

ФАУНА, ФЛОРА

УДК 581.144.2:581.151

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НИТРАТА И АБК
В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА БОКОВЫХ КОРНЕЙ *ZEА MAYS* L.

Е.С. Сидоренко, Е.В. Харитонашвили

(кафедра физиологии растений; e-mail: kleo80@yandex.ru)

Скорость роста боковых корней (БК) 7–8-дневных проростков кукурузы зависит от присутствия в среде NO_3^- , NO_2^- и АБК. Экспозиция в течение 4 ч на NO_3^- в диапазоне концентраций 0,01–1,5 мМ увеличивает относительную скорость роста БК; в этом же диапазоне NO_2^- стимулирует рост БК только при 0,01 мМ. Экзогенная 10^{-6} М АБК ингибирует рост БК. При совместном воздействии на корни нитрата и АБК либо нитрита и АБК характер ответной ростовой реакции различается. Предлагается гипотетическая схема участия NO в регуляции роста БК.

Ключевые слова: NO_3^- , NO_2^- , АБК, рост боковых корней, *Zea mays* L.

Изменения морфологии корневой системы в процессе роста и развития являются важной особенностью растений, поскольку такая пластичность позволяет им приспосабливаться к условиям среды, в частности к доступности минеральных элементов в почве [1]. Программы формирования корневой системы находятся в первую очередь под гормональным контролем. Хорошо известно, что основной регулятор морфогенеза корня — ауксин. В последние годы появились новые данные о роли “стрессового” гормона АБК в регуляции нормального развития корня растений [2], причем действие АБК проявляется независимо от ауксина [3].

Факторы минерального питания также выступают регуляторами роста и развития корня. Экспериментально хорошо обосновано, что низкие концентрации NO_3^- в среде оказывают локальное стимулирующее действие на рост корней *Arabidopsis*, а высокие — приводят к системному ингибированию роста [4]. Ранее нами показано стимулирующее действие низких концентраций NO_3^- на рост боковых корней (БК) кукурузы (*Zea mays* L.) [5].

С помощью молекулярно-генетического анализа установлено, что NO_3^- , подобно другим сигнальным молекулам, индуцирует значительные изменения на уровне транскрипции генов [6]. Рецепция и пути передачи нитратного сигнала интенсивно изучаются [7–9]. Выявлены некоторые участники трансдукции NO_3^- сигнала, в частности — транскрипционные факторы (ANR1 и NLP7) и белок NRT1.1 (CHL1), обладающий транспортной и рецепторной функциями [7–9]. С высокой степенью вероятности можно ожидать, что сигнальный каскад, запускаемый NO_3^- , пересекается с каскадами гормональной природы. Появились сообщения о взаимодействии NO_3^- и АБК

в регуляции роста корня [3, 10]. У растений арабидопсис (*Arabidopsis thaliana* L.), мутантных по генам биосинтеза АБК (генотипы *aba1-1*, *aba2-3*, *aba2-4* и *aba3-2*), стимулирующее действие низких концентраций NO_3^- на рост боковых корней проявлялось слабее по сравнению с диким типом. У нечувствительных к АБК растений (генотипы *abi4* и *abi5*) наблюдали гиперэффект NO_3^- на рост корней. На основании этих результатов было сделано заключение, что определенный уровень эндогенной АБК необходим для формирования ростового ответа БК при стимуляции низкими концентрациями NO_3^- [10]. Высокие концентрации NO_3^- не подавляли рост БК ни у мутантов с нарушениями биосинтеза АБК, ни у нечувствительных к гормону растений [11]. Таким образом, АБК участвовала в развитии ответной реакции корней арабидопсис как на низкие, так и на высокие концентрации нитрата.

После поступления в клетку NO_3^- восстанавливается до NO_2^- , потом до NH_4^+ и быстро включается в состав аминокислот. Теоретически продукты восстановления NO_3^- также могут обладать сигнальными свойствами. Однако у двойных мутантов арабидопсис по нитратредуктазе *nia1nia2* ответ на NO_3^- сохранялся [7, 12], что исключает участие в ростовом ответе продуктов восстановления NO_3^- . Тем не менее установлено, что NO_2^- наряду с NO_3^- влияет на уровень экспрессии многих генов корней арабидопсис [13, 14]. Молекулярно-генетический ответ на действие NO_2^- шире, чем на действие NO_3^- : NO_2^- активирует 384 гена, NO_3^- — только 270; NO_2^- ингибирует 497 генов, NO_3^- — только 341 [13]. 80% индуцируемых NO_3^- генов также проявляют чувствительность к NO_2^- . Среди репресслируемых нитратом генов такой чувствительностью обладала половина. Однако in planta сигнальная роль NO_2^- не исследовалась.

