

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 57.053

ВЛИЯНИЕ УДАЛЕНИЯ КОРНЕЙ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНИНОВ
В КЛЕТКАХ АПЕКСА ПОБЕГА АРАБИДОПСИСАГ.Р. Ахиярова^{1,*}, А.В. Коробова¹, С.Ю. Веселов², Г.Р. Кудоярова¹, Д.С. Веселов¹¹Уфимский институт биологии УФИЦ РАН, Россия, 450054, г. Уфа, пр. Октября, д. 69;²кафедра биохимии и биотехнологии, биологический факультет, Башкирский государственный университет, Россия, 450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, д. 32

*e-mail: akhiyarova@rambler.ru

Изучено влияние удаления корней на содержание цитокининов в апексах побегов растений арабидопсиса. Для оценки уровня гормонов в клетках применяли метод иммуногистохимической локализации с использованием антител против рибозидов зеатина. Для предотвращения вымывания цитокининов из клеток в процессе дегидратации применяли дифференциальный метод конъюгирования свободных пуриновых оснований и их рибозидов. Показано, что удаление корней снижает иммунное окрашивание на зеатин клеток апикальной меристемы побега. Выявлено снижение уровня зеатина в клетках апекса побега под влиянием протонофора, что указывает на роль процесса вторично-активного трансмембранного переноса цитокининов в поддержании их уровня в клетках апекса побега.

Ключевые слова: арабидопсис, зеатин, зеатин-рибозид, изопентениладенин, апекс побега, транспорт *It* из корней, иммуногистохимическая локализация

Обнаружение фитогормонов в ксилемном соке растений послужило стимулом для формулировки важной концепции, предполагающей их роль в передаче сигналов из корней в побеги (см. ссылки обзора Кудояровой и соавт. [1]). Проф. О.Н. Кулаева первая показала присутствие в ксилемном соке цитокининподобных соединений, способных задерживать старение листьев [2], что привлекло внимание исследователей к изучению роли цитокининов как корневых сигналов. Было показано изменение концентрации цитокининов в ксилемном соке под влиянием засухи [3] или повышении концентрации нитратов [4], а также при многих других воздействиях [1, 5], что сопровождалось изменением как скорости роста побега и старения листьев, так и транспирации и экспрессии генов цитокининового ответа в листьях. Эти результаты подтверждали значение корневых цитокининов как сигналов, регулирующих функциональную активность побега. Вместе с тем роль цитокининов, синтезируемых в корнях растений, стала предметом дискуссий после того, как экспрессия *IPT*-генов, контролирующей синтез цитокининов, была выявлена не только в корнях, но и в побегах растений [6]. Было высказано предположение о так называемом “паракринном”, т.е. локальном действии цитокининов только в месте их синтеза [7]. Однако этому предположению противоречили данные о пониженном содержании цитокининов в семядольных листьях и соцветиях и их накоплении в корнях растений мутанта по переносчику цитокининов [8]. Поскольку растения мутанта отличались нарушениями функций побега, эти результаты подтверждали функциональную

роль притока цитокининов из корней. Необходимо отметить, что в работах, посвященных роли корневых цитокининов в регуляции функций побега, недостаточно внимания уделялось его апексу. Между тем, важная роль цитокининов в поддержании деления апикальной меристемы побега хорошо известна [9]. Пробелы в сведениях на этот счет, скорее всего, связаны с техническими сложностями определения гормонов в таких мелких структурах, как апикальная меристема побега. В данной работе мы использовали метод иммуногистохимической локализации цитокининов с использованием антител к рибозидам зеатина и изопентениладенозина (ИПА), который хорошо зарекомендовал себя при изучении апикальной меристемы побега [10, 11]. Этот подход обладает преимуществом по сравнению с методом выявления цитокининов с помощью биосенсоров цитокининов, основанном на использовании трансгенных растений, у которых репортерный ген находится под контролем чувствительного к цитокининам промотора. Это преимущество заключается в том, что иммуногистохимическая локализация позволяет оценить относительный уровень гормонов в тканях независимо от чувствительности клеток к цитокинину, от которой зависит их выявление с помощью биосенсоров [12]. В цитируемой работе приведен пример повышения уровня цитокининов при охлаждении растений, выявленного с помощью биосенсора, в то время как содержание цитокининов по результатам их количественной оценки не менялось. Кроме того, разработанная нами модификация опыта позволяла отдельно выявлять на срезах свободные и рибозилированные

формы цитокининов за счет их специфичной фиксации, в то время как при использовании метода биосенсоров репортерные конструкции выявляют преимущественно активные формы цитокининов.

