

УДК 581.1

## **ЗАВИСИМОСТЬ РОСТА ПОБЕГОВ И КОРНЕЙ, А ТАКЖЕ СОДЕРЖАНИЯ И МЕТАБОЛИЗМА ЦИТОКИНИНОВ ОТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ РАСТЕНИЙ АРАБИДОПСИСА К ЭТИЛЕНУ**

© 2011 А.Н. Васинская, А.В. Коробова, Г.Р. Кудоярова

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 01.07.2011

В настоящей работе проведено сравнительное изучение роста побегов и корней, а также содержания и метаболизма цитокининов у растений арабидопсиса исходной линии *Columbia* и их этилен-нечувствительных мутантных растений *ETR-1*. Показано, что этилен способен снижать содержание цитокининов и тем самым поддерживает накопление биомассы корней, тогда как влияние цитокининов на этот процесс происходит, по-видимому, без вовлечения этилена. Сделан вывод о том, что торможение удлинения корней цитокининами происходит с помощью этиленового сигналинга.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana*; *etr-1*; этилен; цитокинины; рост корней.

Цитокинины, гормоны растений, участвуют в регуляции множества физиологических процессов на протяжении всего онтогенеза растений [1, 2]. Одним из важнейших эффектов этих гормонов является их способность воздействовать на рост побегов и корней растений. Известно, что цитокинины могут стимулировать рост и развитие побега и ингибировать эти процессы у корня [3, 4]. Таким образом, происходит увеличение соотношения массы побега и корня. Есть данные, что влияние цитокининов на рост растений может быть опосредовано через другой фитогормон этилен [5, 6].

Фитогормон этилен играет важную роль в регуляции роста, развития и адаптации растений к условиям обитания [7-9]. Важную роль в действии этилена на растения может играть его способность влиять на концентрацию других соединений. В литературе обсуждается взаимодействие этилена и абсцизовой кислоты (АБК), а также этилена и ауксинов в регуляции роста растений [9, 10]. Взаимовлиянию этилена и цитокининов в регуляции физиологических процессов в растениях уделяется мало внимания, поэтому представляет интерес изучение возможного взаимовлияния цитокининов и этилена в регуляции роста растений.

Целью работы было выявление роли этилена в накоплении биомассы побега и корня и их соотношения, а также взаимовлияния цитокининов и этилена в регуляции роста растений.

### **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

Объектом исследования служили 4-недельные растения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) исходной линии (*Columbia*) и их этиленнечувствительные мутанты (*etr-1*).

Для синхронизации прорастания семена на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри помещали в холодильную камеру на 3 сут. Растения выращивали в климатической

камере при освещенности 120  $\mu\text{моль фотонов}/(\text{м}^2 \text{с})$ , температуре 23°C днем и 19°C ночью, продолжительности светового периода 16 ч.

После прорастания семян относительную влажность песка поддерживали на уровне 65%.

В возрасте 28 сут у растений определяли сырую массу побегов и корней и фиксировали их в 80%-ном этаноле для экстракции цитокининов.

Экстракцию, очистку и концентрирование цитокининов проводили как описано ранее [11]. Концентрацию цитокининов в побегах и корнях растений определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа, используя антитела к рибозиду зеатина, имеющие также высокую кросс-реактивность к зеатину и зеатиннуклеотиду [12].

Для определения активности цитокининоксидазы использовали метод деградации изопентениладенозина (ИПА) в присутствии белкового экстракта из растительной ткани.

Растительный материал гомогенизировали в холодном (6°C) 0.1М имидазол(НСI-буфере (рН 7.1)). Гомогенат центрифугировали при 12 000 г в течение 25 мин. Белки из супернатанта осаждали добавлением равного объема насыщенного раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и центрифугировали при 5000 г в течение 15 мин. Осадок ресуспензировали в имидазол-НСI-буфере (рН 7.1). Далее 50  $\mu\text{л}$  препарата добавляли к 50  $\mu\text{л}$  смеси, содержащей стандарт ИПА и имидазол(НСI-буфер (рН 7.1) в конечной концентрации 0.04(0.06 М. Для контроля в смесь вместо белкового препарата добавляли 50  $\mu\text{л}$  соответствующего буфера.

Реакционные смеси инкубировали в термостате при 37°C в течение 3 ч. Реакцию останавливали добавлением 0.2 мл холодного этанола, и смесь центрифугировали при 5000 г в течение 10 мин. Содержание ИПА в супернатанте оценивали с помощью иммуноферментного анализа в тест-системе для определения изопентениладенозина/изо-пентениладенина [13].

Статистическую обработку проводили по стандартным программам MS Excel.

Васинская Анна Николаевна, e-mail: link\_87@mail.ru;

Коробова Алла Владимировна, канд. биол. наук, e-mail: muksin@mail.ru; Кудоярова Гюзель Радомесовна, докт. биол. наук, проф., e-mail: guzel@anrb.ru

На рисунках и в тексте представлены средние значения и стандартная ошибка показателей из трех и более биологических повторов (n).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что этилен является ингибитором роста корней в длину [10, 14].