В нашей работе было проведено сравнительное исследование сигнальной роли нитрата и нитрита для роста боковых корней растений кукурузы (*Zea mays* L.), а также их взаимодействие с АБК в регуляции роста боковых корней.

Методика исследования

Растения кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Катарина выращивали при интенсивности света 100 Вт/м², фотопериоде 16/8 ч и температуре 25/18°. Семена проращивали в темноте во влажной камере при 27° двое суток, проростки высаживали в сосуды, предварительно удалив придаточные корни. Были использованы питательные растворы модифицированной смеси Прянишникова 0,5 нормы, источник N — 0,75 мМ (NH₄)₂SO₄ (NH₄⁺-вариант). pH среды поддерживали на уровне 6,0. В специальной серии опытов растения выращивали на растворе Прянишникова NH₄⁺-варианта с добавлением 0,01 мМ KNO₃ (KNO₂), 10⁻⁶ М АБК или с добавлением и АБК, и KNO₃ (KNO₂). Питательный раствор меняли ежедневно. В опытах с нитропруссидом натрия (SNP) проростки выращивали на растворе Прянишникова NH₄⁺-варианта с добавлением 1 или 10 мкМ SNP.

Эксперименты с кратковременным экспонированием: растения NH₄⁺-варианта в возрасте 6 дней, когда появлялись видимые невооруженным глазом зачатки БК, переносили на раствор Прянишникова NH₄⁺-варианта с добавлением KNO₃ или KNO₂ в концентрации 0,01, 0,1 или 1,5 мМ. Время экспозиции составляло 4 ч. После экспозиции корни промывали дистиллированной водой и проростки переносили на исходный питательный раствор. Измерение длины БК проводили через 24 и 48 ч после экспозиции.

Длину БК определяли с помощью фотографирования общего вида корня или участка корня с несколькими БК на установке с бинокляром и последующей обработкой изображений в программе AxioVision 4.7. Для определения относительной скорости роста (ОСР) БК их фотографировали каждый час в течение 4–5 ч.

ОСР БК рассчитывали по стандартной формуле:

$$\text{ОСР} = 1/L_n \times dL/dt, \quad (1)$$

где L_n — длина БК в предыдущий момент времени [15]. ОСР рассчитывали для 5–6 БК на корне одного растения, для двух растений каждого варианта в опыте.

Все опыты проводили в трех биологических повторностях, количество растений в опыте составляло от 6 до 30. Бары на рисунках означают стандартную ошибку.

Результаты и их обсуждение

Ростовой ответ БК на кратковременное воздействие NO₃⁻ и NO₂⁻ оценивали по ОСР БК. Спустя

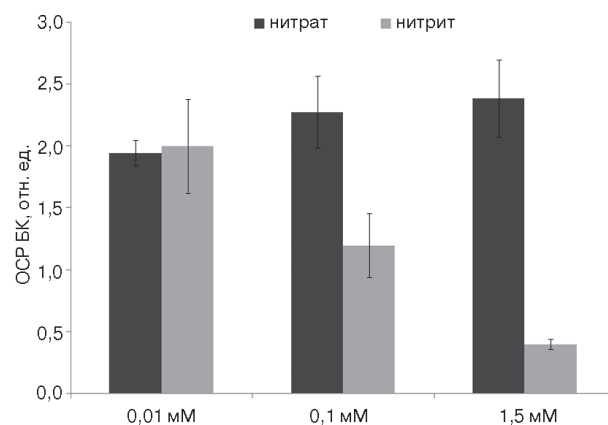


Рис. 1. Относительная скорость роста БК *Zea mays* L. в зависимости от концентрации нитрата и нитрита в среде Прянишникова NH₄⁺-варианта через 48 ч после 4 ч экспозиции. Данные стандартизованы относительно растений NH₄⁺-варианта, показатели которых приняты за отн. ед.

