

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОТАНИКИ  
им. В.Ф. КУПРЕВИЧА НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
БЕЛАРУСИ»**

УДК 581.14: 581.19

**ВЕРШИЛОВСКАЯ  
Ирина Вацлавовна**

**РОЛЬ ЦИТОКИНИНОВ И ГЕМА В РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА  
5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ТЕТРАПИРРОЛОВ  
В РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ**

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук  
по специальности 03.00.12 – физиология и биохимия растений

**Минск, 2008**

Работа выполнена в лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

Научный руководитель: **Аверина Наталия Георгиевна**,  
доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник лаборатории  
биофизики и биохимии растительной  
клетки ГНУ «Институт биофизики и  
клеточной инженерии НАН Беларуси»

Официальные оппоненты: **Юрин Владимир Михайлович**,  
доктор биологических наук, профессор,  
заведующий кафедрой физиологии и  
биохимии растений биологического  
факультета Белорусского государственного  
университета

**Кабашникова Людмила Федоровна**,  
доцент, кандидат биологических наук,  
заведующая лабораторией прикладной  
биофизики и биохимии ГНУ «Институт  
биофизики и клеточной инженерии НАН  
Беларуси»

Оппонирующая организация: ГНУ «Институт биоорганической химии  
НАН Беларуси»

Защита состоится «30» апреля 2008 г. в 10<sup>00</sup> часов на заседании Совета по  
защите диссертаций Д 01.38.01 в ГНУ «Институт экспериментальной  
ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси» по адресу: 220072, г. Минск,  
ул. Академическая, 27.

E-mail: [exp-bot@biobel.bas-net.by](mailto:exp-bot@biobel.bas-net.by), тел/факс: (017) 284-18-53

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной  
библиотеке им. Я. Коласа НАН Беларуси.

Автореферат разослан «26» марта 2008 г.

Ученый секретарь

Совета по защите диссертаций  
кандидат биологических наук



Сосновская Т.Ф.

**ВВЕДЕНИЕ**

Раскрытие механизмов гормональной регуляции метаболизма растений является одной из центральных задач физиологии, биохимии и молекулярной биологии, поскольку весь жизненный цикл растений, начиная от момента прорастания и заканчивая их отмиранием, контролируется фитогормонами. Фитогормоны цитокинины (ЦК) участвуют в регуляции ряда физиологических процессов, определяющих рост и развитие растений, включая клеточное деление, инициацию прорастания семян, старение листьев, фотоморфогенез, апикальное доминирование и др. [Mok et al., 1994]. Ускорение под действием ЦК накопления Хл [Fletcher et al., 1971; Кулаева, 1973], по крайней мере, частично обусловлено стимуляцией синтеза его первого предшественника, молекул 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) [Fletcher et al., 1973; Masuda et al., 1995; Bougri et al., 1996], и активацией экспрессии гена, кодирующего НАДФН:протохлорофиллидоксиоредуктазу [Kuznetsov et al., 1996; Kuroda et al., 2001]. Вопросы о роли ЦК в регуляции активности двух важнейших ферментов системы синтеза растительных тетрапирролов – Mg-хелатазы (МХ) и Fe-хелатазы (ФХ), а также о гормональном контроле системы биосинтеза гема к началу данного исследования оставались неизученными.

Ингибирование синтеза АЛК экзогенным гемом описано для разных биологических систем. Считается, что в растениях гем, специфически связываясь с N-концевым аминокислотным участком глутамил-тРНК-редуктазы (ГР), ингибирует активность этого регуляторного фермента синтеза АЛК [Vothknecht et al., 1998]. Существуют единичные данные и о роли гема как ко-репрессора в синтезе АЛК-образующих ферментов [Huang et al., 1986], а также как ингибитора глутамил-тРНК-синтетазы [Levican et al., 2007]. Точные механизмы регуляции синтеза АЛК гемом и конкретные мишени для его действия в растениях до сих пор остаются не выясненными. Хуангом и Кастельфранко [Huang et al., 1990] была выдвинута гипотеза о существовании в растениях двух пулов АЛК, участвующих в синтезе Хл и гема соответственно, и разных механизмах регуляции образования этих пулов. В этой связи остается открытым вопрос об особенностях регуляции синтеза АЛК, предназначенной для синтеза геминовых порфиринов.

Данные последних лет указывают на то, что экзогенная АЛК может выполнять функции регулятора роста растений. Изучение механизмов действия АЛК, как физиологически активного соединения, является весьма важным вопросом, имеющим не только теоретическое, но и практическое значение, поскольку АЛК является естественным метаболитом, и, следовательно, экологически безопасна при ее использовании. Известно, что в миллимолярных концентрациях экзогенная АЛК проявляет свойства фотодинамического гербицида [Rebeiz et al., 1984; Аверина и др., 1988], тогда как при более низких концентрациях – оказывает стимулирующее действие на рост и урожайность ряда сельскохозяйственных культур [Hotta et al., 1997; Roy et al., 1998; Watanabe

et al., 2006], повышает защитные свойства растений [Hotta et al., 1998; Nishihara et al., 2003; Yoshida et al., 2004]. Однако исследования физиологической активности низких концентраций АЛК немногочисленны, а данные об их влиянии на рост и развитие зерновых культур практически отсутствуют. Для объяснения природы рострегулирующего действия АЛК Авериной и Яронской [Аверина и др., 1988] была предложена схема использования продуктов катаболизма АЛК в синтезе пуринов в растениях. Согласно этой гипотезе, поступление продуктов катаболизма АЛК в цепь синтеза пуринов могло бы вызывать образование дополнительных количеств ЦК в растительной клетке и, в зависимости от создаваемой в растении концентрации фитогормона, приводить к угнетению, либо стимуляции ростовых процессов. В этой связи представляло значительный интерес проанализировать содержание природных ЦК в растениях, накопивших избыточные количества эндогенной АЛК.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Связь работы с крупными научными программами и темами.** Диссертационная работа выполнялась в рамках ГПОФИ «Функционирование биосистем» по теме «Исследование механизмов действия транс-зеатина на ключевые реакции биосинтеза растительных порфиринов и формирование фотосинтетического аппарата в высших растениях и водорослях» №ГР20003575 (2000–2005 гг.) и «Биорациональные пестициды» по теме «Разработка биорациональных средств защиты растений на основе производных 5-аминолевулиновой кислоты» №ГР20053315 (2005–2008 гг.), а также по грантам БРФФИ «Изучение влияния кинетина на активность геминовой ветви системы биосинтеза порфиринов в корнях проростков ячменя» № БО4М-122, № ГР20042496 (2004–2006 гг.) и «Ядерно-пластидное взаимодействие как ведущий фактор биогенеза хлоропластов. Роль фитогормонов» № БО4Р-136, № ГР20042494 (2004–2006 гг.).

**Цель и задачи исследования.** Цель настоящей работы – выяснить механизмы действия фитогормона цитокининовой природы кинетина (КИН) на ключевые реакции биосинтеза растительных тетрапирролов – Хл и гема; установить роль гема в регуляции синтеза АЛК в нефотосинтезирующей растительной ткани; выявить взаимосвязь метаболизма АЛК и ЦК в растении; выяснить физиолого-биохимические механизмы рострегулирующего действия низких концентраций АЛК на растения ячменя.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**: 1) провести сравнительный анализ влияния КИН на активность системы синтеза АЛК в листьях ячменя дикого типа на разных этапах зеленения растений, в корнях, в белых листьях мутанта ячменя линии *albostrians*, а также в препаратах этиопластов; 2) оценить количество АТФ в этиолированных проростках ячменя, обработанных КИН; 3) определить

содержание ГР, глутамат-1-полуальдегидаминотрансферазы (ГАТ), АЛК-дегидратазы (АЛКД), МХ и S-аденозил-L-метионин:Mg-протопорфирин IX-метилтрансферазы (МТФ) в обработанных КИН этиолированных и зеленеющих проростках ячменя; 4) исследовать влияние КИН на активность АЛКД, МХ, МТФ и ФХ в этиолированных и зеленеющих проростках ячменя; 5) проанализировать количество нековалентно связанного с белками гема в обработанных КИН листьях этиолированных и зеленеющих проростков ячменя, а также в корневой ткани; 6) изучить роль гема в регуляции синтеза АЛК в нефотосинтезирующей ткани; 7) оценить содержание природных ЦК, зеатина и его производных, в листьях и корнях растений, накопивших избыток АЛК; 8) исследовать влияние низких концентраций АЛК (0,12 мМ–1,2 мМ) на морфофизиологические и биохимические показатели, а также на урожайность растений ячменя.

**Объектами** исследования служили растения ячменя *Hordeum vulgare* L. (сорт Гонар), выращенные в лабораторных и полевых условиях, а также мутант ячменя линии *albostrians* (сорт Haisa).

