

Вплив деяких біологічно активних речовин та ацетону на вміст хлорофілів у листях проростків томата і патисона *in vitro*

А. А. Просандєєва, М. В. Смирнова¹, І. Ю. Горбатенко¹

Миколаївська аграрна академія
Вул. Паризької комуни, 9, Миколаїв, 54000, Україна

¹ Біотехнологічна лабораторія НАН України і Міністерства освіти та науки України
Головпоштамт, а/с № 13, Херсон, 73000, Україна

E-mail: igbi@kspu.kherson.ua

*Представлено результати вивчення впливу деяких біологічно активних речовин (БАР), а саме — фітогормону кінетину, антиоксиданта іонолу при спільному та окремому введенні їх у живильне середовище для його оптимізації. Програмою Chem Office Pro встановлено подібність хімічної будови БАР (потенціалів іонізації, енергій граничних орбіталей, дипольних моментів). Доведено, що кінетин та іонол сприяють підвищенню вмісту хлорофілів у проростках томату (*Lycopersicon esculentum* L.) при окремому їх внесенні. Їхня спільна дія зменшує вміст хлорофілів. Ацетон у концентрації 10 мл/л достовірно підвищує вміст хлорофілів, а в концентрації 40–60 мл/л — суху масу рослин патисона та кабака (*Cucurbita pepo* L.) *in vitro*.*

Вступ. Підвищення ефективності технологій *in vitro* передбачає пошук нових біологічно активних речовин (БАР), а також встановлення синергізму їхньої дії в живильних середовищах, що дає можливість значно інтенсифікувати регенераційні процеси. Використання технологій *in vitro*, а саме — оптимізація живильних середовищ привертає увагу сучасних біотехнологів. За допомогою методів біотехнології можна підвищити експресію певних біологічно важливих ознак і, особливо, показники фотосинтезу. Тому дослідження фотосинтетичного процесу пояснюється не лише його значенням, але й необхідністю детального вивчення для вирішення питань загальної біології: процесів біоенергетики, механізмів регулювання процесів у клітині, природи збудженого стану молекул, механізмів міграції енергії в живих системах, а також у галузях біофізики і біохімії [1].

Встановлено, що кінетин стимулює біосинтез

хлорофілів *a*, *b*, каратиноїдів, не викликає збільшення об'єму хлоренхіми і кількості хлоропластів у клітині, але стимулює формування фотосинтетичних мембран, збільшуючи параметри і фотосинтетично активну поверхню хлоропластів [2–5].

Характер і ступінь дії залежать від концентрації кінетину, тривалості дії, віку рослин і умов вологозабезпечення [6–8]. При введенні кінетину через корені рослин збільшується інтенсивність фотофосфорилування (циклічного і нециклічного), а також накопичення НРК рослинами. Однак у літературі нами не виявлено робіт щодо впливу антиоксидантів на вміст хлорофілів у культурі тканин *in vitro*.

При дослідженні впливу кінетину та іонолу нами встановлено пригнічення зростання кількості та довжини коренів, довжини пагона проростків. На думку авторів, у даному випадку це пов'язано з подібністю хімічної структури молекул, що проявляється в їхньому антагонізмі при впливі на метаболізм рослинного організму та на експресію досліджуваних ознак [9].

Раніше показано доцільність використання ацетону в складі живильних середовищ [10]. Автори вважають, що ацетон впливає на розчинення клітинної стінки та на вихід ендогенних фітогормонів [10, 12]. Попередні наші експерименти дозволяють припустити можливість впливу ацетону на фотосинтез (внаслідок його здатності розкладатися на CO_2 і H_2O).

Ацетон у культурі *in vitro* використовували в складі живильного середовища для збільшення виходу регенерантів пшениці, капусти, томата, кукурудзи, а також у геноінженерних дослідженнях [10, 11–13].

Відмічено позитивний вплив ацетону в певній концентрації на такі показники, як «довжина пагона», «маса пагона», «суха маса пагона», «маса сім'ядолей» проростків патисона *in vitro* [14].

Тому метою наших досліджень було встановлення впливу БАР та ацетону на вміст хлорофілів і суху масу деяких представників родини гарбузових та пасльонових *in vitro*.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження слугували проростки томата *Lycopersicon esculentum* L. (сорт Новичок), патисона та кабака *Cucurbita pepo* L. (сорт Оранжевий і Золотинка відповідно). Перед посадкою насіння обробляли 20 %-м розчином перманганату калію (2 хв), 4 %-м розчином гіпохлориту кальцію (15 хв) з наступним триразовим промиванням стерильною дистильованою водою.