Для оценки вклада переносчиков цитокининов в их накопление в клетках апексов побега был использован протонатор карбонилцианид *m*-хлорофенилгидразона [13], подавляющий функции переносчиков за счет разрушения градиента водорода, являющегося источником энергии для вторично-активного трансмембранного переноса.

Материалы и методы

Выращивание растений. Семена растений арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) экотипа Columbia (Col) проращивали на влажной бумаге в чашках Петри после стратификации в течение 3 сут при 4°C. Затем семена переносили на поверхность песка, находящегося в контейнерах объемом 100 мл и насыщенного питательным раствором Хогланда-Арнона, после чего выращивали в климатической камере (MLR-350H, Sanyo, Япония) при 23°C/19°C (день/ночь), 80%-ной влажности воздуха, освещенности 120 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ фотосинтетически активной радиации и 16-часовом фотопериоде, как описано ранее [14]. Растения получали дистиллированную воду для компенсации транспирационных потерь, которые измеряли, взвешивая контейнеры; влажность песка поддерживали на уровне 60% от полной влагоемкости. В экспериментах с удалением корней растения выращивали в контейнерах с песком в течение 10 сут. Затем их аккуратно переносили в лунки полистироловых планшетов, в дне которых были просверлены отверстия, и микропланшеты помещали в пятилитровые контейнеры, в которых планшеты плавали на поверхности разведенного в десять раз раствора Хогланда-Арнона. Через 2 сут у части растений корни аккуратно отрезали лезвием бритвы, после чего побеги снова опускали в лунки планшета, плавающего на поверхности питательного раствора. Фиксацию побегов для иммунолокализации цитокининов в апексах производили через 2 ч после удаления корней.

В другой серии экспериментов для подавления вторично-активного транспорта побеги 12-суточных растений, выращенных в контейнерах с песком, опрыскивали раствором протонатора карбонилцианида *m*-хлорофенилгидразона в концентрации 10 мкМ. Последующую фиксацию побегов растений арабидопсиса для иммунолокализации цитокининов в апексах производили через 30 мин после опрыскивания растений.

Иммунолокализация цитокининов. Процедура, модифицированная по сравнению с описанной ранее [13], проводилась с помощью антител кролика против цитокининов —рибозида зеатина и ИПА. Сыворотки отличались высокой реактивностью по отношению к производным того азоти-

стого основания цитокинина, к рибозиду которого были получены антитела (соответствующему пуриновому основанию и его рибозиду), и низкой кроссреактивностью по отношению к производным азотистого основания другого цитокинина: сыворотка против рибозида зеатина имела высокую реактивность по отношению к транс-зеатину и низкую — к цис-зеатину и изопентениладенину (ИП) и ИПА, а сыворотка к ИПА — высокую реактивность к ИП и низкую — к зеатину и его рибозиду. Апексы побегов отделяли для раздельной иммунолокализации свободных оснований и их рибозилированных форм с помощью метода их дифференциальной конъюгации с белками тканей перед дегидратацией. Рибозилированные формы конъюгировали с помощью 20мМ периодата натрия, который активирует гидроксильные радикалы рибозы, обеспечивая связывание с белками. Поскольку после связывания рибозилированных цитокининов с помощью периодата натрия проводят постфиксацию тканей смесью альдегидов [15], в результате может происходить связывание не только рибозилированных, но и свободных азотистых оснований с белками. Для того чтобы избежать этого, была использована модифицированная методика [16], которая предотвращает конъюгирование свободных оснований с белками путем повышения pH раствора (до 9,6) во время фиксации тканей листа смесью альдегидов. Детали процедуры заключались в следующем. Для связывания рибозилированных цитокининов с белками растений апексы побегов обрабатывали периодатом натрия и затем фиксировали смесью 4%-ного параформальдегида и 0,1%-ного глутарового альдегида в 50 мМ карбонатном буфере (pH 9,6). Пуриновые остатки свободных цитокининов конъюгировали с белками смесью 4%-ного параформальдегида и 0,1%-ного глутарового альдегида в 100 мМ фосфатном буфере (pH 7,2). Рибозилированные цитокинины при таком способе фиксации (без предварительной обработки периодатом натрия) не связываются с белками [15].