**Предметом** исследования явились системы биосинтеза Хл и гема в обработанных КИН проростках ячменя; особенности функционирования системы синтеза гема в отрезках корней ячменя, обработанных хелатором металлов пиридинового ряда 2,2'-дипиридиллом (ДП); содержание ЦК в проростках ячменя, накопивших повышенный уровень эндогенной АЛК; рост, развитие и урожайность растений ячменя, обработанных на стадии семян низкими концентрациями АЛК.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Стимуляция под действием КИН активности системы биосинтеза Хл в интактных зеленеющих проростках ячменя обусловлена не только увеличением скорости синтеза первичного субстрата – молекул АЛК, но и адекватным повышением активности и содержания ее ключевых ферментов – МХ и МТФ, при этом КИН не оказывает воздействия на активность и содержание АЛКД.

2. Отсутствие стимуляции кинетином синтеза АЛК в интактных этиолированных растениях вызвано дефицитом энергетического кофактора, АТФ, а также ретроингибированием синтеза АЛК протохлорофиллидом (Пд).

3. КИН не контролирует функционирование ключевых стадий биосинтеза гема – образование АЛК, активность ФХ, а также уровень конечного продукта, гема, в Хл-содержащей и нефотосинтезирующей растительных тканях. В Хл-дефицитной ткани – корнях зеленых проростков ячменя, регуляция образования АЛК осуществляется гемом путем изменения содержания ГАТ.

4. Значительное увеличение уровня эндогенных ЦК в листьях ячменя с повышенным содержанием АЛК указывает на связь метаболизма АЛК и ЦК в растении.

5. Предпосевная обработка семян ячменя низкими концентрациями АЛК интенсифицирует ростовые процессы растений, повышает в них содержание фотосинтетических пигментов, белка и углеводов, что, в конечном счете, приводит к повышению продуктивности растений путем увеличения количества фертильных побегов и озерненности колосьев.

**Личный вклад соискателя.** Экспериментальные результаты, представленные в диссертационной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Соискателем проведена статистическая обработка данных, их анализ. Постановка целей и задач исследования, интерпретация результатов, подготовка к публикации печатных работ осуществлялись совместно с научным руководителем проф. Н.Г. Авериной и старшим научным сотрудником лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» к.х.н. Е.Б. Яронской при решающем участии автора.

**Апробация результатов.** Результаты исследований были представлены на V и VII съездах Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 2002; 2006), Международной конференции “Photosynthesis and crop production” (Киев, Украина, 2002), конференциях молодых ученых «Молодежь в науке – 2003, 2004, 2005» (Минск, 2003; 2004; 2005), V Съезде общества физиологов растений России (Пенза, Россия, 2003), II Немецко-белорусском симпозиуме «Development and function of the photosynthetic apparatus» (Эксдорф, Германия, 2003), 7-м Международном конгрессе по молекулярной биологии растений (Барселона, Испания, 2003), Международной конференции Федерации европейского биохимического общества по трансдукции сигналов (Брюссель, Бельгия, 2003), 4-й и 5-й Международных научных конференциях «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2005; 2007), 11-ом Конгрессе Европейского общества фотобиологов (Экс-ле-бен, Франция, 2005), III Международном белорусско-немецком симпозиуме «Biophysics of photosynthesis. Intracellular signaling and gene regulation in plants» (Минск, 2007), Международной конференции «Гуминовые кислоты и фитогормоны в растениеводстве» (Киев, Украина, 2007).

**Опубликованность результатов.** По теме диссертации опубликовано 7 статей в рецензируемых научных журналах, 4 – в сборниках научных работ и 11 тезисов докладов. Общее количество опубликованных авторских листов в изданиях, включенных в Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований – 3,7; других публикаций – 1,5 авторских листа.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, перечня сокращений, общей характеристики, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов исследования (глава 2), изложения и обсуждения полученных результатов (главы 3-5), заключения,

библиографического списка, включающего 288 источников литературы (25 – на русском, 263 – на английском языке), списка публикаций соискателя – 22 работы (15 – на русском, 7 – на английском языке) и приложения. Работа изложена на 151 странице печатного текста, содержит 28 рисунков и 13 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования служили растения ячменя *Hordeum vulgare* L. (сорт Гонар), выращенные в лабораторных и полевых условиях, а также мутант ячменя линии *albostrians* (сорт Haisa). Семена мутанта были любезно предоставлены проф. Т. Бёрнером (Университет им. Гумбольдта, Берлин, Германия). В лабораторных условиях зеленые растения выращивали в режиме 14 ч света/10 ч темноты, этиолированные – в полной темноте при температуре  $23\pm 2^\circ\text{C}$  в обоих случаях. Все манипуляции с растениями в темноте проводили с использованием слабого зеленого света, не вызывающего фотопревращения Пд. Для освещения использовали люминесцентные лампы типа ЛБ-40 (освещенность 2200 лк).

Количество Хл (Хл *a* + Хл *b*), Пд и каротиноидов оценивали по спектрам поглощения 80%-ных ацетоновых экстрактов листьев (спектрофотометр UVIKON-931, Германия) [Vernon, 1960; Porra et al., 1989; Шлык, 1968]. Разделение пигментов на фитольные и бесфитольные проводили, как описано в работе [Shlyk et al., 1982]. Содержание порфиринов определяли спектрофлуориметрически [Shlyk et al., 1982; Аверина и др., 1984] на спектрофлуориметре SFL1211 («СОЛАР», Беларусь). Синтез АЛК в стромальной фракции этиопластов оценивали согласно работе [Masuda et al., 1994]. Выделение пластид осуществляли по [Walker et al., 1991]. Активность АЛКД определяли в гомогенатах листьев по [Miller et al., 1979], МХ в хлоропластах согласно [Walker et al., 1991], МТФ в хлоропластах согласно [Ellsworth et al., 1972], ФХ в хлоропластах, как описано в работе [Papenbrock et al., 1999]. Содержание гема определяли по [Weinstein et al., 1983]. Для определения АТФ использовали люциферин-люциферазный метод [Wulff et al., 1985]. Экстракцию ЦК проводили согласно [Кудоярова и др., 1990]. Количество ЦК определяли иммуноферментным методом, используя иммуноферментные наборы Института биологии Уфимского научного центра РАН. Экстракцию из листьев белков, их электрофорез в полиакриламидном геле и иммуноблотинг выполняли по [Kruse et al., 1995]. Антитела для ГР, ГАТ, АЛКД, МТФ, CHL H, CHL I и CHL D субъединиц МХ были любезно предоставлены проф. Б. Гриммом (Университет им. Гумбольдта, Берлин, Германия). Обработку изображений иммуноблотинга проводили с помощью программы TotalLab 2.01 (США). Содержание свободных сахаров определяли согласно [Кабашникова и др., 2003]. Определение количества белка осуществляли по Bradford [Bradford, 1976]. Статистическая обработка данных состояла в определении средней

квадратичной ошибки их среднего арифметического. Для статистической обработки экспериментальных данных и учета полученных результатов использовали пакеты программ «Statistica 6.0», «Excel 2003», «SigmaPlot 9.0» и статистические методы, принятые в области биологических исследований.

**Обработка КИН.** Этиолированные проростки ячменя дикого типа и *albostrians* мутанта, начиная с 4-дневного возраста, опрыскивали в темноте дистиллированной водой (контроль) или КИН (20 мг/л) 3 раза в день в течение 3-х суток. Белые листья мутанта использовали в качестве опытного материала. Зеленые мутантные проростки, имеющие фенотип, характерный для растений дикого типа, использовали как контроль. Корни отделяли от 7-дневных этиолированных проростков ячменя и инкубировали в чашках Петри 24 ч в темноте либо на постоянном белом свете на воде или на растворе КИН (10 мг/л; 20 мг/л). В отдельных опытах отрезки корней инкубировали 17 ч в темноте на 0,1 М Трис-НСI буфере рН 7,0 с добавлением ДП в различных концентрациях (0,001–3 мМ).

**Индукция накопления АЛК.** Срезанные листья или отрезки корней инкубировали на 0,05 М растворе левулиновой кислоты (ЛК) в 0,1 М Трис-НСI буфере (рН 7,0) в темноте либо на постоянном свете (2200 лк) в течение 4 ч (листья) или 17 ч (корни); 5-дневные интактные проростки ячменя инкубировали на постоянном белом свете корнями на водном растворе 0,025 М ЛК в течение 17 ч. ЛК является конкурентным ингибитором АЛКД – фермента, превращающего АЛК в порфобилиноген (ПБГ), и вызывает накопление эндогенной АЛК. Количества АЛК определяли согласно [Miller et al., 1979; Averina et al., 1991].

