

STUDY OF THE RETARDANT ACTIVITY OF BENZOAT D-(+)-TREO-1-(N-NITROPHENIL)-2-AMINO-1,3-PROPANDIOL ON THE WINTER WHEAT SOWING

The effects of chlorocholinechloride (CCC) and benzoat D-(+)-treo-1-(n-nitrophenil)-2-amino-1,3-propandiol were studied on the sowing of winter wheat. It is found that benzoat D-(+)-treo-1-(n-nitrophenil)-2-amino-1,3-propandiol was less effective in the lodging prevention in comparison with CCC. We have proposed to use of benzoat D-(+)-treo-1-(n-nitrophenil)-2-amino-1,3-propandiol in the mixture with CCC.

Надійшло 01.03.2001

УДК:581.136

В.В. Моргун¹, І.Д. Вологовський², В.С. Кравець¹

¹Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17

²Інститут фотобіології НАН Білорусі

20072 Мінськ, вул. Академічна, 27

ВПЛИВ ХОЛОДОВОГО ШОКУ НА МЕТАБОЛІЗМ ОСНОВНИХ КОМПОНЕНТІВ ФОСФАТИДІЛІНОЗИТОЛЬНОГО ЦИКЛУ

по фосфатиділінозитол, кукурудза, холодний шок, трансдукція сигналів

Дослідження шляхів сприйняття інформації про зміну умов середовища та трансдукції сигналів клітинами дозволяє пізнати механізми реакцій метаболізму на дію багатьох чинників середовища та сформулювати уявлення про шляхи адаптації рослин [1–3]. Сприйняття сигналів довкілля відбувається за допомогою рецептора, що локалізований на зовнішній стороні плазматичної мембрани. Рецептор через G-білок активує $\text{PI}\Phi_2$ -специфічну фосфоліпазу C, фосфоінозидазу. Фосфатиділінозитол 4,5-біфосфат, який є компонентом цитозольної мембрани, таким чином, може гідролізуватися до інозитол 1,4,5-трифосфату ($\text{Ins}(1,4,5)\Phi_3$) та діацилгліцеролу (ДАГ) [3, 10].

Кожний з цих метаболітів є потенційним вторинним месенджером, що ініціює каскад метаболічних подій. $\text{Ins}(1,4,5)\Phi_3$ здатний мобілізувати кальцій з внутрішньоклітинних депо та обумовлювати підвищення його рівня в цитозолі [14]. Посилення гідролізу $\text{PI}(4,5)\Phi_2$ внаслідок якого відбувається утворення діацилгліцеролу та $\text{Ins}(1,4,5)\Phi_3$, спостерігається в багатьох клітинах різних типів як відгук на різноманітні дії, що включали передачу сигналів при дії світла, гормонів, факторів росту та в процесі запліднення китин [2]. Перше повідомлення про те, що $\text{Ins}(1,4,5)\Phi_3$ здатний звільнювати іони Ca^{2+} з внутрішньоклітинних запасних пулів у рослинних клітинах, було зроблено у роботах Дробак та Фергюсон [9].

На сьогодні відомо чимало робіт які містять докази того, що PI -система може залучатись до перетворення широкого кола сигналів у клітинні відгуки у вищих рослинах та водоростях. Експерименти свідчать [1–4, 7–12] спостерігали швидкі зміни метаболізму інозитолових фосфоліпідів у клітинах галотолерантної водорості *Dunaliella salina* при дії гіперосмотичного шоку. Зниження рівня фосфоінозитидів із відповідним зростанням кількості інозитолфосфатів спостерігали у клітинах протонеми моху *Ceratodon purpurea* у відповідь на опромінення червоним світлом [12]. Відомо, що рецептором червоного світла у клітинах рослин є фітохром, який контролює такі процеси як проростання насіння, формування пагонів, зацвітання, синтез пігментів, біогенез органел.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були етіоловані паростки кукурудзи (*Zea mays* L.) гібриду Колективний 95 М. Для дослідження реакції ПФІ-компонентів на дію холодового шоку паростки кукурудзи вирощували за температури +25°C протягом 4-х діб. Колеоптилі та листки мітили шляхом інкубації у розчині [³²P]-ортофосфату з активністю 6,6 МБк на 1 г тканин протягом 18 год за температури +25°C [1]. Обробіток холодом (+10°C) здійснювали у тріс/НСІ (рН 7.2) буфері. Фіксацію матеріалу здійснювали рідким азотом. Виділення загальних ліпідів проводили за методом Фолча [1]. Після хроматографії фосфоліпіди проявляли у парах йоду й ідентифікували за допомогою стандартних розчинів фосфоліпідів. Ліпіди мінералізували за температури +200°C протягом 40 хв і їх вміст визначали за фосфором. Для виділення поліфосфатидилінозитолів була використана модифікована методика на основі методів Чо із співавт. [2].