Вслед за фиксацией смесью альдегидов апексы побега дегидратировали в серии разведений этанола (до 96 %). Ткани затем заключали в смолу (JB-4, Electron Microscopy Sciences, США), как рекомендуется производителем. Гистологические срезы (1,5 мкм толщиной) готовили с помощью ротационного микротомы (HM 325, MICROM Laborgeräte, Германия) и помещали на предметные стекла, как описано ранее [13]. Вкратце, срезы инкубировали в течение 30 мин в 100 мМ фосфатном буфере (pH 7,2), содержащем желатин и Твин 20 (ФЖТ), и затем в течение 2 ч во влажной камере при комнатной температуре с сывороткой против рибозида зеатина или ИПА (по 20 мкл на каждый срез в разведении сыворотки 1:80). Проверку специфичности иммунного окрашивания срезов проводили с помощью неиммунной сыворотки в тех же разведениях. Для выявления антител, связанных со свободными основаниями или рибозидами (в зависимости от

способа фиксации), срезы обрабатывали вторичными антителами против иммуноглобулинов кролика, меченных коллоидным золотом (1:40 в ФЖТ, Aurion, США). Затем проводили постфиксацию срезов 2%-ным раствором глутарового альдегида и инкубирование с препаратом серебра в соответствии с рекомендациями производителя (R-Gent SE-EM Silver Enhancement Reagent, Aurion, США) в течение 30 мин. Избыток ионов серебра удаляли, промывая стекла дистиллированной водой, и изучали срезы с помощью светового микроскопа Axio Imager.A1 (Carl Zeiss Jena, Германия), снабженного цифровой камерой (AxioCam MRc5, Carl Zeiss Jena, Германия).

Результаты и обсуждение

Иммунное окрашивание срезов апексов побега растений арабидопсиса на цитокинины с помощью специфических сывороток, имеющих сродство к производным зеатина и ИПА (свободным основаниям и их конъюгатам), выявило присутствие производ-

ных обеих форм цитокининов в клетках апикальной меристемы побега и листовых примордиев (рис. 1). Окрашивание было несколько более интенсивным в случае срезов, фиксированных смесью альдегидов. Этот вариант фиксации обеспечивал конъюгацию и последующее выявление свободных оснований, но не рибозилированных форм цитокининов. Используемые в данной работе антитела были получены к конъюгату белка с рибозидами цитокининов. Однако благодаря специфичности фиксации свободных оснований цитокининов смесью альдегидов (без предобработки периодатом натрия) [15], не происходила конъюгация рибозилированных форм, и они вымывались из тканей в процессе дегидратации. Поэтому при этом варианте фиксации иммуногистохимическая локализация выявляла именно свободные формы цитокининов.

Наши данные соответствуют сведениям, полученным с помощью биосенсоров цитокининов. В этих опытах в апикальной меристеме, листовых примордиях и сосудах побегов также была зарегистри-