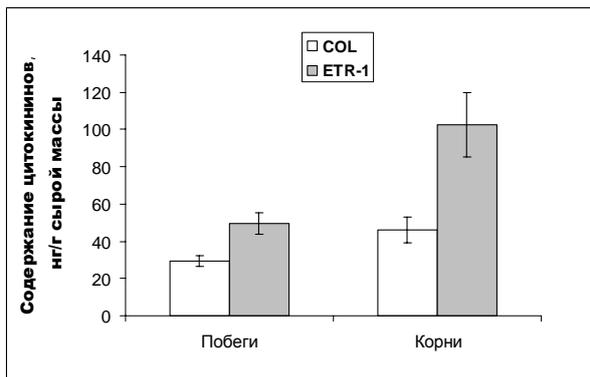
**Таблица.** Длина корней, масса сырого вещества побегов и корней, соотношение массы побег/корень 28-дневных растений арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) дикого типа (COL) и их этиленнечувствительных мутантов (ETR-1), n = 30

Показатель	Линии арабидопсисов	
	COL	ETR-1
Длина корней, мм	84,94±5,08	100,4±6,09
Масса побегов, г	0,042±0,006	0,037±0,004
Масса корней, г	0,025±0,003	0,012±0,001
Соотношение массы побег/корень	1,689	3,125

линии. Следовательно, можно предполагать, что этилен, хотя и ингибирует удлинение корней, в то же время необходим для поддержания накопления их биомассы.

Потеря чувствительности растений к этилену не влияла на накопление массы побегов (табл.). Таким образом, у нечувствительных к этилену растений наблюдалось увеличение соотношения массы побега и корня, что свидетельствует об относительной активации роста побега по сравнению с корнями у мутантных растений в сравнении с исходными (табл.).

Такая реакция является характерным ответом растений на цитокинины [15, 16]. Важно то, что по сравнению с растениями исходного генотипа у мутантных растений мы действительно наблюдали повышение содержания цитокининов, особенно ярко выраженное в их корнях (рис. 1).



**Рис. 1.** Содержание цитокининов в побегах и корнях 28-дневных растений арабидопсиса дикого типа (COL) и их этиленнечувствительных мутантов (ETR-1), n = 3

В литературе есть сведения о способности этилена активировать распад цитокининов [6]. Поэтому неудивительно, что мы обнаружили повышенное содержание цитокининов у растений, нечувствительных к этилену. Известно, что избыточные концентрации цитокининов подавляют рост и раз-

Это подтверждается в нашем опыте: корни нечувствительных к этилену мутантных растений были длиннее, чем у растений исходной линии (табл.).

Масса корней у мутантных растений была достоверно меньше, чем у растений исходной

витие корневой системы [17]. Можно было предполагать, что этилен способствует накоплению биомассы корней растений через нормализацию уровня цитокининов и предотвращение их чрезмерного накопления.

Известно, что распад цитокининов катализирует фермент цитокининоксидаза [13, 18]. Мы оценили активность этого фермента у растений двух генотипов. В наших экспериментах активность цитокининоксидазы у нечувствительных к этилену растений также была выше, чем у растений исходного типа (рис. 2). Поэтому более высокое содержание цитокининов у растений потерявших чувствительность к этилену не могло быть следствием изменения активности цитокининоксидазы. Скорее оно могло быть его причиной. По литературным данным активность цитокининоксидазы может повышаться вслед за увеличением концентрации эндогенных цитокининов [18]. Следовательно, и в наших экспериментах происходила субстратная регуляция активности фермента. Снижение уровня цитокининов под влиянием этилена могло быть связано с необратимой конъюгацией цитокининов или ингибированием их синтеза.

Наши результаты помогают лучше понять механизм действия цитокининов на рост корней. По данным литературы, эти гормоны тормозят как накопление биомассы, так и удлинение корней [17]. Однако в наших опытах у мутантных растений, потерявших чувствительность к этилену, накопление цитокининов в корнях не сопровождалось торможением их удлинения. Наоборот, они были длиннее, чем у растений исходной линии. Следовательно, наши результаты подтверждают, что способность цитокининов подавлять удлинение корней осуществляется через этилензависимый каскад [19]. Вместе с тем, цитокинины подавляли накопление биомассы корней у нечувствительных к этилену мутантов. Эти результаты указывают на то, что это свойство цитокининов является этиленнезависимым.