Для вивчення якісного та кількісного складу полярних ліпідів застосовували метод тонкошарової хроматографії, який описано раніше [1]. Для розподілу сумарних ліпідів на класи використано метод двомірної хроматографії [1]. Ідентифікацію плям ліпідів здійснювали за допомогою речовин-стандартів.

Після розділення у вищезазначених системах розчинників пластинки з [³²P]-міченими фосфоліпідами та фосфатидилінозитольною фракцією аналізували методом авторадіографії на рентгенівській плівці. Кількісну активність зразків визначали методом сцинтиляційного рахунку на рідинному сцинтиляторі Рас-Вепа (Фінляндія) з сцинтиляційною рідиною ЖС-7. Кількість загальних фосфоліпідів та їх окремих класів визначали за неорганічним фосфором.

Результати досліджень та їх обговорення

Вивчення механізмів первинної реакції рослини на дію зовнішніх ефекторів протягом останнього десятиріччя дозволило прояснити загальну структуру основних шляхів сприйняття, трансформації та реалізації зовнішньоклітинної інформації, які виявились універсальними для еукаріотичних організмів. Вивчення дії низької температури на метаболізм основних компонентів фосфатидилінозитольного циклу дозволяє з'ясувати первинні реакції метаболізму рослини та поглибити уявлення про механізми адаптації клітини до дії факторів середовища. Метою наших досліджень було вивчення чутливості метаболізму поліфосфатидилінозитолів рослини до різкого пониження температури середовища.

Результати експериментальних досліджень показали, що вміст ФІ(4)Ф та ФІ(4.5)Ф₂ в клітинних тканинах колеоптилів 4-добових етіолованих проростків кукурудзи становить 25,9 нМ та 7,1 нМ на 1 г сухої речовини, відповідно, що складає 0,3 % та 0,07 % загальної кількості фосфоліпідів або 4,5 % та 1,2 % фосфоінозитидів, відповідно.

Отримані нами показники вмісту ФІ(4)Ф та ФІ(4.5)Ф₂ узгоджуються з даними, які продемонстровані іншими дослідниками, зокрема у тканинах рухових органів листків *Sambuca racemosa* вміст ФІФ та ФІФ₂ (визначення за неорганічним фосфором) становив 0,3 % та 0,02 % загальної кількості фосфоліпідів, відповідно [8]. За даними Муннік з співавт., які визначали вміст ФІФ та ФІФ₂ у пелюстках гвоздики за допомогою [³²P]н із введенням мітки протягом 53 год, він складає 0,45 % та 0,013 % загальної кількості фосфоліпідів, відповідно, та молярне співвідношення ФІ:ФІФ:ФІФ₂ становило 385:35:1 [15]. За нашими даними молярне співвідношення ФІ:ФІФ:ФІФ₂ становило 78:4:1.

Аналіз експериментальних робіт з дослідження фосфатидилінозитольного сигнального механізму дозволяє зробити висновок, що ФІ-сигнальна система залучається до первинних реакцій клітин живих організмів на дію зовнішніх факторів. Спостереження вказують на те, що реакція компонентів ФІ шляху при дії різних чинників відрізняється за часом відповіді [1, 4]. За результатами попередньої роботи нами не було виявлено достовірних змін компонентів фосфатидилінозитольної системи, які ми вивчали при дії холодового стресу (+10°C) на колеоптилі проростків кукурудзи у проміжку часу до 3-х хвилин. Тому для подальшого дослідження ми обрали часові проміжки 5, 10, 20 хвилин низькотемпературної дії. Нами було вибрано тканини колеоптилів, оскільки на цій стадії розвитку кукурудза найчастіше зазнає впливу холодового стресу.