48 ч после 4 ч экспозиции на NO₃⁻ было зафиксировано ускорение роста БК, причем ОСР БК в диапазоне 0,01–1,5 мМ была одинаковой и превышала показатели контрольных растений примерно в 2 раза (рис. 1). Действие NO₂⁻ при экспонировании заметно отличалось от действия NO₃⁻ и зависело от концентрации: 0,01 мМ стимулировала рост БК, 0,1 мМ не оказывала действия на ОСР, а присутствие в среде 1,5 мМ значительно снижало скорость роста БК по сравнению с контролем. Традиционно считается, что NO₂⁻ токсичен для клеток и не накапливается в тканях растений. Однако недавние исследования показали, что растения не проявляют признаков токсичности при выращивании на средах с содержанием NO₂⁻ в пределах 5 мкМ–5 мМ [13]. По нашим данным, наименьшая из исследованных концентраций 0,01 мМ KNO₂ при кратковременном воздействии обладала выраженным стимулирующим эффектом, сравнимым с эффектом NO₃⁻ (рис. 1).

При постоянном присутствии в растворе выращивания малых “эффективных” концентраций 0,01 мМ KNO₃ и 0,01 мМ KNO₂ длина БК у 7-дневных проростков NO₂⁻-варианта была даже больше, чем у проростков NO₃⁻-варианта (рис. 2). При выращивании в присутствии 10⁻⁶ М АБК рост БК растений NH₄⁺-варианта значительно подавлялся. Это был ожида-

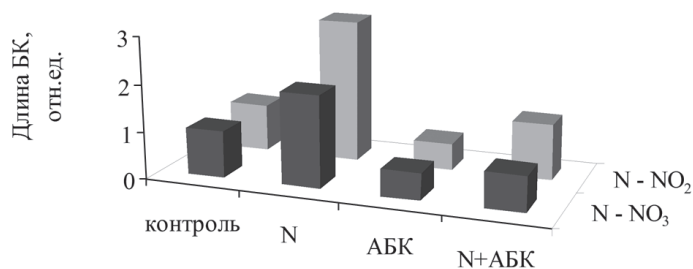


Рис. 2. Длина БК *Zea mays* L. в зависимости от присутствия АБК, нитрата и нитрита в среде выращивания. Данные стандартизованы относительно растений NH₄⁺-варианта, показатели которых приняты за отн. ед.

емый ингибирующий эффект АБК, который наблюдали ранее, в частности у арабидопсис [10]. При совместном действии NO_3^- и АБК на проростки кукурузы стимулирующий эффект нитрата снимался и рост БК был сравним с вариантом, когда наблюдали ингибирование под действием только АБК (рис. 2). При совместном действии NO_2^- и АБК стимулирующий эффект нитрита снимался, достигая контрольных значений, но ингибирования роста БК не проявлялось (рис. 2). Эти результаты позволяют заключить, что рост БК регулируется экзогенными нитратом, нитритом и АБК, но не позволяют сделать вывод об их взаимодействии в этой регуляции. Однако на основании литературных данных можно предположить, что оксид азота (NO) участвует в этой регуляции.

В настоящее время считается, что молекула NO является универсальным регулятором роста растений, участвующим во всех стадиях развития от прорастания до плодоношения [16, 17]. Оксид азота может образовываться эндогенно из нитрата и нитрита. В качестве продуцентов NO в растительной клетке рассматриваются нитратредуктаза (НР) [18], нитрит- NO -оксидоредуктаза (Ni-NOR) [19], а также NO -ассоциированные белки (AtNOA1) [20]. НР может генерировать оксид азота из нитрита в NAD(P)H -зависимой реакции. Ni-NOR — белок, локализованный в плазмалемме клеток корня, также образует NO из нитрита. Многие исследователи справедливо, на наш взгляд, считают NO участником трансдукции NO_3^- сигнала [16].

Однако существуют данные об участии NO в системе передачи гормонального сигнала АБК, например при закрывании устьиц [21]. Возможно, NO также действует на уровне белков рецепторов каскада раннего ответа на АБК [20]. Наконец, тройные мутанты арабидопсис *nia1nia2noa1-2*, имеющие очень низкий уровень эндогенного NO , демонстрировали нарушения развития корневой системы, а также повышенную чувствительность к АБК, которая снижалась при добавлении экзогенного оксида азота [17].