**Предпосевная обработка семян ячменя АЛК.** Перед высевом семена инкрустировали смесью, содержащей фунгицид “Байтан-универсал” (2 кг/т), пленкообразователь “Гисинар” (100 г/т) и АЛК (синтезирована в лаборатории химии липидов Института биоорганической химии НАН Беларуси) в концентрации 0,12; 0,6; 1,2 мМ. В лабораторных условиях проростки выращивали в вегетационных сосудах в режиме 14 ч света (лампы ДНАТ-400, освещенность 15000 лк) и 10 ч темноты при  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 113 дней. Полевые мелкоделяночные опыты закладывали на экспериментальном поле ЦБС НАН Беларуси в четырехкратной повторности (площадь делянки 1 м<sup>2</sup>). Морфофизиологический анализ растений и анализ структуры урожая осуществляли согласно [Зеленский и др., 1982; Ламан и др., 1996].

## **ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Влияние ЦК на биосинтез растительных тетрапирролов**

*Исследование механизмов действия ЦК на активность системы биосинтеза Хл.* Обработка развивающихся интактных этиолированных проростков ячменя КИН привела лишь к незначительной (8%) стимуляции

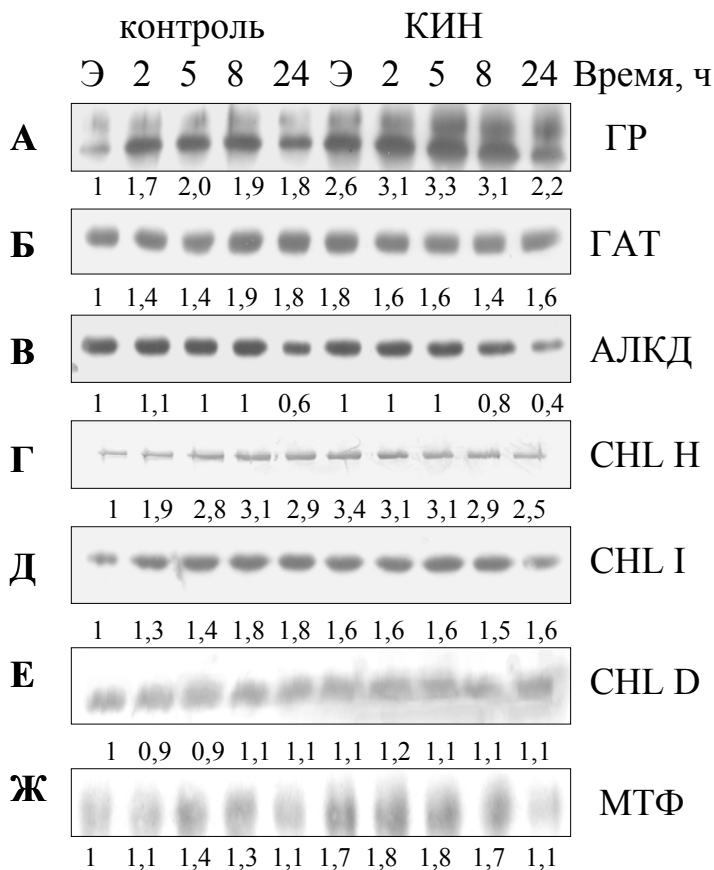


накопления в них Пд. Ранее подобная тенденция была отмечена в [Аверина и др., 1972; Шлык и др., 1973]. Освещение этиолированных растений в течение 2 и 5 ч и последующее их затемнение привело к возрастанию под действием КИН начальной скорости ресинтеза Пд в 1,5 и 1,2 раза соответственно, но при этом ЦК не повлиял на предельный уровень накопления пигмента. Освещение этиолированных проростков привело к хорошо известному в литературе феномену [Sigiura, 1963; Кулаева и др., 1972] – ускоренному накоплению Хл. Так, после 2, 5 и 8 ч зеленения содержание Хл в опытных вариантах превысило соответствующие значения в контрольных растениях на 146, 95 и 4% соответственно.

Оценена способность обработанных КИН растений образовывать АЛК в темноте и на свету. КИН не увеличивал скорость синтеза АЛК в этиолированных проростках, что соответствует приведенным выше данным о практически равных количествах Пд в этиолированных растениях опытного и контрольного вариантов. Однако кратковременное освещение (2 мин) этиолированных растений, приведшее к фотовосстановлению Пд, и последующее помещение их в темноту на 4 ч привело к возрастанию скорости синтеза АЛК под действием КИН в 1,3 раза по сравнению с контролем. Это означает, что уже в этиолированных растениях КИН создал потенциал для ускоренного накопления АЛК, однако действие Пд, как ретроингибитора синтеза АЛК [Калер и др., 1969], не позволило этому потенциалу реализоваться. В ходе более длительного освещения в течение 2, 5 и 8 ч способность синтезировать АЛК при затемнении растений увеличивалась под действием КИН на 167, 220 и 68% соответственно. Это хорошо согласуется с возросшей скоростью ресинтеза Пд в освещенных 2 и 5 ч и вновь затемненных этиолированных проростках, обработанных КИН.

В соответствии с активацией кинетином накопления Хл в ходе непрерывного освещения растений в них наблюдалась и отчетливая стимуляция синтеза АЛК. Так, АЛК-синтезирующая способность проростков, зеленеющих 2, 5 и 8 ч, возросла под действием КИН на 228, 323 и 270% соответственно.

В обработанных КИН этиолированных и зеленеющих растениях было отмечено большее содержание ГР (рисунок 1А) – регуляторного фермента, принимающего участие в синтезе АЛК. Содержание ГАТ – следующего фермента, катализирующего синтез АЛК, возросло в этиолированных проростках под действием КИН в 1,8 раз (рисунок 1Б). Существенных различий в содержании ГАТ в зеленеющих в течение 2, 5, 8 и 24 ч проростках ячменя контрольного и опытного вариантов обнаружено не было. Увеличение содержания ГР и ГАТ уже в этиолированных растениях (соответственно в 2,6 и в 1,8 раза) и лишь незначительное (в 1,3 раза) возрастание способности таких растений синтезировать АЛК, проявившееся после их кратковременного освещения (2 мин) и помещения в темноту, поставило вопрос о том, только ли



Э – этиолированные листья

**Рисунок 1 – Вестерн-блот анализ ГР (А), ГАТ (Б), АЛКД (В), СНЛ Н (Г), СНЛ I (Д) и СНЛ D (Е) субъединиц МХ, а также МТФ (Ж) в этиолированных и зеленеющих проростках ячменя, обработанных водой (контроль) или КИН**

КИН ферментами, могут быть эндогенные субстраты и кофакторы. Был проанализирован уровень АТФ в этиолированных проростках ячменя, обработанных КИН. Действительно, содержание АТФ в них составило лишь 14% от значений в контроле (таблица 1).

**Таблица 1 – Синтез АЛК в стромальной фракции этиопластов, выделенной из этиолированных проростков ячменя, и содержание АТФ в этиолированных проростках, обработанных водой (контроль) либо КИН**

Вариант	АЛК, нмоль/(мг белка·ч)	АТФ, пмоль/г сырой массы
контроль	0,529±0,069	38,0±11,2
КИН	0,822±0,075	5,2±1,1

Таким образом, обработка этиолированных проростков ячменя КИН привела к формированию в них потенциала для ускоренного образования АЛК, о чем свидетельствуют увеличенная в 1,3 раза АЛК-синтезирующая

Пд, как ретроингибитор синтеза АЛК, ограничивает АЛК-синтезирующую активность этиолированных растений, обработанных КИН. Из этиолированных растений кинетинового и контрольного вариантов с практически одинаковым количеством Пд была выделена содержащая ферменты системы синтеза АЛК стромальная фракция этиопластов, которую инкубировали 1 ч в темноте в присутствии экзогенных субстратов и кофакторов, принимающих участие в синтезе АЛК – АТФ, НАДФН и глутамата. Из данных таблицы 1 видно, что способность к синтезу АЛК оказалась в полтора раза выше в стромальной фракции этиопластов, выделенной из проростков, обработанных КИН. Это означает, что помимо Пд еще одним фактором, лимитирующим синтез АЛК дополнительно образованными под действием