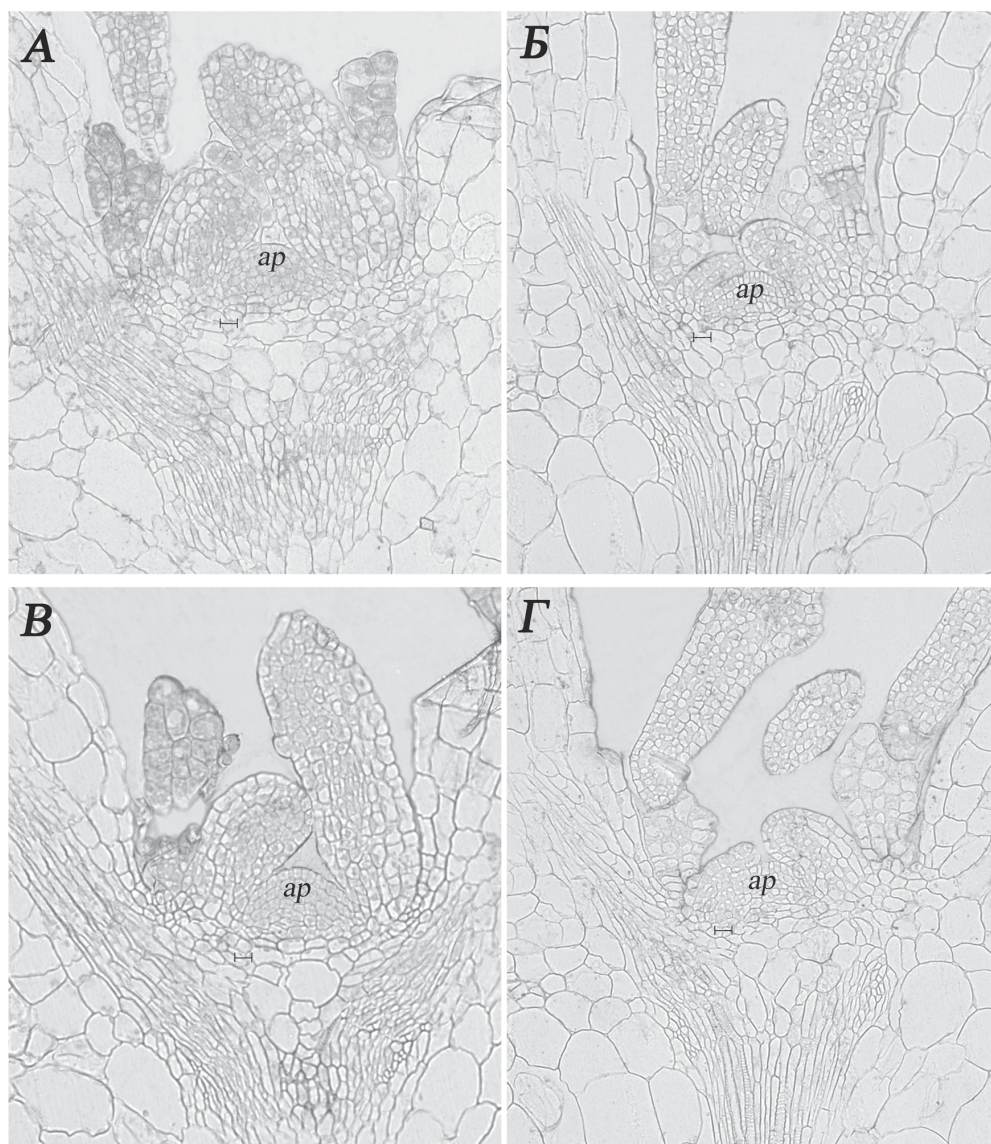


Рис. 1. Иммуногистохимическая локализация зеатина (А), рибозида зеатина (Б), изопентениладенина (В) и изопентениладенозина (Г) в клетках апексов побега растений арабидопсиса. *ap* — апекс. Линейка 10 мкм