Дослідження отриманих хроматограм виявило високий рівень включення фосфору у фосфатидилетаноамін (ФЕА) та фосфатидилхолін (ФХ). Дещо нижчий рівень включення фосфору було відмічено у фракції фосфатидилгліцеролу (ФГ) порівняно до ФЕА та ФХ. Досить помітний рівень радіоактивності зареєстровано у фракціях фосфатидилсерину (ФС), фосфатидилінозитолу (ФІ) та фосфатидної кислоти (ФК). Серед фракцій поліфосфатидилінозитолів виявлено включення мітки до фосфатидилінозитолфосфату (ФІФ) та фосфатидилінозитолбіфосфату (ФІФ₂).

Різде охолодження колеоптилів кукурудзи протягом 5-20 хвилин за температури +10°C не викликало достовірної зміни активностей у фракціях загальних фосфоліпідів (рис. 1). У той час як дані радіоавтографічного аналізу та сцинтиляційного рахунку фракцій поліфосфатидилінозитолів (рис. 2) показали, що через 5 хвилин дії холодового шоку +10°C на тканини колеоптилів кукурудзи відбувалось зростання рівня [³²P]ФІФ₂, яке супроводжувалось різким зниженням його вмісту через 10 хвилин дії низької температури. Подальше витримування тканин рослин за температури +10°C протягом 20 хвилин обумовило зростання кількості включення мітки у ФІФ₂ (рис.2).

