛОГІЧНІ ПАРАМЕТРИ РОСЛИН ПШЕНИЦІ

Владислав В. Жук \* та М.М. Мусієнко

**Анотація.** Проведено дослідження структури мезофілу прапорцевого листка озимої пшениці сорту 'Тронка', який вирощували в умовах польового дослідження, методом конфокальної лазерної скануючої мікроскопії. Дослідні рослини були оброблені БАП та  $H_2O_2$  у фазі виходу в трубку. Встановлено, що обробка рослин не впливала на структуру тканин листка пшениці, але посилювала функціональну здатність пігментних комплексів хлоропластів. Показано, що дія екзогенного БАП посилювала аутофлуоресценцію хлорофілу, особливо у клітинах стовпчастого мезофілу, затримувала старіння пігментного комплексу. Дія екзогенного  $H_2O_2$  переважно посилювала флуоресценцію хлорофілу клітин губчастого мезофілу поблизу продихів, але його вплив був менш значим, ніж БАП. У оброблених БАП та  $H_2O_2$  рослин озимої пшениці збільшувалась висота рослин та довжина прапорцевого листка. Обробка рослин БАП підвищувала продуктивність рослин озимої пшениці сорту 'Тронка' переважно за рахунок збільшення кількості зерен у колосі та їх маси.

**Ключові слова:** *Triticum aestivum*, пшениця, мезофіл листка, конфокальна мікроскопія, БАП, пероксид водню

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, Київ, 01601, Україна; \* zhuk\_bas@voliacable.com

### Вступ

Клітини мезофілу листків пшениці здійснюють фотосинтетичну функцію і виконують роль донора асимілятів для репродуктивних органів. В листку пшениці виділяють стовпчастий та губчастий мезофіл, кожна клітина якого містить понад сотню хлоропластів. Біогенез хлоропластів, синтез пігментів і фотосинтетична активність хлоропластів контролюються цитокінінами (ZUBO *et al.* 2008). Хлоропласти є однією з мішеней дії цитокінінів, а відповідь на цитокініни опосередковується експресією ядерних генів, які кодують хлоропластні білки (FEREIRA & KIEBER 2005). Цитокінінові рецепторні кінази здатні сприймати сигнал від ендогенних та екзогенних цитокінінів і тісно взаємодіють з іншими сигнальними системами в рослинах (MOREY *et al.* 2011). Екзогенні цитокініни затримують деградацію пігментного комплексу та хлоропластів, старіння листка.

Хлоропласти є головними продуцентами

активних форм кисню, серед яких найбільш довго живучим і здатним транспортуватись на значні відстані є пероксид водню  $H_2O_2$  (SUZUKI & MITTLER 2006). ASADA (1999) продемонстрував, що ендогенний рівень  $H_2O_2$  обумовлює його функції і регулюється в циклі вода-вода.  $H_2O_2$  генерується в клітинах у відповідь на різні стимули і виконує сигнальні функції у регуляції руху замикаючих клітин продихів (HUNG *et al.* 2002). Екзогенний  $H_2O_2$  здатен дифундувати через мембрани і впливати на фотосинтетичну систему клітини.

Вивчення структури тканин методом конфокальної скануючої мікроскопії дозволяє характеризувати функціональну здатність клітин і пігментного комплексу *in vivo* (ROSHCHINA *et al.* 2005). Аутофлуоресценція хлорофілу у червоній ділянці спектру виявляє локалізацію хлоропластів у клітині і структуру листових тканин.

Метою наших досліджень було вивчення структури мезофілу живих клітин тканин мезофілу листка пшениці та впливу на них екзогенних БАП і  $H_2O_2$ .

### Матеріали і методи дослідження

Рослини озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту 'Тронка' вирощували в умовах польового досліду в Київській області на сірому ґрунті за типовою для зони агротехнікою. Обробку рослин водними розчинами 6-бензиламінопурину (БАП) та пероксиду водню ( $H_2O_2$ , ПВ) в концентрації  $10^{-4}M$ . Вивчення структури мезофілу прапорцевого листка проводили у фазі формування зернівки.

Для дослідження флуоресценції хлорофілу з свіжих листків пшениці за допомогою леза виготовляли зрізи товщиною 40-50 мкм, які монтували на предметне скло в краплині дистильованої води та накривали покривним скельцем. Дослідження проводили за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа LSM510 META («Carl Zeiss», Germany) з використанням об'єктиву LD Plan-Neofluor 40 $\times$ /0,6 Korr (WUMER *et al.* 1999). Для збудження аутофлуоресценції хлорофілу задавали довжину хвилі 543 нм, після чого реєстрували емісії від 560 нм. Результати досліджень препаратів відображались на екрані комп'ютера та зберігались в його пам'яті.