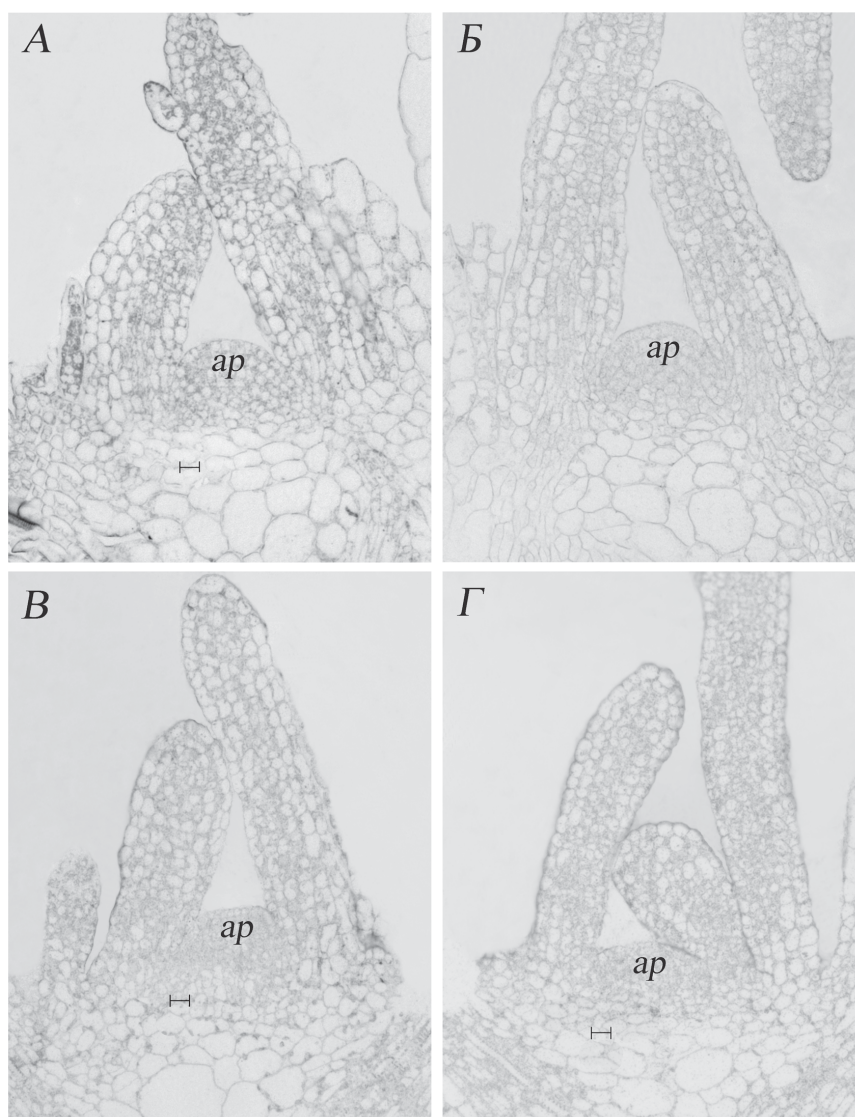


Рис. 2. Иммуногистохимическая локализация цитокининов (А, Б — зеатина, В, Г — рибозида зеатина) в клетках апексов побега растений арабидопсиса в контроле и через 2 ч после удаления корней: А, В — контрольные (интактные) растения, Б, Г — растения с удаленными корнями. **ap** — апекс. Линейка 10 мкм

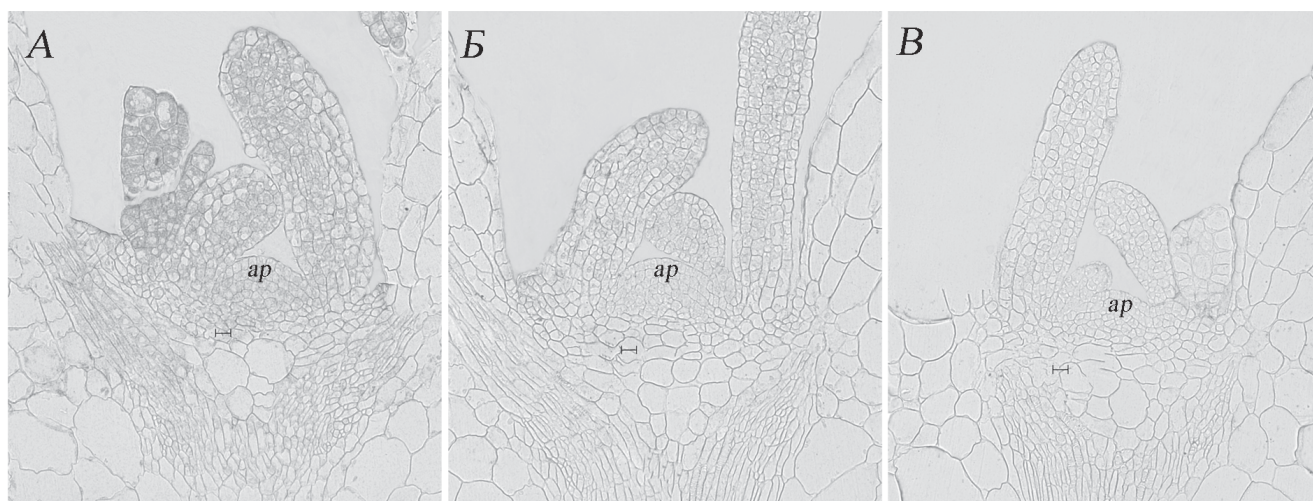


Рис. 3. Влияние обработки протонофором (карбонилцианид *m*-хлорофенилгидразона) на иммуногистохимическую локализацию цитокининов (зеатина) в клетках апексов растений арабидопсиса с помощью сыворотки к рибозиду зеатина: А — контрольное (интактное) растение, Б — через 30 мин после обработки протонофором, В — срез, обработанный неиммунной сывороткой, не содержащей антитела к исследуемым гормонам. **ap** — апекс. Линейка 10 мкм

стрирована повышенная экспрессия GUS-гена, находящегося под контролем чувствительного к цитокининам промотора гена *ARR5* [17]. Вместе с тем преимущество иммуногистохимической локализации заключается в возможности раздельного выявления как свободных, так и рибозилированных форм цитокининов (за счет специфичной для этих форм цитокининов фиксации), а также дифференциального окрашивания на зеатин и изопентениладенин (за счет специфичности антител).