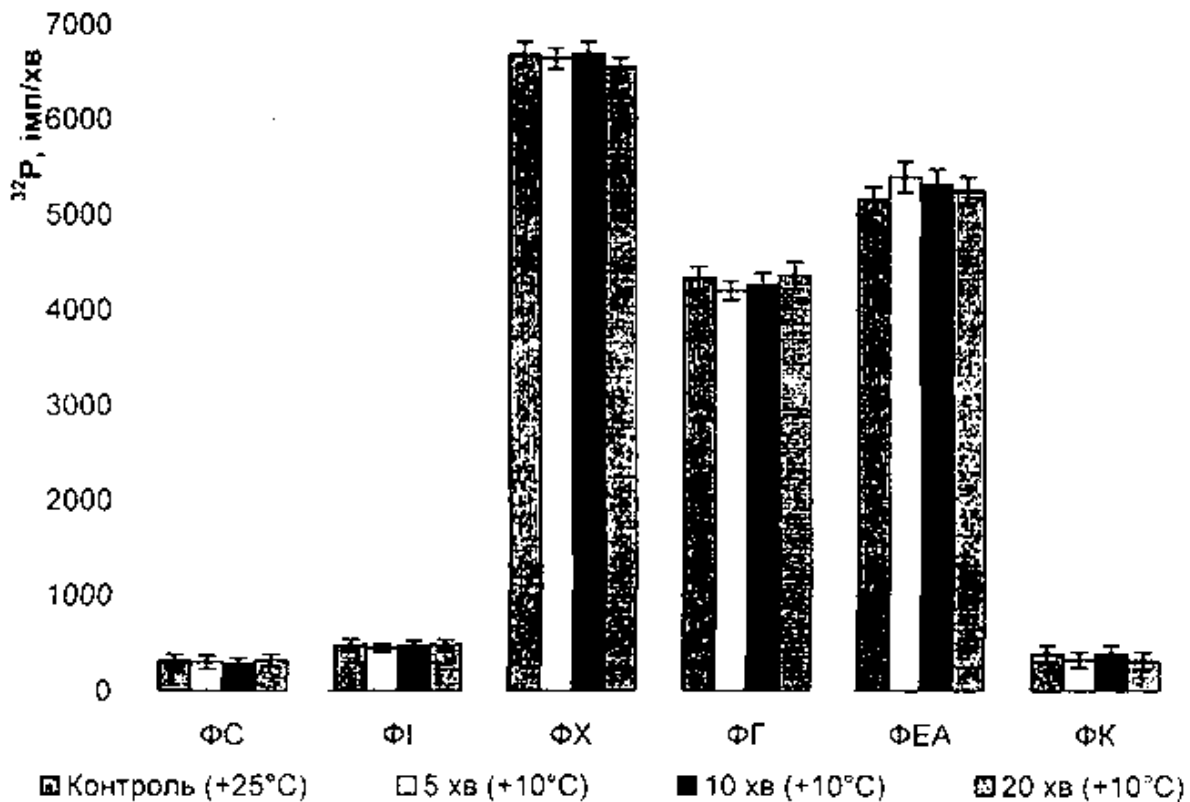


Рис. 1. Вміст ³²P у загальних фосфоліпідах колеоптилів кукурудзи при дії холодового стресу

Зміни рівня [³²P]ФІФ мали характер аналогічний до ФІФ₂: збільшення через 5 хвилин низькотемпературної дії, різке зменшення через 10 хвилин та наступне збільшення через 20 хвилин. Аналогічність поведінки ФІФ та ФІФ₂, яка спостерігається при дії низькотемпературного стресу на клітини колеоптилів кукурудзи, була відмічена також при вивченні реакції обміну поліфосфатидилінозитолів у відповідь на дію інших ефекторів [14].

Отримані нами результати свідчать про чутливість компонентів фосфатидилінозитольного пулу до різкої зміни температури середовища і вказують на можливість їх участі у сприйнятті і передачі інформації в клітинах рослин про зміну умов середовища. Зниження рівня ФІФ і ФІФ₂ (рис. 2) обумовлює збільшення рівня Іпз(1,4,5)Ф₃ [1] при дії низькотемпературного стресу та вказує на те, що холодний шок викликає активацію ПФІ-специфічної фосфоліпази С в клітинах колеоптилів кукурудзи, яка призводить до гідролізу ФІФ₂ та ФІФ. Внаслідок гідролізу ФІФ₂ відбувається утворення молекул вторинних месенджерів -- Іпз(1,4,5)Ф₃ (рис. 1.4) та ДАГ, які перетворюють дію низькотемпературного стимулу у клітинній відповіді на молекулярному рівні. Зокрема, встановлено, що Іпз(1,4,5)Ф₃ стимулює звільнення іонів Ca²⁺ з вакуолей у рослин [13]. На користь такої інтерпретації свідчать останні дослідження із

використанням генетично-трансформованих рослин [13]. Отримані докази залучення $\text{Inz}(1,4)\text{P}_2$ до контролю клітинного метаболізму [16].