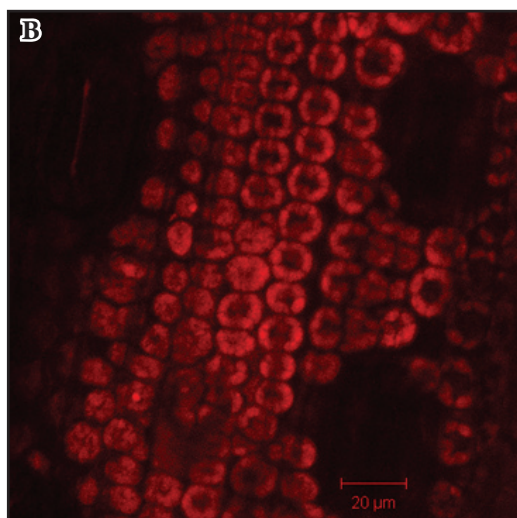
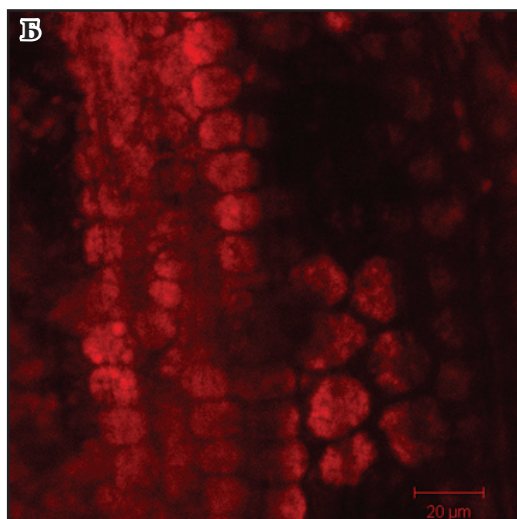
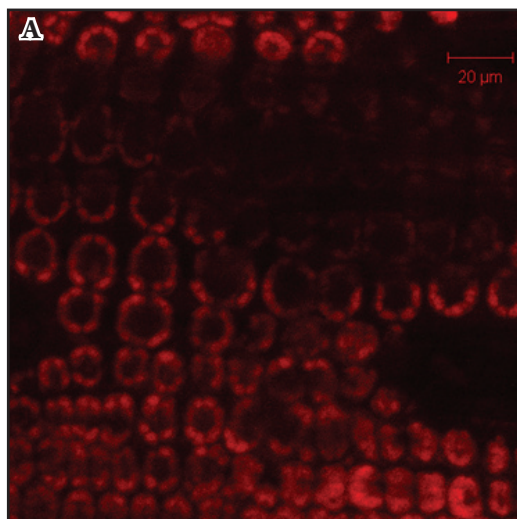
Після дозрівання рослин проводили аналіз структури врожаю. Результати опрацьовували статистично.

### Результати та їх обговорення

Встановлено, що в листках рослин контрольного варіанту клітини мезофілу формували правильні ряди (Рис. 1 А). Клітини стовпчастого мезофілу були розташовані більш щільно, порівняно з клітинами губчастого мезофілу. Хлоропласти у клітинах стовпчастого мезофілу локалізувались

◀ **Рис. 1.** Структура мезофілу прапорцевого листка пшениці сорту 'Тронка' та аутофлуоресценція хлоропластів в умовах польового досліду: А – контроль; Б – БАП; В –  $H_2O_2$ .

◀ **Fig. 1.** Mesophyll structure and chloroplast autofluorescence under field experiment conditions in the last leaf of *Triticum aestivum* cv. 'Tronka': А – control; Б – BAP; В –  $H_2O_2$ .



**Табл. 1.** Вплив БАП та  $H_2O_2$  на морфоструктуру та продуктивність рослин озимої пшениці сорту 'Тронка'.

**Table 1.** The influence of BAP and  $H_2O_2$  on morphological structure and plant productivity of *Triticum aestivum* cv. 'Tronka'.

Висота рослин, см	Довжина прапорцевого листка, см	Кількість колосків в колосі, шт	Кількість зерен в колосі, шт	Маса 1000 зерен, г	Врожайність, ц/га
80,9±0,5	15,5±0,5	17±1	42±1	40,1±0,1	42,7±0,2
86,8±0,6	20,5±0,6	18±1	45±2	47,5±0,1	48,6±0,3
86,3±0,5	19,5±0,5	18±1	43±1	40,2±0,1	43,7±0,2

по периферії і відзначались значнішою флуоресценцією порівняно з клітинами губчастого мезофілу. Відсутність хлорофілу в клітинах продихів надала їм вигляду темних овальних плям на рисунку. Клітини губчастого мезофілу відзначались слабкою аутофлуоресценцією у червоній ділянці спектру.

В клітинах листків, оброблених БАП рослин пшениці аутофлуоресценція хлорофілу була значно більш інтенсивною, ніж у контролі, що свідчить про посилення функції фотосинтетичного апарату (Рис. 1 Б). Екзогенний цитокінін затримував старіння клітин листової пластинки, особливо стовпчастого мезофілу. Значна кількість хлорофілу спричиняла настільки високу активність флуоресценції, що межі окремих клітин не вирізнялись. Інтенсивність червоної флуоресценції клітин губчастого мезофілу зменшувалась ближче до жилки та продихів, межі яких були недостатньо чіткими через значну флуоресценцію хлорофілу сусідніх з ними клітин.