Для вирощування проростків патисона використовували середовище Кнопа (попередньо автоклавоване), в яке додавали ацетон у розрахунку 5, 10, 15, 20, 25, 40, 60, 80, 100, 110 мл на 1 л розчину. У контрольний розчин ацетону не додавали.

Рослини томата культивували, використовуючи наступні варіанти середовищ: МС-середовище (контроль); МС + кінетин (3 мг/л); МС + 3,5-дибутил-4-гідрокситолуол (ВНТ, іонол, 1,3 мг/л); МС + кінетин (3 мг/л) + ВНТ (1,3 мг/л).

Рослини вирощували при температурі 24 °С та 16-год фотоперіоді (проростки томата — 30 діб, проростки патисона — 10 діб).

У групу досліджуваних показників входили «суха маса пагона», «вміст хлорофілів».

Концентрацію хлорофілів визначали в отриманій ацетонової витяжці (у патисона — з сім'ядольного листа, у томата — з усього листа) при використанні приладу («Спекол 11», Чехія) [15].

Отримані результати статистично обробляли за Доспеховим [16].

Порівняння хімічної будови молекул БАР проводили за допомогою комп'ютерної програми CS Chem Office Pro. Встановлено хімічну подібність

таких БАР, як кінетин (6'-фурфуріламінопурин) і синтетичний антиоксидант іонол (ВНТ) за такими показниками: потенціал іонізації, енергія вищої зайнятої молекулярної орбіталі, дипольний момент.

Результати і обговорення. Важливим моментом при культивуванні рослинних організмів *in vitro* є оптимізація живильних середовищ, а саме — визначення можливості існування синергізму, що сприятиме більш ефективному використанню поживних речовин та створенню сприятливих умов для росту і розвитку рослин. З цієї метою ми використали програму Chem Office Pro, в результаті чого встановлено, що обидві молекули БАР полярні (дипольний момент більший за 1 Дебай). Це може обумовлювати подібність їхнього транспорту та взаємодії з ліпідами мембран.

Енергії вищих зайнятих молекулярних орбіталей близькі за значенням: $-8,692$ еВ (6'-фурфуріламінопурин) і $-8,795$ еВ (ВНТ). А методами квантової хімії доведено, що значення енергій граничних орбіталей та їхня конфігурація є однією з важливих умов комплексоутворення. Таким чином, ми можемо очікувати утворення даними молекулами подібних комплексів при зв'язуванні з білками, нуклеїновими кислотами тощо.

Такий показник, як «потенціал іонізації», за теоремою Купманса («Квантова хімія»), є аналогом попереднього показника («енергія вищої зайнятої орбіталі»). Але він, на відміну від енергії, яка розраховується квантово-хімічними методами, розраховується емпірично.

Досліджені БАР подібні також і за потенціалом іонізації.

Результати хімічного розрахунку з використанням напівемперичного методу РМЗ (модифікація моделі Остіна; для геометричної оптимізації використано метод наближення векторів (eigen-vector following)) наведено нижче:

6'-фурфуріламінопурин (кінетин)

Теплота утворення, кДж	236,94352
Електронна енергія, еВ	-14659,370603
Ядерно-ядерне відштовхування, еВ	12232,933610
Дипольний момент, Дебай	2,41533
Кількість заповнених рівнів	40
Потенціал іонізації, еВ	8,692027
Енергії молекулярних орбіталей, еВ	
вищої	-8,692
нижчої	-0,445
Молекулярна маса, г/моль	215,214
SCF розрахунки	63
Група симетрії	C_1

3,5-дИБУТИЛ-4-ГІДРОКСИТОЛУОЛ (ВНТ, ІОНОЛ)

Теплота утворення, кДж	-325,24824
Електронна енергія, еВ	-17150,805281
Ядерно-ядерне відштовхування, еВ	14707,918957
Дипольний момент, Дебай	1,31867
Кількість заповнених рівней	45
Потенціал іонізації, еВ	8,794623
Енергії молекулярних орбіталей, еВ	
вищої	-8,795
нижчої	0,317
Молекулярна маса, г/моль	220,354
SCF розрахунки	48
Група симетрії	C ₁

Отримані результати показали, що на середовищі МС + кінетин і МС + ВНТ вміст хлорофілів у листях достовірно перевищував контроль (2,040 ± 0,032; 1,884 ± 0,018 мг/мл відповідно, у контрольному варіанті — 1,297 ± 0,006 мг/мл). При спільному внесенні кінетину і ВНТ відмічено недостатнє підвищення вмісту хлорофілів (таблиця).