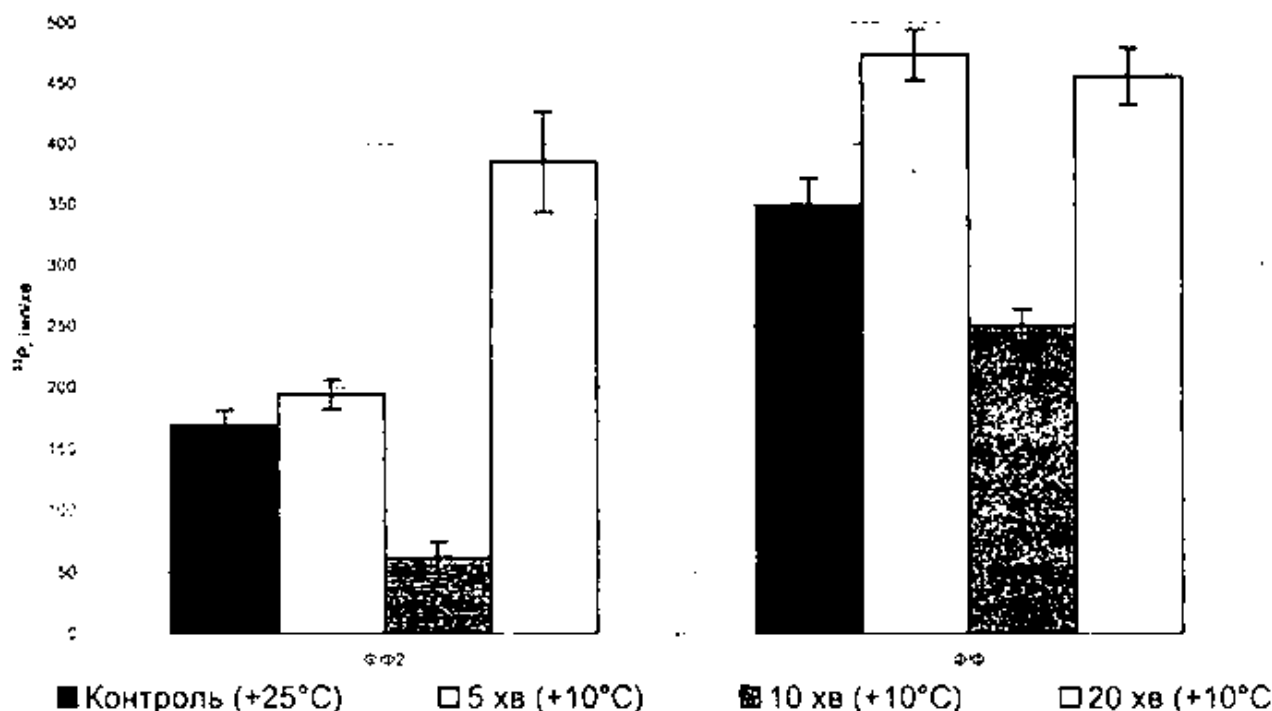


Рис. 2. Вплив низькотемпературного стресу на динаміку вмісту PI_2 і PI у колевонтилях 4 добових етіолованих паростків кукурудзи

Результати наших досліджень, дозволяють зробити висновок про те, що саме поліфосфатиділінозитолі є тими компонентами, які беруть участь у початкових етапах сприйняття низькотемпературного сигналу рослинними клітинами. Загальні пули інших фосфоліпідів не зазнають змін у цей проміжок часу, а отже безпосередньо не залучаються до первинних процесів. Однак, ці дані не заперечують проходження процесу фосфорилування PI під дією PI -кінази для утворення PI_2 . Таким чином, отримані нами результати свідчать про чутливість метаболізму PI та PI_2 до короткочасного охолодження тканин рослин на відміну від метаболізму основних фосфоліпідів.

Отримані нами результати свідчать про те, що холодовий шок призводить до зменшення вмісту основних компонентів фосфатиділінозитольного сигнального шляху (PI та PI_2) в клітинах проростків кукурудзи.

Висновки

Отже, одержані нами результати дозволяють висловити припущення, що зміни вмісту PI та PI_2 обумовлені активацією PI -специфічної ФЛС при дії холодового шоку, можуть свідчити про участь фосфатиділінозитольної системи у сприйнятті низькотемпературного впливу та запуску реакцій клітинної відповіді на дію холоду.

ЛІТЕРАТУРА

1. Кравець В.С. Особливості метаболізму злаків при дії низьких температур на рослини: Автореф. дис. д-ра біол., 1999. — 34 с.
2. Berridge M.J. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers // *Ann. Rev. Biochem.* -- 1987. -- Vol. 56. — P. 159-193.
3. Boss W.F. Phosphoinositide metabolism: its relation to signal transduction in plants // *Second messengers in plant growth and development.* New York: Alan R. Liss, Inc. — 1989. — P. 29-56.
4. Bukolova T.P., Volovik N.V., Kravets V.S. A possible role of phosphatidylinositols in transduction of temperature signal in winter cereals // *Biol. Plant.* — 1994. — Vol. 36. — P. 45.
5. Bush D.S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* — 1995. -- Vol. 46. — P. 95-122.