Поскольку наша задача состояла в проверке возможной зависимости накопления цитокининов в апексах побегов от их притока из корней, дальнейшие исследования проводились с помощью антител к рибозиду зеатина (известно, что цитокинины поступают из корней в форме производных зеатина [18]). Из рис. 2А и 2Б видно, что через 2 ч после удаления корней снижалась интенсивность окрашивания срезов, фиксированных с помощью альдегидов. Эти результаты можно интерпретировать как свидетельство зависимости уровня цитокининов в апексе побега растений арабидопсиса от притока цитокининов из корней. Вместе с тем ослабления окрашивания не было зарегистрировано на срезах тканей, фиксированных с помощью периодата натрия (рис. 2В и 2Г). Отсутствие изменений уровня рибозилированных форм цитокининов в клетках апекса побега при удалении корней противоречит предположению о роли транспорта цитокининов из корней в регуляции их уровня в апексе, поскольку именно рибозидам цитокининов приписывается транспортная функция [18]. Альтернативное объяснение могло заключаться в том, что отсутствие корней сказалось на способности самих побегов синтезировать цитокинины (например, за счет уменьшения притока из корней азотсодержащих соединений). Необходимы дальнейшие эксперименты для однозначной интерпретации результатов (например, оценка влияния удаления корней на содержание в апексах ИП и ИПА).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kudoyarova G.R., Dodd I.C., Veselov D.S., Rothwell S.A., Veselov S.Y. Common and specific responses to availability of mineral nutrients and water // J. Exp. Bot. 2015. Vol. 66. N 8. P. 2133–2144.
2. Кулаева О.Н. Влияние корней на обмен веществ листьев в связи с проблемой действия на лист кинетина // Физиол. раст. 1962. Т. 9. № 2. С. 229–239.
3. Kudoyarova G.R., Vysotskaya L.B., Cherkozyanova A., Dodd I.C. Effect of partial rootzone drying on the concentration of zeatin-type cytokinins in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) xylem sap and leaves // J. Exp. Bot. 2007. Vol. 58. N 2. P. 161–168.
4. Sakakibara H., Takei K., Hirose N. Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development // Trends Plant Sci. 2006. Vol. 11. N 9. P. 440–448.
5. Veselov D.S., Kudoyarova G.R., Kudryakova N.V., Kusnetsov V.V. Role of cytokinins in stress resistance of plants // Russ. J. Plant Physiol. 2017. Vol. 64. N 1. P. 15–27.
6. Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate // Plant J. 2004. Vol. 37. N 1. P. 128–138.
7. Faiss M., Zalubilová J., Strnad M., Schmölling T. Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants // Plant J. 1997. Vol. 12. N 2. P. 401–415.
8. Zhang K., Novak O., Wei Z., Gou M., Zhang X., Yu Y., Yang H., Cai Y., Strnad M., Liu C.J. Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins // Nat. Commun. 2014. Vol. 5:3274.
9. Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmölling T. Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity // Plant Cell. 2003. Vol. 15. N 11. P. 2532–2550.
10. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Zaytsev D. Yu., Veselov S.Yu. Changes in distribution of

cytokinins and auxins in cells during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*. 2016. Vol. 52. N 3. 251–264.

11. Corbesier L., Prinsen E., Jacqmar A., Lejeune P., Van Onckelen H., Périlleux C., Bernier G. Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition // *J. Exp. Bot.* Vol. 54. N 392. P. 2511–2517.

12. Jeon J., Kim N.Y., Kim S., Kang N.Y., Novak O., Ku S.J., Cho C., Lee D.J., Lee E.J., Strnad M., Kim J. A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in *Arabidopsis* // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285. N 30. P. 23371–23386.