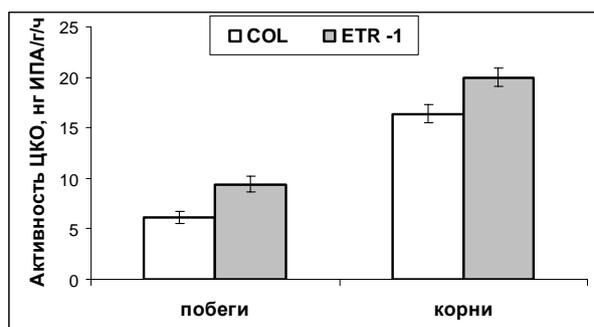


Рис. 2. Активность цитокинооксидазы в побегах и корнях 28-дневных растений арабидопсиса дикого типа (COL) и их этиленнечувствительных мутантов (ETR-1), n = 3

Таким образом, этилен способен ингибировать удлинение корней, однако он, по-видимому, необходим для поддержания накопления массы корней. Это может быть связано с его способностью ограничивать накопление цитокининов в растениях. С другой стороны, снижение прироста массы корней у нечувствительных к этилену растений на фоне повышенного содержания эндогенных цитокининов может говорить о том, что ингибирующее влияние цитокининов на этот процесс, по-видимому, не связано с этиленовым сигналингом.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кулаева О.Н. Цитокинины, их структура и функции. М.: Наука, 1973. 264 с
2. Haberer, Kieber. Cytokinins. New Insights into a Classic Phytohormone // Plant Physiology. 2002. V. 128. P. 354-362
3. Mok D.W.S., Mok M.C. Cytokinin metabolism and action // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 2001. V. 52. P. 89-118.
4. Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kozuka J. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme // Nature. 2007. V. 445. P. 652-655.
5. Cary A.J., Liu W., Howell S.H. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings // Plant Physiology. 1995. V. 107. P. 1075-1082.

6. Taverner E., Letham D.S., Wang J. et al. Influence of ethylene on cytokinin metabolism in relation to *Petunia corolla* senescence // Phytochemistry. 1999. V. 51. P. 341-347.
7. Pierik R., Sasidharan R., Voeseek L.A.C.J. Growth control by ethylene: adjusting phenotypes to the environment // J. Plant Growth Regulation. 2007. V. 26. P. 188-200.
8. Vandenbussche F., van der Straeten D. One for all and all for one: cross-talk of multiple signals controlling the plant phenotype // J. Plant Growth Regulation. 2007. V. 26. P. 178-187.
9. Ракитин В.Ю., Прудникова О.Н., Карягин В.В. и др. Выделение этилена, содержание АБК и полиаминов в *Arabidopsis thaliana* при УВ-В стрессе // Физиология растений. 2008. Т. 55. № 3. С. 355-361.
10. Stepanova A.N., Hoyt J.M., Hamilton A.A., Alonso J.M. A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2005. V. 17. P. 2230-2242.
11. 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. V. 58. P. 161-168.
12. Vysotskaya L.B., Kudoyarova G.R., Veselov S., Jones H.G. Unusual Stomatal Behaviour on Partial Root Excision in Wheat Seedlings // Plant Cell Environ. 2004. V. 27. P. 69-77.
13. Веселов С.Ю., Симонян М.В. Использование иммуноферментного анализа цитокининов для оценки активности цитокинооксидазы // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 297-302.
14. Achard P., Vriegen W.H., van der Straeten D., Harberd N.P. Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 2816-2825.
15. Arkhipova T.N., Prinsen E., Veselov S.U., Martinenko E.V., Melentiev A.I., Kudoyarova G.R.. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil // Plant and Soil. 2007. V. 292. № 1-2. P. 305-315.
16. Vysotskaya L.B., Korobova A.V., Veselov S.Yu., Dodd I.C., Kudoyarova G.R. ABA mediation of shoot cytokinin oxidase activity: assessing its impacts on cytokinin status and biomass allocation of nutrient deprived durum wheat // Funct. Plant Biol. 2009. V. 36. № 1. P. 66-72.
17. Kuderova A., Urbankova I., Valkova M. et al. Effects of conditional IPTdependent cytokinin overproduction on root architecture of *Arabidopsis* seedlings // Plant and Cell Physiology. 2008. V. 49. P. 570-582.
18. Brugiere N., Jiao S., Hantke S. et al. Cytokinin Oxidase Gene Expression in Maize Is Localized to the Vasculature, and Is Induced by Cytokinins, Abscisic Acid, and Abiotic Stress // Plant Physiology. 2003. V. 132. P. 1228-1240.
19. Ruzicka K., Simaskova M., Duclercq J. et al. Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 4284-4289.

#### DEPENDENCE OF ROOT AND SHOOT GROWTH, CONTENT AND METABOLISM OF CYTOKININS FROM ETHYLENE SENSIBILITY OF ARABIDOPSIS PLANTS

© 2011 A.N. Vasinskaya, A.V. Korobova, G.R. Kudoyarova

Institute of Biology of Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

A comparative study of shoot and root growth, cytokinin content and metabolism of wild type *Arabidopsis* plants (Columbia) and their ethylene insensitive mutants (ETR-1) have been carried out. Ethylene was shown to be able to decrease cytokinin content and therefore to maintain root biomass accumulation. On the contrary, cytokinins influence on this process apparently without involvement of ethylene. The involvement of ethylene signaling in inhibition of root elongation by cytokinins is concluded.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*; *etr-1*, ethylene, cytokinin, root growth.

Vasinskaya Anna Nikolaevna, e-mail: link\_87@mail.ru,  
Korobova Alla Vladimirovna, Candidate of Biology,  
e-mail: muksin@mail.ru, Kudoyarova Guzel Radomesovna,  
Doctor of Biology, Professor, e-mail: guzel@anrb.ru