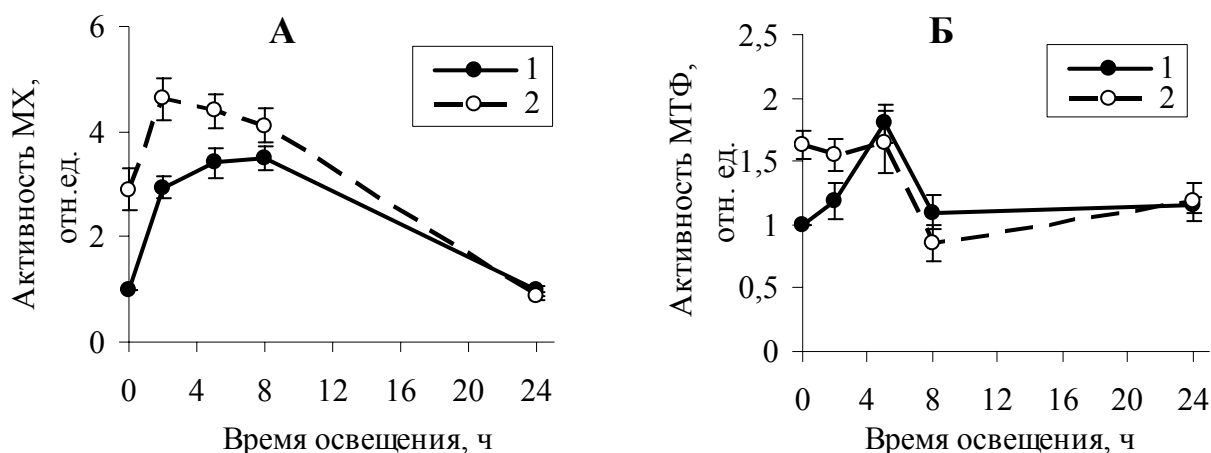
способность кратковременно освещенных (2 мин) этиолированных проростков, более высокое содержание ГР и ГАТ, а также увеличенная в полтора раза скорость синтеза АЛК в стромальной фракции этиопластов в присутствии экзогенных АТФ, НАДФН и глутамата (таблица 1). Однако в интактных этиолированных растениях этот потенциал не был реализован ни в виде дополнительных количеств АЛК, ни в виде дополнительных количеств Пд. Одной из причин является недостаток субстратов и кофакторов синтеза АЛК, в частности АТФ, а также присутствие эндогенного Пд — ретроингибитора синтеза АЛК.

В ходе исследований не было выявлено какого-либо влияния КИН на активность (таблица 2) и содержание АЛКД (рисунок 1В) ни в этиолированных, ни в зеленеющих 2, 5, 8 и 24 ч проростках. По-видимому, в развивающихся интактных растениях этот фермент не лимитирует образование Хл и способен переработать образованные под действием КИН дополнительные количества АЛК, поступающие в систему его синтеза при освещении этиолированных растений.

Таблица 2 – Активность АЛКД (нмоль ПБГ·(мг белка·ч)<sup>-1</sup>) в этиолированных и зеленеющих проростках ячменя, обработанных водой (контроль) либо КИН

Вариант	Время освещения, ч				
	0	2	5	8	24
контроль	61,1±2,6	55,9±3,2	49,3±1,9	45,7±1,5	30,0±1,2
КИН	63,9±1,8	62,1±2,6	51,3±2,3	41,2±1,4	27,2±1,5

Активность ключевого фермента биосинтеза Хл – МХ, увеличивалась под действием КИН в среднем в 2–3 раза уже в этиолированных растениях (рисунок 2А). При этом КИН увеличивал содержание СНL Н и СНL I субъединиц МХ в 3,4 и 1,6 раза соответственно (рисунок 1Г, Д).



1 – контроль; 2 – КИН

Рисунок 2 – Активность МХ (А) и МТФ (Б) в этиолированных и зеленеющих проростках ячменя, обработанных водой (контроль) или КИН

В зеленеющих проростках стимуляция КИН активности МХ тесно коррелировала с действием фитогормона на накопление Хл. К 2 ч зеления разница в активности фермента между контрольным и опытным вариантами составила 57%, а к 5 и 8 ч – 28 и 18% соответственно. Повышенной активности МХ в обработанных КИН зеленеющих проростках соответствовал и более высокий уровень СНL Н субъединицы фермента. При этом содержание СНL I субъединицы изменялось лишь незначительно, а количество СНL D белка не зависело ни от освещения, ни от обработки ЦК (рисунок 1Е), и, по-видимому, не лимитировало индуцированную КИН сборку большего числа активных комплексов МХ.

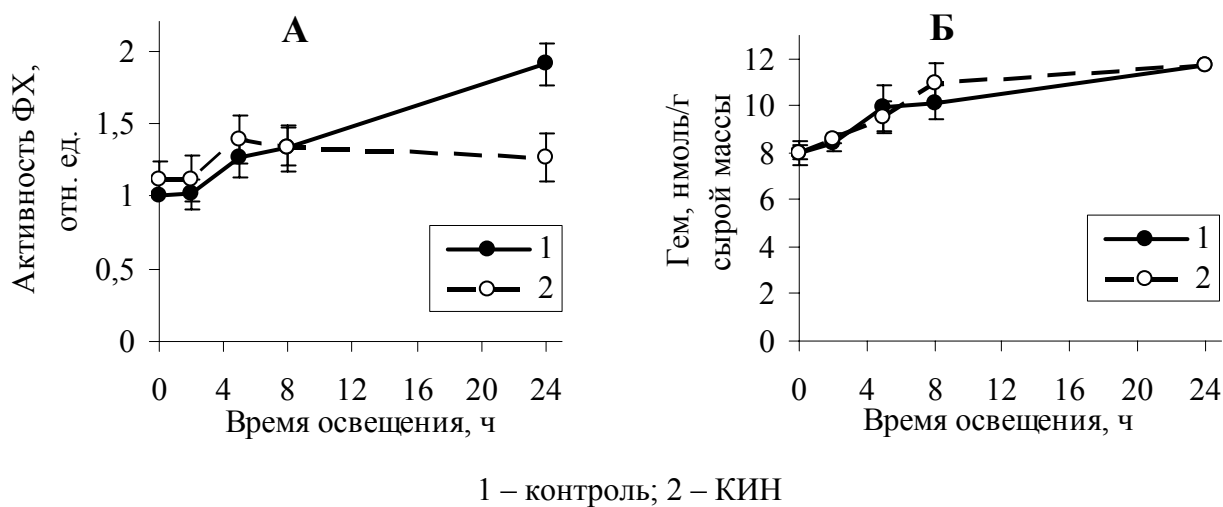
В этиолированных растениях КИН на 43% увеличивал активность следующего фермента в цепи биосинтеза Хл – МТФ (рисунок 2Б), и в 1,7 раз повышал его содержание (рисунок 1Ж). В начальный период последующего освещения растений стимуляция активности МТФ под действием КИН коррелировала с повышенным содержанием фермента.

Таким образом, стимуляция под действием КИН активности системы биосинтеза Хл в зеленеющих проростках ячменя обусловлена не только увеличением скорости синтеза первичного субстрата – молекул АЛК, но и адекватным повышением активности и содержания ключевых ферментов – МХ и МТФ. Отсутствие стимуляции кинетином синтеза АЛК в интактных этиолированных растениях вызвано дефицитом АТФ, а также ретроингибированием синтеза АЛК протохлорофиллидом.

***Изучение влияния КИН на активность системы биосинтеза гема.*** Обработка проростков ячменя КИН не приводила к изменению активности ФХ (рисунок 3А), а также не влияла на уровень гема (рисунок 3Б) как в этиолированных, так и в зеленеющих листьях по сравнению с контрольными растениями, что может указывать на отсутствие контроля активности геминовой ветви биосинтеза растительных тетрапирролов цитокининами. Для развития этого представления было изучено влияние КИН на активность ключевой стадии процесса – образование молекул АЛК.

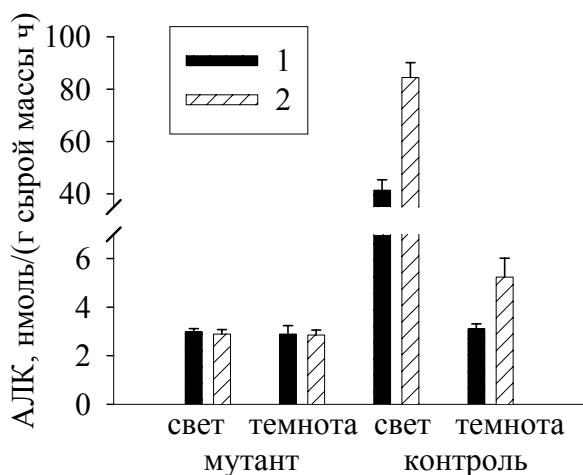
В настоящее время в литературе обсуждается гипотеза о существовании в пластидах двух пулов АЛК, предназначенных, соответственно, для синтеза Хл и гема. Имеются единичные сообщения о том, что свет контролирует образование, так называемой «хлорофильной» АЛК, но не влияет на синтез АЛК, направляемой в геминовую ветвь [Huang et al., 1989; Yarovskaya et al., 2003]. Нами были изучены особенности гормональной регуляции образования АЛК, предназначенной для синтеза геминовых порфиринов. В качестве объекта была выбрана нефотосинтезирующая ткань – белые листья мутанта ячменя линии *albostrians* и корни проростков ячменя. Белые листья мутанта содержат по сравнению с зелеными мутантными листьями, взятыми в качестве контроля, недифференцированные, лишенные 70S рибосом пластиды [Boerner et al., 1976]

со следовым содержанием Хл (0,1%) [Yaronskaya et al., 2003], но достаточно высокой активностью синтеза АЛК (25% от таковой в контрольных проростках) [Yaronskaya et al., 2003].