13. Kudoyarova G.R., Korobova A.V., Akhiyarova G.R., Arkhipova T.N., Zaytsev D.Yu., Prinsen E., Egutkin N.L., Medvedev S.S., Veselov S.Yu. Accumulation of cytokinins in roots and their export to the shoots of durum wheat plants treated with the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) // *J. Exp. Bot.* 2014. Vol. 65. N 9. P. 2287–2294.

14. Korobova A.V., Vysotskaya L.B., Vasinskaya A.N., Kuluev B.R., Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R. Dependence of root biomass accumulation on the content and metabolism of cytokinins in ethylene-insensitive plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. Vol. 63. N 5. P. 536–543.

15. Dewitte W., Chiappetta A., Azmi A., Witters E., Strnad M., Rembur J., Noin M., Chriqui D., Van Onckelen H. Dynamics of cytokinins in apical shoot meristems of a day-

neutral tobacco during floral transition and flower formation // *Plant Physiol.* 1999. Vol. 119. N 1. P. 111–122.

16. Веселов С.Ю., Вальке Р. Раздельное гистохимическое определение гликозилированных форм цитокининов и их свободных оснований у растений табака // Иммуноанализ регуляторов роста в решение проблем физиологии растений, растениеводства и биотехнологии / Под ред. В.А. Вахитова. Уфа: Изд-во АН РБ, 2000. С. 6–11.

17. Aloni R., Langhans M., Aloni E., Dreieicher E., Ullrich C.I. Root-synthesized cytokinin in *Arabidopsis* is distributed in the shoot by the transpiration stream // *J. Exp. Bot.* 2005. Vol. 56. N 416. P. 1535–1544.

18. Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation // *J. Exp. Bot.* 2008. Vol. 59. N 1. P. 75–83.

19. Zürcher E., Liu J., di Donato M., Geisler M., Müller B. Plant development regulated by cytokinin sinks // *Science*. 2016. Vol. 353. N 6303. P. 1027–1030.

20. Cedzich A., Stransky H., Schulz B., Frommer W.B. Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures // *Plant Physiol.* Vol. 148. N 4. P. 1857–1867.

Поступила в редакцию
07.03.2018

Принята к печати
05.06.2018

PLANT PHYSIOLOGY

EFFECTS OF ROOT CUTTING ON CYTOKININ CONTENT IN THE CELLS OF SHOOT APIX OF ARABIDOPSIS PLANTS

G.R. Akhiyarova^{1,*}, A.V. Korobova¹, S.Yu. Veselov², G.R. Kudoyarova¹, D.S. Veselov¹

¹Ufa Institute of Biology, RAS, pr. Octyabrya 69, Ufa, 450054, Russia;

²Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Biology, Bashkir State University, Russia,
Zaki Valedi str. 32, Ufa, 450076, Russia

*e-mail: akhiyarova@rambler.ru

We studied the dependence of cytokinins accumulation in the shoot apices of *Arabidopsis* plants on the delivery of these hormones from the roots. For the estimation of cytokinins content in the cells the method of immunohistochemical localization was used using antibodies against zeatin riboside. To prevent washing of cytokinins during the process of dehydration we used the method of differential conjugation of free cytokinins bases and their ribosides. Root cutting has been shown to weaken the immunostaining of zeatin in the cells of the shoot apical meristem thereby supporting the hypothesis about dependence of cytokinins accumulation in these cells on the hormone delivery from the roots. We detected a decline in the level of cytokinins in the cells of the shoot apex as affected by protonophor indicating important role of the process of secondary active transport through the cell membrane for the maintenance of cytokinins level in the cells of the shoot apex.

Keywords: *Arabidopsis*, zeatin, zeatin riboside, isopenteniladenin, shoots apex, transport from the roots, immunohistochemical localization

Сведения об авторах

Ахиярова Гузель Рифовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории физиологии растений Уфимского института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-53-62; e-mail: akhiyarova@rambler.ru

Коробова Алла Владимировна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории физиологии растений Уфимского института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-53-62; e-mail: muksin@mail.ru

Веселов Станислав Юрьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биохимии и биотехнологии биологического факультета Башкирского государственного университета. Тел.: 8-347-272-46-33; e-mail: respectableman@yandex.ru

Кудоярова Гюзель Радомесовна — докт. биол. наук, зав. лабораторией физиологии растений Уфимского института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-53-62; e-mail: guzel@anrb.ru

Веселов Дмитрий Станиславович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории физиологии растений Уфимского института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-53-62; e-mail: veselov@anrb.ru