Распространенной тест-системой выявления участия NO в том или ином процессе является генератор NO — нитропруссид натрия (SNP) или пара SNP/PTIO (источник NO /нейтрализатор NO) [22, 23]. Мы использовали SNP в качестве источника экзогенного NO в питательном растворе. При выращивании растений в присутствии 1 мкМ SNP наблюдали возрастание длины БК в 1,6 раза по сравнению с контролем, что было сравнимо в количественном отношении с эффектами нитрата и нитрита. Высокая же концентрация SNP (10 мкМ) ингибировала рост БК в 2,2 раза относительно контрольных растений.

Парадоксальный эффект возник при кратковременной (4 ч) экспозиции растений *Zea mays* L. на 10 мкМ SNP (рис. 3): рост БК ускорялся при видимых нарушениях геотропизма. В работе с проростками кукурузы с помощью флуоресцентных антител были визуализированы реорганизационные перестрой-



Рис. 3. Внешний вид корней проростков *Zea mays* L. в контроле (NH_4^+ -вариант) и через 24 ч после 4 ч экспозиции на среду Прянишникова NH_4^+ -варианта с 10 мкМ SNP. 4,8× увеличение

ки актинового цитоскелета в результате обработки корней экзогенным SNP [24]. Возможно, наблюдаемый нами эффект — тоже результат изменения активности цитоскелета в клетках кончика БК (рис. 3).

Для объяснения наблюдаемых эффектов NO_3^- , NO_2^- и абсцизовой кислоты на рост боковых корней мы предлагаем следующую гипотезу (рис. 4). Предположительно, в присутствии NO_3^- уровень эндогенного оксида азота повышается, поскольку он образуется из нитрита — продукта восстановления нитрата, и наблюдается стимулирование роста боковых корней. NO_2^- , являясь непосредственным предшественником NO , также стимулирует рост боковых корней, но лишь в низких концентрациях. При увеличении концентрации NO_2^- образуется избыточное количество оксида азота, что вызывает ингибирование роста корней. При действии экзогенной АБК уровень NO в клетках корня также повышается до значений, ингибирующих рост БК.

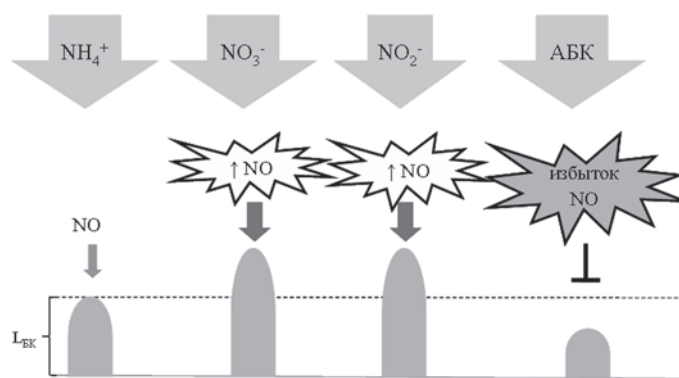


Рис. 4. Гипотетическая схема регуляции роста БК нитратом, нитритом и АБК через образование оксида азота. Повышение содержания оксида азота стимулирует рост БК, избыточное образование NO — ингибирует