**Рисунок 3 - Активность ФХ (А) и количество нековалентно связанного гема (Б) в этиолированных и зеленеющих проростках ячменя, обработанных водой (контроль) или КИН**

Изучено действие КИН на накопление АЛК в темноте и на свету в



1 – вода; 2 – КИН; мутант – листья *albostrians* мутанта ячменя белого фенотипа; контроль – листья мутанта зеленого фенотипа; свет и темнота – инкубация с ЛК в течение 4 ч на свету и в темноте соответственно

**Рисунок 4 – АЛК-синтезирующая способность освещенных в течение 3 ч листьев белого и зелёного фенотипов *albostrians* мутанта ячменя, обработанных водой либо КИН**

освещенных в течение 3 ч проростках белого фенотипа и в контрольных растениях. Для накопления АЛК отрезки листьев инкубировали 4 ч на ЛК в темноте или на свету. Было обнаружено практически двукратное увеличение скорости накопления АЛК в обработанных КИН контрольных проростках, как на свету, так и в темноте (рисунок 4). В этих же условиях КИН, однако, не стимулировал накопление АЛК в белых листьях мутанта.

В отрезках корней, отделенных от этиолированных проростков ячменя, КИН (20 мг/л и 10 мг/л) также не влиял на скорость накопления АЛК и на уровень конечного продукта геминной ветви – гема, как в темноте, так и на свету (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние КИН на скорость накопления АЛК и количество нековалентно связанного с белками гема в корнях этиолированных проростков ячменя, инкубируемых 24 ч в темноте либо на свету на воде или на растворах КИН, а затем 17 ч в темноте или на свету на растворе ЛК для накопления АЛК

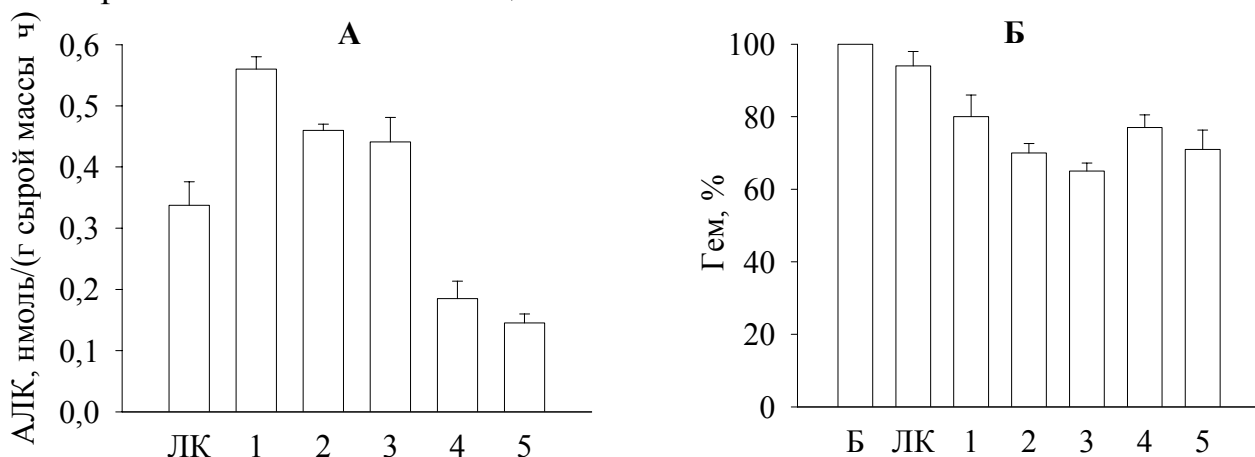
Вариант	АЛК, нмоль/(г сырой массы·ч)		Гем, нмоль/г сырой массы
	ЛК - свет	ЛК - темнота	
1. Вода – темнота	0,22±0,01	0,23±0,02	4,83±0,21
2. КИН 10 мг/л – темнота	0,26±0,04	0,20±0,03	4,76±0,43
3. КИН 20 мг/л – темнота	0,26±0,03	0,25±0,03	4,83±0,11
4. Вода – свет	0,21±0,02	0,25±0,03	4,29±0,25
5. КИН 10 мг/л – свет	0,26±0,02	0,28±0,01	4,44±0,14
6. КИН 20 мг/л – свет	0,22±0,05	0,20±0,01	4,63±0,23

Таким образом, полученные результаты о специфическом влиянии света и ЦК на функционирование хлорофильной и геминовой ветвей системы биосинтеза растительных порфиринов укрепляют и развивают гипотезу о существовании в высших растениях отдельных систем синтеза гема и Хл, начиная от образования их первичного предшественника — молекул АЛК, и заканчивая синтезом конечных продуктов. Обе системы используют разные пулы АЛК, из которых только один, предназначенный для образования Хл, регулируется светом и ЦК.

### **Регуляция биосинтеза АЛК в корнях проростков ячменя, обработанных хелатором металлов пиридинового ряда ДП**

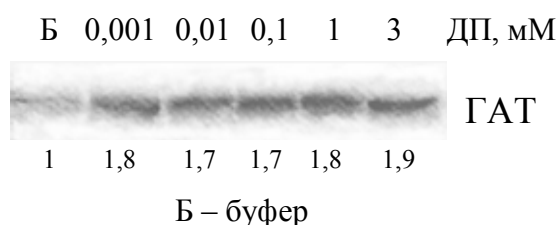
В качестве приема, позволяющего модифицировать уровень гема, была использована обработка корней, отделенных от выросших на воде зеленых 7-дневных проростков ячменя, хелатором металлов ДП, который связывает ионы железа и подавляет тем самым синтез гема [Duggan et al., 1974]. На рисунке 5А показано, что обработка корней 0,001 мМ ДП привела к увеличению их способности синтезировать АЛК на 66% по сравнению с контролем (вариант ЛК). Повышение концентрации хелатора в 10-100 раз увеличило скорость накопления АЛК в среднем на 30%. Последующий рост концентрации хелатора (1 и 3 мМ) приводил к уменьшению образования АЛК ниже уровня контрольного варианта. При всех используемых концентрациях ДП наблюдалось устойчивое снижение уровня гема (рисунок 5Б). Таким образом, использование ДП (0,001 – 0,1 мМ) вызывало истощение ионов  $Fe^{2+}$ , и, вследствие этого, снижение уровня гема и повышение скорости синтеза АЛК. Дальнейшее повышение концентрации ДП, по-видимому, приводило к истощению ионов  $Mg^{2+}$ , сродство которых к ДП ниже, чем у ионов  $Fe^{2+}$

[Аверина и др., 1992], подавлению  $Mg^{2+}$ -зависимой активации молекул глутаминовой кислоты глутамил-тРНК-синтетазой, и, следовательно, ингибированию синтеза АЛК в целом.



ЛК – содержание АЛК (А) и уровень гема (Б) в корнях, которые инкубировали 17 ч на растворе ЛК в темноте без добавления ДП; Б – уровень гема в корнях, которые инкубировали 17 ч в темноте на буфере (принято за 100%); на растворе ЛК с добавлением 0,001 мМ ДП (1), 0,01 мМ ДП (2), 0,1 мМ ДП (3), 1 мМ ДП (4) и 3 мМ ДП (5)

**Рисунок 5 – АЛК-синтезирующая способность (А) и уровень нековалентно связанного гема (Б) в обработанных ДП отрезках корней зеленых проростков ячменя**



**Рисунок 6 - Вестерн-блот анализ ГАТ в обработанных ДП корнях зеленых проростков ячменя**

Для выяснения механизмов активации синтеза АЛК в обработанных ДП корнях, было определено содержание ГАТ – фермента, катализирующего заключительную реакцию в образовании АЛК. Во всем диапазоне выбранных концентраций хелатора было обнаружено значительное повышение (в среднем в 1,8 раза) содержания аминотрансферазы (рисунок 6).