6. Cho M.H., Shears S.B., Boss W.F. Changes in phosphatidylinositol metabolism in response to hyperosmotic stress in *Daucus carota* L. cells grown in suspension culture // *Plant Physiol.* --- 1993. — Vol. 103, № 2 — P. 637-647.
7. Cho M.N., Chen Q., Camellia M.O., Boss W.F. Separation and quantitation of [³H]inositol phospholipids using thin-layer chromatography and a computerized 3H imaging scanner // *LC/GC.* 1992. — Vol. 10, № 6. — P. 464-468.
8. Cote G.G., De Pass A.L., Quarmby L.M. et al. Separation and characterization of inositol phospholipids from pulvini of *Samanea saman* // *Plant Physiol.* — 1989. --- Vol. 90, № 4. — P. 1422-1428.
9. Drobak B.K., Ferguson I.B. Release of Ca²⁺ from plant hypocotyl microsomes by inositol-1,4,5-trisphosphate // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* --- 1985. — Vol. 130. — P. 1241-1246.
10. Drobak B.K., Ferguson I.B., Dawson A.P., Irvine R.F. Inositol-containing lipids in suspension cultured plant cells // *Plant Physiol.* — 1988. — Vol. 87, № 1. — P. 217-222.
11. Einspahr K.J., Peeler T.C., Thompson G.A. Metabolism of inositol phospholipids in response to osmotic stress in *Dunaliella salina* // *Biological Role of Plant Lipids.* --- Budapest: Akademiai Kiado. — 1989. — P. 543-544.
12. Hartmann E., Pfaffmann H. Phosphatidylinositol and phytochrome-mediated phototropism of moss protonemal tip cells // *Inositol metabolism in plants* / Ed. D.J. Moore, W.F. Boss, F.A. Loewus eds. — New York: Wiley-Liss. — 1990. — P. 259-276.
13. Knight H., Trewavas A.J., Knight M.R. Cold calcium signalling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation // *Plant Cell.* --- 1996. — № 3. — P. 489-503.
14. Lee Y., Choi Y.B., Suh S. et al. Abscisic acid-induced phosphoinositide turnover in guard cell protoplasts of *Vicia faba* // *Plant Physiol.* — 1996. — Vol. 110, № 3. — P. 987-996.
15. Munnik T., Musgrave A., de Vrije T. Rapid turnover of polyphosphoinositides in carnation flower petals. *Planta.* --- 1994. — Vol. 193, № 1. — P. 89-98.
16. Tucker E.B. Inositol bisphosphate and inositol trisphosphate inhibit cell-to-cell passage of carboxyfluorescein in staminal hairs of *Setcreasea purpurea* // *Planta* --- 1988. — Vol. 174. — P. 358-363.

V.V. Morgun, I.D. Volotovskiy, V.S. Kravets

COLD-SHOCK INFLUENCE ON METABOLISM OF MAIN COMPONENT OF PHOSPHATIDYLINOSITOL CYCLE

The susceptibility of polyphosphatidylinositols metabolism to sharp decreasing of environment temperature was studied. It was shown that the rapid cooling of the maize coleoptiles during 5-20 minutes at +10°C didn't cause the reliable changes in the radioactivity amount of the general phospholipids fractionst (PC, PEA, PG, PS, PI, PA). At the same time we have detected the sharp decrease amounts of the radioactive compounds that corresponded to PIP and PIP₂. The results show that polyphosphatidylinositols take part in the transduction of low temperature signal into the plant cells.

Надійшло 12.02.2001

УДК 581.13:631.847.21 + 633.31/37

С.В. Пига¹, Н.М. Олійник¹, І.З. Кернична²

¹ Тернопільський державний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка
46027 Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2

² Бучнівська ЗОШ І-ІІІ ступенів Тернопільського району
47730 Тернопільська обл., Тернопільський р-н, с. Бучнів

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ПРОЦЕСІВ АЗОТОФІКСАЦІЇ І ФОТОСИНТЕЗУ В ЛЮПИНІ БІЛОМУ АЛКАЛОЇДНОЇ ФОРМИ

бутьбочки, азотфіксуювальна активність, пігменти, люпин

Бобові культури у симбіозі з бульбочковими бактеріями здатні засвоювати молекулярний азот атмосфери. Крім цього, рослини вбирають із ґрунту нітратну, нітритну, аміачну форми азоту та сполуки вуглецю. Засвоєння вуглецю й азоту із субстратів живлення вимагає участі енергії