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hodge A. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients // *New Phytologist*. 2004. Vol. 162. N 2. P. 9–24.
2. Новикова Г.В., Степанченко Н.С., Носов А.В., Мошков И.Е. В начале пути: восприятие АБК и передача ее сигнала у растений // *Физиол. раст.* 2009. Т. 56. № 6. С. 806–823.
3. De Smet I., Zhang H., Inzé D., Beeckman T. A novel role for abscisic acid emerges from underground // *Trends Plant Sci.* 2006. Vol. 11. N 9. P. 434–439.
4. Zhang H., Jennings A., Barlow P., Forde B. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate // *Plant Biology*. 1999. Vol. 96. N 11. P. 6529–6534.
5. Сидоренко Е.С., Харитонашвили Е.В. Нитрат-ион — сигнал для роста и развития корневой системы // *Агрохимия*. 2011. № 7. С. 38–43.
6. Scheible W.-R., Morcuende R., Czechowski T., Fritz C., Osuna D., Palacios-Rojas N., Schindelasch D., Thimm O., Urdavari M.K., Stitt M. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen // *Plant Physiol.* 2004. Vol. 136. N 1. P. 2483–2499.
7. Zhang H., Forde B. An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture // *Science*. 1998. Vol. 279. P. 407–409.
8. Castaings L., Camargo A., Pocholle D., Gaudon V., Texier Y., Boutet-Mercey S., Taconnat L., Renou J.-P., Daniel-Vedele F., Fernandez E., Meyer C., Krapp A. The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2009. Vol. 57. N 3. P. 426–435.
9. Krouk G., Crawford N., Coruzzi G., Tsay Y.-F. Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments // *Current Opinion in Plant Biology*. 2010. Vol. 13. N 3. P. 1–8.
10. De Smet I., Signora L., Beeckman T., Inzé D., Foyer C.H., Zhang H. An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis* // *Plant J.* 2003. Vol. 33. N 3. P. 543–555.
11. Signora L., De Smet I., Foyer C.H., Zhang H. ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2001. Vol. 28. N 6. P. 655–662.
12. Wang R., Tischner R., Gutierrez R.A., Hoffman M., Xing X., Chen M., Coruzzi G., Crawford N.M. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2004. Vol. 136. N 1. P. 2512–2522.
13. Wang R., Xing X., Crawford N. Nitrite acts as a transcriptome signal at micromolar concentrations in *Arabidopsis* roots // *Plant Physiol.* 2007. Vol. 145. N 4. P. 1735–1745.
14. Vidal E.A., Gutiérrez R.A. A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in *Arabidopsis* // *Current Opinion in Plant Biology*. 2008. Vol. 11. N 5. P. 521–529.
15. Бидл К.Л. Анализ роста растений // Фотосинтез и биопродуктивность: методы определения / Под ред. и с предисл. А.Т. Мокроносова. М.: Агропромиздат, 1989. 460 с.
16. Красиленко Ю.А., Емец А.И., Блюм Я.Б. Функциональная роль оксида азота у растений // *Физиол. раст.* 2010. Т. 57. № 4. С. 483–494.
17. Lozano-Juste J., Leon J. Nitric oxide modulates sensitivity to ABA // *Plant Signaling & Behavior*. 2010. Vol. 5. N 3. P. 314–316.
18. Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., Kaiser W. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro // *J. Experiment. Bot.* 2002. Vol. 53. N 366. P. 103–110.
19. Stohr C., Stremlau S. Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots // *J. Experiment. Bot.* 2006. Vol. 57. N 3. P. 463–470.
20. Lozano-Juste J., Leon J. Enhanced abscisic acid-mediated responses in *nialnia2noal-2* triple mutant impaired in NIA/NR- and AtNOA1 dependent nitric oxide biosynthesis in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2010. Vol. 152. N 2. P. 891–903.
21. Desikan R., Griffiths R., Hancock J., Neill S. A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2002. Vol. 99. N 25. P. 16314–16318.
22. Garcia-Mata C., Lamattina L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress // *Plant Physiol.* 2001. Vol. 126. N 3. P. 1196–1204.
23. Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D., Wilson I. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress // *J. Experiment. Bot.* 2008. Vol. 59. P. 165–176.
24. Kasprówsz A., Szuba A., Volkmann D., Baluska F., Wojtaszek P. Nitric oxide modulates dynamic actin cytoskeleton and vesicle trafficking in a cell type-specific manner in root apices // *J. Experiment. Bot.* 2009. Vol. 60. P. 1605–1617.

Поступила в редакцию
19.05.11

NITRATE AND ABA INTERACTION IN REGULATION OF LATERAL ROOT ELONGATION IN *ZEAMAYS* L.

E.S. Sidorenko, E.V. Kharitonashvili

Lateral root (LR) elongation rate depends on NO_3^- , NO_2^- and ABA availability in the nutrient solution. Short-term exposure on 0,01–1,5 mM KNO_3 stimulates LR elongation rate; in experiments with KNO_2 only 0,01 mM stimulates LR elongation rate. Exogenous 10^{-6} M ABA inhibites

LR growth. Simultaneous effects of NO_3^- and ABA or NO_2^- and ABA on LR elongation rate are different. Role of endogenous NO in regulation of LR elongation is discussed.

Key words: NO_3^- , NO_2^- , ABA, lateral root elongation, *Zea mays* L.

Сведения об авторах

Сидоренко Екатерина Сергеевна — науч. сотр. кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-42-55; e-mail: kleo80@yandex.ru

Харитонашвили Елена Владимировна — канд. биол. наук, доцент кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-42-55; e-mail: evkhou@mail.ru