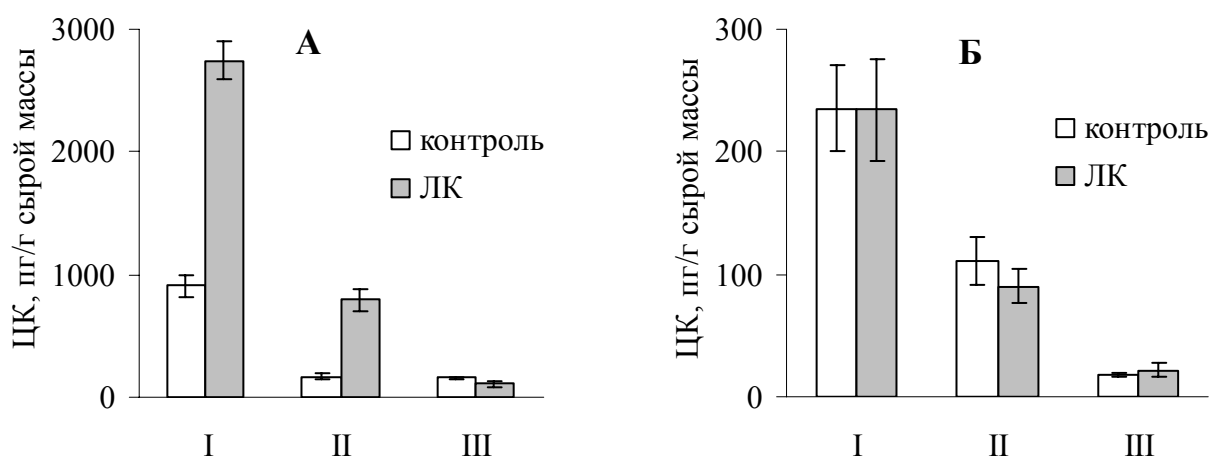
Таким образом, в корневой ткани, осуществляющей синтез геминных тетрапирролов, стимуляция синтеза эндогенной АЛК в ответ на вызванное ДП снижение уровня гема связана с увеличением содержания ГАТ.

### **Физиолого-биохимические механизмы рострегулирующего действия АЛК**

*Анализ содержания зеатина и его производных в проростках ячменя (Hordeum vulgare L.) с повышенным уровнем АЛК.* Экспонирование зеленых 5-дневных проростков ячменя корнями на 0,025М растворе ЛК на свету в течение 17 ч приводило к накоплению в листьях АЛК (87–290 нмоль/г свежего веса) и не связанному с фотодинамическими процессами угнетению роста

растений, что согласуется с полученными ранее данными [Аверина и др., 1988]. Нами выявлена корреляция между степенью угнетения ростовых процессов и уровнем эндогенной АЛК в растениях.

Определено суммарное количество всех форм зеатина – нуклеотида, 9-N-глюкозида, рибозида и свободного основания зеатина, в листьях и корнях растений ячменя, обработанных ЛК. В листьях проростков ячменя, находившихся 17 ч корнями на ЛК, отмечено увеличение количества ЦК по сравнению с водным контролем в среднем на 200% (рисунок 7А). После переноса растений с ЛК на воду через 1 сутки это превышение сохранялось, а через 2-е суток содержание ЦК в них снижалось до уровня фитогормона в контрольных растениях.



Контроль – проростки, находившиеся 3-ое суток на воде; ЛК – проростки, находившиеся 17 ч корнями на 0,025 М ЛК (I), а затем сутки (II) либо 2-ое (III) суток на воде

**Рисунок 7 – Содержание ЦК в листьях (А) и корнях (Б) проростков ячменя**

Содержание ЦК в корнях опытного варианта было на порядок ниже, чем в надземной части растений (рисунок 7Б) и не отличалось от значений в контроле. Наши данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями о том, что даже не очень большое увеличение уровня ЦК в растениях может приводить к значительным морфологическим изменениям, в том числе и уменьшению высоты растений [Medford et al., 1989]. Таким образом, значительное повышение уровня эндогенных ЦК в листьях ячменя с избыточным количеством АЛК указывает на связь метаболизма АЛК и ЦК в растениях.

**Влияние предпосевной обработки семян низкими концентрациями АЛК на рост, развитие и урожайность растений ячменя.** Изучено действие низких концентраций АЛК в составе инкрустирующей смеси, содержащей фунгицид “Байтан-универсал”, пленкообразователь “Гисинар” и АЛК (0,12; 0,6; 1,2 мМ), на морфофизиологические и биохимические показатели, а также на



урожайность ячменя. Опыты, проведенные в лабораторных условиях, показали, что инкрустирование семян ячменя 0,6 и 1,2 мМ АЛК приводило к повышению всхожести некондиционных семян на 11 и 18% соответственно. Предпосевная обработка семян инкрустирующей смесью, содержащей 0,12-1,2 мМ АЛК, стимулировала энергию прорастания семян (на 21-26%), увеличивала высоту проростков (на 16-28%), общую кустистость (на 4-33%), массу надземной части растений (на 7-24%), а также содержание белка (на 15-36%) и свободных сахаров (на 35-96%) по сравнению с контрольными растениями. Обработка семян 0,6 и 1,2 мМ АЛК вызывала повышение содержания Хл в листьях на 18 и 57%, а каротиноидов на 8 и 38% соответственно. Полевые эксперименты по изучению рострегулирующего действия АЛК на посеvy ячменя в мелких делянках (1 м<sup>2</sup>) показали, что предпосевная обработка семян 0,12-1,2 мМ АЛК приводила к увеличению количества зерен в колосе на 11-22% и продуктивной кустистости на 16-18% соответственно. При этом вес 1000 зерен оставался неизменным. Урожайность ячменя при использовании 0,12-1,2 мМ АЛК повышалась на 17-26%. Таким образом, повышение урожайности ячменя под действием АЛК достигалось за счет увеличения количества фертильных побегов и озерненности колосьев.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

### **Основные научные результаты диссертации**

1. Стимуляция биосинтеза Хл в интактных зеленеющих проростках ячменя под действием КИН обусловлена не только увеличением скорости синтеза первичного субстрата – молекул АЛК, за счет повышения активности и содержания участвующих в этом процессе ГР и ГАТ, но и адекватным возрастанием активности и содержания ключевых ферментов – МХ и МТФ. КИН не оказывает воздействия на активность и содержание АЛКД в интактных этиолированных и зеленеющих проростках ячменя [1, 5, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19].

2. Стимуляция под действием КИН синтеза АЛК в стромальной фракции изолированных этиопластов в присутствии экзогенных АТФ, НАДФН и глутамата и отсутствие влияния фитогормона на этот процесс в интактных этиолированных проростках, содержащих более низкий уровень АТФ по сравнению с контрольными растениями, указывает на то, что активность дополнительно образованных под действием кинетина ГР и ГАТ не реализуется в интактных этиолированных растениях из-за дефицита энергетического кофактора АТФ. Отсутствие стимуляции кинетином синтеза АЛК в интактных этиолированных растениях объясняется также ретроингибированием синтеза АЛК протохлорофиллидом [1, 5, 8, 13, 14, 15, 16, 17, 19].

3. Обработка КИН не влияет на ключевые стадии биосинтеза геминовых порфиринов – активность ФХ в этиолированных и зеленеющих листьях ячменя,

образование АЛК в белых листьях мутанта ячменя линии *albostrians* и в корневой ткани, а также на уровень нековалентно связанного с белками гема в изученных объектах. Наблюдаемые особенности гормональной регуляции системы синтеза растительных тетрапирролов в фотосинтезирующих и Хл-дефицитных тканях укрепляют и развивают гипотезу о существовании в высших растениях отдельных путей синтеза Хл и гема, начиная от образования АЛК и заканчивая синтезом конечных продуктов [2, 5, 8, 16, 17, 19].

4. Снижение уровня гема и стимуляция синтеза эндогенной АЛК в корнях зеленых проростков ячменя, обработанных ДП, свидетельствуют о высокой эффективности действия гема как ингибитора синтеза АЛК, участвующей в его собственном образовании. Впервые показано, что в отличие от зеленой ткани растений, где действие гема реализуется на уровне ГР, в нефотосинтезирующей ткани – корнях зеленых проростков ячменя, контроль образования АЛК гемом осуществляется на стадии, катализируемой ГАТ, путем изменения содержания этого фермента [4, 9, 10, 18, 20].

5. Обнаружена корреляция между уровнем накопления в листьях эндогенной АЛК и степенью угнетения ростовых процессов. Установлено, что в листьях с повышенным содержанием АЛК регистрируется повышенный уровень эндогенных ЦК – зеатина и его производных, что свидетельствует о связи метаболизма АЛК и ЦК в растении [3].

6. Предпосевная обработка семян ячменя 0,12; 0,6 или 1,2 мМ АЛК в составе инкрустирующей смеси, содержащей фунгицид “Байтан-универсал” и пленкообразователь “Гисинар”, является эффективным способом повышения продуктивности растений ячменя. Инкрустирование семян низкими концентрациями АЛК приводит к увеличению всхожести и энергии прорастания семян, высоты проростков, общей кустистости, массы надземной части растений, повышению содержания фотосинтетических пигментов, белка и углеводов. Увеличение урожайности растений ячменя происходит за счет повышения количества фертильных побегов и озерненности колосьев [6, 7, 11, 21, 22].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

1. Результаты исследований внедрены в учебный процесс Белорусского государственного университета на кафедре физиологии и биохимии растений биологического факультета (Акт внедрения от 05.12.2006 г.) и Белорусского государственного педагогического университета им. М.Танка на кафедре ботаники и основ сельского хозяйства (Акт внедрения от 08.08.2006 г.).