Після дії екзогенного  $H_2O_2$  інтенсивність флуоресценції клітин листового мезофілу посилювалась порівняно до контролю, але була слабкішою, ніж після дії БАП (Рис. 1 В). Інтенсивність флуоресценції клітин губчастого мезофілу була вищою порівняно до клітин стовпчастого, особливо поблизу продихів, які мали вигляд темних овалів. Найвища інтенсивність флуоресценції хлоропластів відзначена по периферії більшості клітин. Аутофлуоресценція клітин, які знаходились поблизу епідермісу, була найбільш слабкою, що свідчить про втрату функціональної здатності фотосинтетичного апарату.

Вивчення морфоструктури рослин після їх дозрівання дозволило встановити, що екзогенна дія БАП та  $H_2O_2$  сприяла збільшенню довжини прапорцевого листка та висоти рослин (Табл. 1). Достовірне збільшення кількості зерен в колосі, маси 1000 зерен та загальної продуктивності посіву відзначено після обробки рослин пшениці сорту 'Тронка' БАП у фазі виходу у трубку. Дія  $H_2O_2$  на продуктивність рослин була слабкою, що свідчить про короточасність його впливу на рослини пшениці.

## Висновки

Дослідження структури клітин мезофілу листків пшениці методом конфокальної мікроскопії дозволило продемонструвати дію екзогенного БАП та  $H_2O_2$  на функціональну здатність пігментного комплексу нативних клітин. Показано, що БАП затримував старіння клітин, значно посилював аутофлуоресценцію хлорофілу у червоній ділянці спектру, що свідчить про високу активність фотосистем. Дія екзогенного  $H_2O_2$  значніше посилювала флуоресценцію клітин губчастого мезофілу, особливо поблизу продихів. Морфологія губчастого та стовпчастого мезофілу за дії БАП та  $H_2O_2$  не змінювалась. Дія екзогенного БАП підвищувала продуктивність рослин озимої пшениці сорту 'Тронка'.

## Використані джерела

ASADA K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 601–639.

- FEREIRA F.J., KIEBER J.J. 2005.** Cytokinin signaling. *Cur. Opin. Plant Biol.* **8**: 518–525.
- HUNG S.-H., YU CH.-W., LIN CH.Y. 2005.** Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **46**:1–10.
- MOREY K.J., ANTUNES M. S., ALBRECHT K. D., BOWEN T.A., TROUPE J.F., HAVENS K.L., MEDFORD J.I. 2011.** Developing a synthetic signal transduction system in plants. *Meth. Enzymol.* **497**: 581–602.
- ROSHCHINA V.V., YASHIN V.A., KONONOV A.V. 2004.** Autofluorescence of developing plant vegetative microspores studied by confocal microscopy and microspectrofluorimetry. *J. Fluores.* **14**:745–750.
- SUZUKI N., MITTLER R. 2006.** Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Plant Physiol.* **126**: 45–51.
- WYMER C.L., BEVEN A.F., BOUDONCK K., LLOYD G.W. 1999.** Confocal microscopy of plant cell. *Methods Mol. Biol.* **122**: 103–130.
- ZUBO Y.O., YAMBURENCO M.V., SELIVANKINA S.Y., SHAKIROVA F.M., AVALBAEV A.M., KUDRYAKOVA N.V., ZUBKOVA N.K., LIERE K., KULAEVA J.N., KUSNETSOV V.V., BORNER T. 2008.** Cytokinin stimulates chloroplast transcription in detached barley leaves. *Plant Physiol.* **148**: 1082–1093.

### THE RESEARCH OF CYTOKININ AND HYDROGEN PEROXIDE INFLUENCE ON THE LEAF MESOPHYLL STRUCTURE AND MORPHOMETRIC PARAMETERS OF WINTER WHEAT

VLADISLAV V. ZHUK \* & M.M. MUSIENKO

**Abstract.** The last leaf mesophyll structure of *Triticum aestivum* cv. 'Tronka' which was grown in the field experiment conditions was investigated by the method of confocal laser scanning microscopy. The experiment plants were treated by BAP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in booting phase. It is established that plant treatment didn't effect on structure of leaf tissues but enhanced the functional ability of chloroplast pigment complexes. It has shown that influence of exogenous BAP enhanced chlorophyll autofluorescence, especially in palisade mesophyll cells, delayed aging of pigment complex. The action of exogenous mainly increased chlorophyll fluorescence of spongy mesophyll near stomata, but its influence was less significant than BAP. In winter wheat plants treated by BAP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plant height and last leaf length enlarged. The plant treatment by BAP increased productivity of *T. aestivum* cv. 'Tronka' mainly by the cost of increasing of corns' quantity in ear and corns' weight.

**Key words:** *Triticum aestivum*, wheat, mesophyll, confocal microscopy, BAP, hydrogen peroxide

Educational and Scientific Center «Institute of Biology» of Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13 Vladymyrska str., Kyiv, 01601, Ukraine; \* zhuk\_bas@voliacable.com