Ефективність використання ацетону можна пояснити тим, що він розчиняє стінку рослинної клітини, сприяючи виділенню фітогормонів [10, 12]. На нашу думку, ацетон дає можливість в умовах *in vitro* підвищувати концентрацію CO₂. Тому його позитивний вплив має подвійний ефект.

На рис. 1 показано залежність вмісту хлорофілів а і b у проростках патисона від концентрації ацетону в складі живильного середовища. Максимальний процентний вміст хлорофілів спостерігався при її значенні 10 мл/л. При концентраціях 15—25 мл/л відбувалося зменшення цього показника. Можна припустити, що подальше збільшення концентрації ацетону спричинить зменшен-



Рис. 1. Залежність вмісту хлорофілів у проростках патисона від концентрації ацетону *in vitro*. Різниця між контрольним та дослідним варіантами достовірна при *p ≥ 0,95

Вміст хлорофілів в листях проростків томату *in vitro*

Склад живильного середовища	Вміст хлорофілів,	
	мг/мл	%
МС-середовище	1,297 ± 0,006	0,324
МС + кінетин (3 мг/л)	2,040 ± 0,032***	0,510
МС + іонол (1,3 мг/л)	1,884 ± 0,018***	0,471
МС + кінетин + іонол	1,324 ± 0,017	0,441

Примітка. Різниця між контрольним та дослідним варіантами достовірна при *p = 0,95, **p = 0,99, ***p = 0,999.

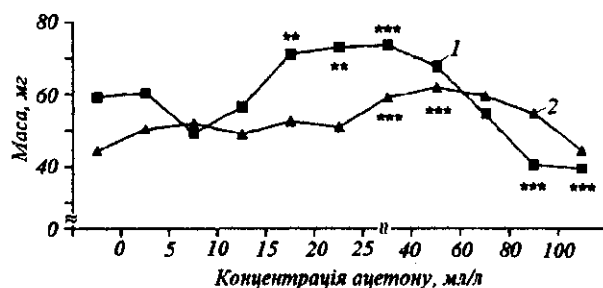


Рис. 2. Вплив ацетону на накопичення сухої маси в проростках кабака (1) і патисона (2) *in vitro*. Різниця між контрольним та дослідним варіантами достовірна при *p = 0,95, **p = 0,99, ***p = 0,999

ня вмісту хлорофілів в рослинах через токсичну дію речовини.

При вивченні впливу ацетону на зміну біометричних показників встановлено, що залежно від культури (патисон, кабак) ефективність його дії була різною. Так, у патисона максимальна маса сухої речовини спостерігалася при концентрації 40—60 мл/л, а в кабака — 20—40 мл/л. При вищих концентраціях ацетону (більше 80 мл/л) відбувалося зменшення величини показника «суха маса» (рис. 2).

Таким чином, отримані результати вказують на те, що не лише кінетин, але й антиоксидант іонол у певних концентраціях підвищують вміст хлорофілів у проростках томата. Це вказує на позитивний вплив антиоксидантів на фотосинтетичні процеси. Подібність хімічної будови кінетину та іонолу свідчить про їхній антагонізм при спільному використанні, що виражається у зменшенні вмісту хлорофілів.

Дія ацетону на рослинний організм залежить

від генотипу та концентрації речовини. Оптимальною концентрацією ацетону при вивченні показника сухої маси рослин є 40—60 мл/л. Рівень вмісту хлорофілів дуже чутливий до зміни концентрації ацетону, що підтверджує висновок щодо фотосинтезу як найменш реактивного процесу до дії токсикантів.

У подальшому вивчення можливості застосування ацетону буде базуватися на його здатності до розкладання в живильному середовищі та синергізмі ацетону з іншими біологічно активними речовинами. Тому механізм його впливу може базуватися не лише на властивостях ацетону як розчинника, але і як продуцента CO_2 в культурі *in vitro*.

A. A. Prosandyeyeva, M. V. Smirnova, I. Yu. Gorbatenko

Effect of some biologically active substances and acetone on chlorophyll content in germ leaves of tomato and Cucurbitaceae *in vitro*

Summary

A possibility to increase the chlorophyll content in *Lycopersicon esculentum* L., *Cucurbita pepo* L. by certain concentrations of kinetin, antioxidant ionol, acetone in medium is shown. Acetone is shown to rise the dry matter content in *Cucurbita pepo*. A similarity in chemical structures of the kinetin and ionol molecules is revealed using the Chem Office Pro program.