2. Данные о рострегулирующем действии низких концентраций АЛК могут быть использованы при разработке пленкообразующих составов для инкрустации семян.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах

1. Вершиловская, И.В. Исследование механизмов действия цитокининов на систему биосинтеза хлорофилла / И.В. Вершиловская, Е.Б. Яронская, А.Ю. Везицкий, Н.Г. Аверина // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2004. – № 1. – С. 80–84.

2. Яронская, Е.Б. Влияние кинетина на активность геминной ветви биосинтеза тетрапирролов в проростках ячменя (*Hordeum vulgare* L.) / Е.Б. Яронская, И.В. Вершиловская, Н.Г. Аверина // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2004. – № 2. – С. 79–82.

3. Яронская, Е.Б. Содержание зеатина и его производных в проростках ячменя (*Hordeum vulgare* L.) с повышенным уровнем 5-аминолевулиновой кислоты / Е.Б. Яронская, И.В. Вершиловская, Н.Г. Аверина // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2004. – № 3. – С. 70–73.

4. Вершиловская, И.В. Регуляция синтеза 5-аминолевулиновой кислоты в корнях проростков ячменя / И.В. Вершиловская // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2005. – № 5/1. – С. 40–43.

5. Yaronskaya, E. Cytokinin effects on tetrapyrrole biosynthesis and photosynthetic activity in barley seedlings / E. Yaronskaya, I. Vershilovskaya, Y. Poers, A. Alawady, N. Averina, B. Grimm // Planta. – 2006. – Vol. 224. – P.700–709.

6. Спивак, С.Г. Влияние липофильных эфиров 5-аминолевулиновой кислоты на рост и развитие растений / С.Г. Спивак, Е.Б. Яронская, И.В. Вершиловская, В.Ю. Давыдов, И.В. Тростянка, В.И. Долгопалец, Н.Г. Аверина, М.А. Кисель // Вес. Алтайского гос. аграр. ун-та. – 2007. – № 7, вып. 33. – С. 28–31.

7. Спивак, С.Г. Стимуляция роста и развития растений ячменя липофильными эфирами 5-аминолевулиновой кислоты / С.Г. Спивак, Е.Б. Яронская, И.В. Вершиловская, В.Ю. Давыдов, И.В. Тростянка, В.И. Долгопалец, Н.Г. Аверина, М.А. Кисель // Доклады НАН Беларуси. – 2007. – Т. 51, № 5. – С. 95–99.

### Статьи в сборниках научных работ

8. Вершиловская, И.В. Специфическое участие цитокининов в регуляции активности хлорофильной ветви биосинтеза растительных порфиринов / И.В. Вершиловская / Сб. тр. молод. уч. Нац. акад. наук Беларуси. Отделение аграрных наук. Отделение биологических наук. Отделение медицинских наук. / Нац. акад. наук Беларуси.: под науч. ред. И.В. Вологовского [и др.]. / – Минск, 2003. – Том II. – С. 261–264.

9. Вершиловская, И.В. Активация синтеза 5-аминолевулиновой кислоты хелаторами металлов пиридинового ряда в корнях зеленых проростков ячменя (*Hordeum vulgare* L.) / И.В. Вершиловская // Сб. тр. молод. уч. Нац. акад. наук

Беларуси. / Нац. акад. наук Беларуси.: под науч. ред. И.В. Волотовского [и др.]. / – Минск, 2004. – Том II. – С. 11–13.

10. Яронская, Е.Б. Особенности регуляции биосинтеза тетрапирролов в корнях проростков ячменя / Е.Б. Яронская, И.В. Вершиловская, Н.Г. Аверина // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: сб. ст. VII съезда Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биоф., Минск, 21-23 июня 2006г: в 2 т. / Ин-т биоф. и клет. инжен. НАН Беларуси, Белорус. Гос. Ун-т, Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биоф.; редкол.: И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2006. – Т. 2. – С. 140–142.

11. Кисель, М.А. Стимуляция роста и развития растений липофильными эфирами 5-аминолевулиновой кислоты / М.А. Кисель, С.Г. Спивак, В.Ю. Давыдов, В.И. Долгопалец, И.В. Тростянка, Е.Б. Яронская, И.В. Вершиловская, Н.Г. Аверина // Гуминовые кислоты и фитогормоны в растениеводстве: сб. материалов междунар. конф., Киев, Украина, 12-16 июня 2007г/ – Киев, 2007. – С. 70–71.

#### **Тезисы докладов**

12. Вершиловская, И.В. Влияние кинетина на активность магний хелатазы в этиолированных и зеленеющих проростках ячменя / И.В. Вершиловская, Е.Б. Яронская, Н.Г. Аверина // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Тезисы докладов V съезда Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биоф., Минск, 22-24 окт. 2002 г. / Ин-т фотобиол. НАН Беларуси, Белорус. гос. ун-т, Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биоф.; редкол.: И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2002. – С. Т-32.

13. Yaronskaya, E.V. Stimulatory effect of kinetin on 5-aminolevulinic acid synthetic capacity and Mg-chelatase activity in barley leaves / E.V. Yaronskaya, I.V. Vershilovskaya, N.G. Averina // Programme and abstracts of International Conference “Photosynthesis and Crop Production”, Ukraine, 7-11 Oct. 2002. – Kiev, 2002. – P. 110.

14. Yaronskaya, E. Stimulation of magnesium chelatase and magnesium protoporphyrin methyltransferase by kinetin in etiolated and greening barley leaves / E. Yaronskaya, I. Vershilovskaya, B. Grimm, N. Averina / 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology: Book of Abstracts, Barcelona, Spain, 23-28 June 2003. / The International Society for Plant Molecular Biology. – Barcelona, 2003 – S07-21. – P. 116.

15. Vershilovskaya, I. Effect of kinetin on the key reactions of chlorophyll biosynthesis in etiolated and greening barley leaves / I. Vershilovskaya, E. Yaronskaya, B. Grimm, N. Averina / Abstracts of the FEBS Special Meeting 2003 on Signal Transduction, Brussels, Belgium, 3-8 July, 2003. – The FEBS Journal. – Vol. 270, Supp. 1. – PS01-0676. – P. 166.

16. Яронская, Е.Б. Влияние кинетина на ключевые реакции биосинтеза хлорофилла и гема в листьях ячменя / Е.Б. Яронская, И.В. Вершиловская, Н.Г. Аверина // Материалы V съезда Общества физиологов растений России и

Междунар. конф. «Физиология растений – основа фитобиотехнологии», Пенза, Россия, 15–21 сент. 2003. – Пенза, 2003. – С.90.

17. Averina, N.G. Cytokinin regulation of tetrapyrrole biosynthesis in plant / N.G. Averina, I.V. Vershilovskaya, E.B. Yaronskaya, B. Grimm / 2<sup>th</sup> German-Belarus Symposium “Development and function of the photosynthetic apparatus”, Egsdorf, Germany, October 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup>, 2003. / Technische Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Max-Born-Institut, Deutsche Forschungsgemeinschaft. – Egsdorf, 2003. – P. 5.

18. Вершиловская, И.В. Действие света, кинетина и 2,2'-дипиридила на синтез 5-аминолевулиновой кислоты в корнях проростков ячменя / И.В. Вершиловская, Е.Б. Яронская, Н.Г. Аверина / Регуляция роста, развития и продуктивности растений: материалы IV Международной научной конференции, Минск, 26-28 окт. 2005г. / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т эксп. ботаники им. В.Ф. Купревича, Белорус. обществ. объедин. физиол. растен.: редкол.: Н.А. Ламан [и др.]. – Минск, 2005. – С. 45.

19. Яронская, Е.Б. Влияние кинетина на систему биосинтеза тетрапирролов и фотосинтетическую активность в проростках ячменя / Е.Б. Яронская, И.В. Вершиловская, Н.Г. Аверина / Регуляция роста, развития и продуктивности растений: материалы IV Международной научной конференции, Минск, 26-28 окт. 2005г. / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т эксп. ботаники им. В.Ф. Купревича, Белорус. обществ. объедин. физиол. растен.: редкол.: Н.А. Ламан [и др.]. – Минск, 2005. – С. 264.

20. Vershilovskaya, I.V. Regulation of 5-aminolevulinic acid synthesis in roots of barley seedlings / I.V. Vershilovskaya, E.B. Yaronskaya, N.G. Averina // 11th Congress of European Society for Photobiology: programme and book of abstracts, Aix-les-Bains, France, 3-8 Sept. 2005. / European Society for Photobiology. – Aix-les-Bains, 2005. – PII-93. – P. 158.

21. Yaronskaya, E. Hexyl ester of 5-aminolevulinic acid as effective plant growth regulator / E. Yaronskaya, I. Vershilovskaya, I. Trostyanko, V. Dolgopaletz, N. Averina, M. Kisel / III Belarus-German Symposium “Biophysics of photosynthesis. Intracellular signaling and gene regulation in plants”, Minsk, Belarus, September 12-16, 2007. / National academy of sciences of Belarus, Institute of biophysics and cell engineering; Ed. I.D. Volotovskii. – Minsk, 2007. – P. 42.

22. Яронская, Е.Б. Влияние 5-аминолевулиновой кислоты и ее гексилового эфира на рост и урожайность ячменя / Яронская Е.Б., Вершиловская И.В., Грицкевич Е.Р., Аверина Н.Г., Тростянка И.В., Долгопалец В.И., Кисель М.А. / Регуляция роста, развития и продуктивности растений: материалы V Международной научной конференции, Минск, 28-30 ноября 2007г. / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т эксп. ботаники им. В.Ф. Купревича, Белорус. обществ. объедин. физиол. растен.: под науч. ред. Н.А. Ламан. – Минск, 2007. – С. 227.

## РЭЗІЮМЭ

### Вершылоўская Ірына Вацлаваўна

### Роля цытакінінаў і гема ў рэгуляцыі біясінтэзу 5-аміналевулінавай кіслаты і тэтрапіролаў у расліннай тканіне

**Ключавыя словы:** хларафіл (Хл), гем, 5-аміналевулінавая кіслата (АЛК), Mg-хелатаза, Fe-хелатаза, кінецін (КІН), рост і развіццё раслін.

**Мэта працы:** высветліць механізмы дзеяння фітагармона цытакінінавай прыроды КІН на ключавыя рэакцыі біясінтэзу раслінных тэтрапіролаў – Хл і гема; устанавіць ролю гема ў рэгуляцыі сінтэзу АЛК у нефотасінтэзуючай расліннай тканіне; выявіць узаемасувязь метабалізму АЛК і цытакінінаў (ЦК) у расліне; высветліць фізіёлага-біяхімічныя механізмы рострэгулюючага дзеяння нізкіх канцэнтрацый АЛК на расліны ячменю.

**Метады даследавання:** біяхімічныя, біяфізічныя, малекулярна-біялагічныя, марфалагічныя, фізіялагічныя.

**Выкарыстаная апаратура:** спектрафатометр UVIKON-931 (Германія), спектрафлуарыметр SFL1211 (Беларусь), апарат для электрафарэзу (GE Healthcare, ЗША), люмінометр Lumat LB9501 (Berthold Technologies, Германія).

**Атрыманыя вынікі і іх навізна:** устаноўлена, што стымуляцыя пад дзеяннем КІН біясінтэзу Хл у зелянеючых праростках ячменю абумоўлена не толькі павелічэннем хуткасці сінтэзу малекул АЛК, але і адэкватным павышэннем актыўнасці і ўтрымання Mg-хелатазы і S-адэназіл-L-меціянін :Mg-протапарфірын IX-мецілтрансферазы. Адсутнасць стымуляцыі кінецінам сінтэзу АЛК у інтактных этыляваных раслінах выклікана дэфіцытам АТФ і рэтраінгібіраваннем сінтэзу АЛК протахларафілідам. КІН не ўплывае на актыўнасць і ўтрыманне АЛК-дэгідратазы ў інтактных этыляваных і зелянеючых праростках ячменю. Паказана, што КІН не аказвае ўплыву на функцыяванне ключавых стадый біясінтэзу гема. У нефотасінтэзуючай тканіне, каранях, гем кантралюе ўтварэнне АЛК шляхам змянення ўтрымання глутамат-1-семіальдэгідамінатрансферазы. Павелічэнне ўзроўню эндагенных ЦК у лісцях ячменю з павышаным узроўнем АЛК указвае на сувязь паміж метабалізмам АЛК і ЦК у раслінах. Перадпаяўная апрацоўка насення ячменю нізкімі канцэнтрацыямі АЛК стымулюе раставыя працэсы і павышае прадуктыўнасць раслін.

**Рэкамендацыі па выкарыстанню:** даныя могуць быць выкарыставаны пры распрацоўцы плёнкаўтваральных саставаў для інкрустацыі насення.

**Галіна выкарыстання:** біяхімія і фізіялогія раслін, сельская гаспадарка.

## РЕЗЮМЕ

Вершиловская Ирина Вацлавовна

### Роль цитокининов и гема в регуляции биосинтеза 5-аминолевулиновой кислоты и тетрапирролов в растительной ткани

**Ключевые слова:** хлорофилл (Хл), гем, 5-аминолевулиновая кислота (АЛК), Mg-хелатаза, Fe-хелатаза, кинетин (КИН), рост и развитие растений.

**Цель работы:** выяснить механизмы действия фитогормона цитокининовой природы КИН на ключевые реакции биосинтеза растительных тетрапирролов – Хл и гема; установить роль гема в регуляции синтеза АЛК в нефотосинтезирующей растительной ткани; выявить взаимосвязь метаболизма АЛК и цитокининов (ЦК) в растении; выяснить физиолого-биохимические механизмы рострегулирующего действия низких концентраций АЛК на растения ячменя.

**Методы исследования:** биохимические, биофизические, молекулярно-биологические, морфологические, физиологические.

**Использованная аппаратура:** спектрофотометр UVIKON-931 (Германия), спектрофлуориметр SFL1211 (Беларусь), аппарат для электрофореза (GE Healthcare, США), люминометр Lumat LB9501 (Berthold Technologies, Германия).

**Полученные результаты и их новизна:** установлено, что стимуляция под действием КИН биосинтеза Хл в зеленеющих проростках ячменя обусловлена не только увеличением скорости синтеза молекул АЛК, но и адекватным повышением активности и содержания Mg-хелатазы и S-аденозил-L-метионин:Mg-протопорфирин IX-метилтрансферазы. Отсутствие стимуляции кинетином синтеза АЛК в интактных этиолированных растениях вызвано дефицитом АТФ и ретроингибированием синтеза АЛК протохлорофиллидом. КИН не влияет на активность и содержание АЛК-дегидратазы в интактных этиолированных и зеленеющих проростках ячменя. Показано, что КИН не оказывает влияния на функционирование ключевых стадий биосинтеза гема. В нефотосинтезирующей ткани, корнях, гем контролирует образование АЛК путем изменения содержания глутамат-1-полуальдегидаминотрансферазы. Увеличение уровня эндогенных ЦК в листьях ячменя с повышенным содержанием АЛК указывает на связь метаболизма АЛК и ЦК в растении. Предпосевная обработка семян ячменя низкими концентрациями АЛК стимулирует ростовые процессы и повышает продуктивность растений.

**Рекомендации по использованию:** данные могут быть использованы при разработке пленкообразующих составов для инкрустации семян.

**Область применения:** биохимия и физиология растений, сельское хозяйство.

## SUMMARY

Vershylouskaya Iryna Vazlavauna

### **The role of cytokinins and heme in regulation of 5-aminolevulinic acid and tetrapyrrole biosynthesis in plant tissue**

**Key words:** chlorophyll (Chl), heme, 5-aminolevulinic acid (ALA), Mg-chelatase, Fe-chelatase, kinetin (KIN), growth and development of plants.

**The aim of research:** To elucidate mechanisms of cytokinin KIN action on key reactions of plant tetrapyrrole biosynthesis pathway leading to Chl and heme; to establish the role of heme in the regulation of ALA synthesis in non-photosynthesizing plant tissue; to reveal the connection between ALA and cytokinins (CK) metabolism; to find out physiological and biochemical mechanisms of the growth regulatory activity of low ALA concentration on barley plants.

**The methods of research:** biochemical, biophysical, molecular biological, morphological, physiological.

**The used equipment:** spectrophotometer UVIKON-931 (Germany), spectrofluorimeter SFL1211 (Belarus), electrophoresis unit (GE Healthcare, USA), luminometer Lumat LB9501 (Berthold Technologies, Germany).

**The received results and their novelty:** It was established that KIN stimulation of Chl synthesis in greening barley leaves is due to not only increase of the rate of ALA synthesis but also adequate enhancement of the activities and contents of Mg-chelatase and S-adenosyl-L-methionin: Mg-protoporphyrin IX methyltransferase. The absence of KIN stimulation of the ALA synthesis is caused by deficiency of ATP and feedback inhibition of ALA formation by protochlorophyllide in the intact etiolated plants. KIN did not influence the activity and the protein level of ALA-dehydratase in intact darkgrown and greening seedlings of barley. It is shown that KIN did not affect the key steps of heme biosynthesis. In non-photosynthesizing plant tissue, namely, roots, heme controls the ALA synthesis by changing the glutamate 1-semialdehydeaminotransferase content. The increase in the level of the endogenous CK in barley leaves with enhanced ALA content denotes the connection between ALA and CK metabolism in plant. Barley seed presowing treatment with low ALA concentration promotes growth and increases productivity of plants.

**Recommendation on using:** data can be used in development of film-forming composition for incrustation of seeds.

**The fields of application:** plant biochemistry and physiology, agriculture.