A. A. Просандеева, М. В. Смирнова, И. Ю. Горбатенко

Влияние некоторых биологически активных веществ и ацетона на содержание хлорофиллов в листьях проростка томата и патиссона *in vitro*

Резюме

Показана возможность повышения содержания хлорофиллов в проростках томата, кабачка и патиссона при введении в питательную среду определенных концентраций кинетина, антиоксиданта ионола и ацетона. Ацетон повышал содержание сухой массы у патиссона и кабачка. Использование программы Chem Office Pro дало возможность определить подобие химического строения молекул кинетина и ионола.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ганюшкина Л. Г., Музалева Л. Д. Малый практикум по физиологии растений.—Петрозаводск: Изд-во Петрозавод. ун-та, 1973.—С. 220—240.
2. Закарян Н. И., Виробян А. Р. Влияние кинетина и гибберелина на некоторые показатели состояния хлорофиллозного аппарата // Регуляторы роста и развития растений: Тез. докл. II Всесоюз. конф.—М., 1981.—С. 26.
3. Михайлов О. Ф., Бессонова В. П., Корытов А. И. Защитное влияние кинетина при рентгеновском облучении и

заселении // Регуляторы роста и развития растений: Тез. докл. II Всесоюз. конф.—М., 1981.—С. 33.

4. Петренко А. П., Кахнович Л. В., Ходаренко А. А. Влияние кинетина на формирование и состояние фотосинтетического аппарата растений ячменя // Тез. докл. II съезда Всесоюз. о-ва физиологов растений.—М., 1990.—С. 72.
5. Помелов А. В., Морозова Э. В. Особенности гормональной регуляции деятельности фотосинтетического аппарата и накопления НРК в растениях пшеницы при различной обработке кинетином // Регуляторы роста и развития растений: Тез. докл. II Всесоюз. конф.—М., 1981.—С. 37.
6. Бабаджанова М. А., Бакаева Н. П., Мирзорасимов А. К. Влияние кинетина на активность ферментов регенерации и карбоксилирования акцептора CO_2 при фотосинтезе // Второй съезд Всесоюз. о-ва физиологов растений: Тез. докл.—М., 1992.—С. 17.
7. Ростунов А. А., Якушкина Н. И. Влияние цитокинина (6-бензиламинопурина) на интенсивность фотосинтеза и поступление ионов в растения пшеницы // Второй съезд Всесоюз. о-ва физиологов растений: Тез. докл.—М., 1992.—С. 181.
8. Шумилов Н. Г., Пахомова Т. И. Влияние кинетина на фотохимическую активность хлоропластов при разных уровнях влагообеспеченности растений // Регуляторы роста и развития растений: Тез. докл. I Всесоюз. конф.—М., 1981.—С. 51—52.
9. Просандеева А. А., Горбатенко И. Ю. Використання програми CS Chem Office Pro для оптимізації живильних середовищ в технологіях *in vitro* // Вісн. аграр. науки Причорномор'я.—2002.—№ 15.—С. 192—199.
10. Внучкова В. А., Аш О. А. Использование ацетона в составе питательных сред с целью увеличения выхода регенерантов // Докл. Рос. с.-х. академии.—1992.—№ 9—10.—С. 10—13.
11. Горбатенко И. Ю., Смирный В. В. Використання *Shooty*-мутантів *Agrobacterium tumefaciens* та ацетону для підвищення регенераційної активності експлантів томату в культурі тканин *in vitro* // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту (серія Біологія).—2000.—№ 8.—С. 73—76.
12. Эйсер Г. И., Марьяхина И. Я., Шемякин М. Ф. Оптимизация условий регенерации растений *in vitro* для трансформации капусты // Докл. Рос. с.-х. академии.—1992.—№ 11—12.—С. 15—17.
13. Горбатенко И., Новобранець В. Особливості регенерації томату залежно від концентрацій ацетону в живильному середовищі *in vitro* // Природничі науки в школі: 36. наук. праць.—Херсон: Айлант, 2002.—Вип. 1.—С. 5—6.
14. Смирнова М. В., Горбатенко И. Ю. Вплив ацетону на онтогенез проростків патиссона (*Cucurbita pepo* L.) *in vitro* // Таврій. наук. вісн.—2002.—Вип. 21.—С. 23—27.
15. Викторов Д. П. Малый практикум по физиологии растений.—М.: Высш. шк., 1983.—С. 176—190.
16. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов).—М.: Агропромиздат, 1985.—351 с.

УДК 581.74:635.621

Надійшла до редакції 22.05.02