

УДК 581.1

## **ВЛИЯНИЕ ТОТАЛЬНОГО И ЛОКАЛЬНОГО ТЕПЛОВОГО ШОКА НА СООТНОШЕНИЕ МАССЫ ПОБЕГА И КОРНЯ У IPT-ТРАНСГЕННЫХ И НЕТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА**

© 2011 М.А. Дедова, Л.Б. Высоцкая, И.И. Иванов, Г.Р. Кудоярова

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 22.06.2011

Изучено влияние прогрева (до 40°C) всего растения или только его корней на содержание цитокининов и рост нетрансформированных и трансгенных растений табака, у которых *ipt*-ген, ответственный за синтез цитокининов, индуцировался тепловым шоком. Показан параллелизм в изменении содержания цитокининов в 5-м и 6-м листьях и сырого веса побега растений обоих генотипов при тотальном тепловом шоке. Связи между изменением содержания цитокининов в корнях и изменением их сырого веса выявить не удалось.

**Ключевые слова:** *Nicotiana tabacum*, цитокинины, АБК, рост, *ipt*-трансгенные растения.

Формирование соотношения массы побега и корня – важная ростовая реакция растений, обеспечивающая их приспособление к изменению условий обитания [1-3]. Предполагают, что регуляция соотношения массы полярных органов осуществляется при участии цитокининов. Цель данной работы состояла в том, чтобы попытаться дифференцировать прямое действие цитокининов и их возможное опосредованное влияние на рост корней через регуляцию роста побега. Целью работы было изучение влияния тотального и локального (в области корней) прогрева до 40°C растений табака (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR-1) одной трансгенной линии [4], у которых *ipt*-ген находился под контролем промотора белка теплового шока [5].

### **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

Растения табака выращивали в отдельных сосудах с почво-песчаной (2:1) смесью при 14-часовом световом дне, освещенности 16-18 клк (используя лампы ДРЛФ-400 и ДНАТ-400) и температуре 26/18°C. Ежедневно осуществляли полив, поддерживая влажность почвы 60-70% от полной влагоемкости. 2-3 раза в неделю всем растениям давали корневую подкормку в виде равных объемов 100-400% раствора Хогланда-Арнона. Тотальную термообработку целого растения или локальную обработку корней продолжительностью 1 ч проводили 1 раз/сут в одно и то же время в течение 6 дней с момента появления 8-го листа. В качестве контроля служили растения, которые находились в тех же условиях произрастания, но не подвергались нагреванию. В конце эксперимента определяли сырой вес побегов и корней. Для определения содержания гормонов отбирали активно росшие 5-й и 6-й листья и корни контрольных и опытных растений через час после применения последнего теплового шока.

*Дедова Мария Александровна*, *Высоцкая Лидия Борисовна*, канд. биол. наук, e-mail: vysotskaya@anrb.ru; *Иванов Игорь Игоревич*, канд. биол. наук, e-mail: i\_ivanov@anrb.ru; *Кудоярова Гюзель Радомесовна*, докт. биол. наук, проф., e-mail: guzel@anrb.ru

Определение содержания фитогормонов после экстракции [5] проводили с помощью ИФА [6].

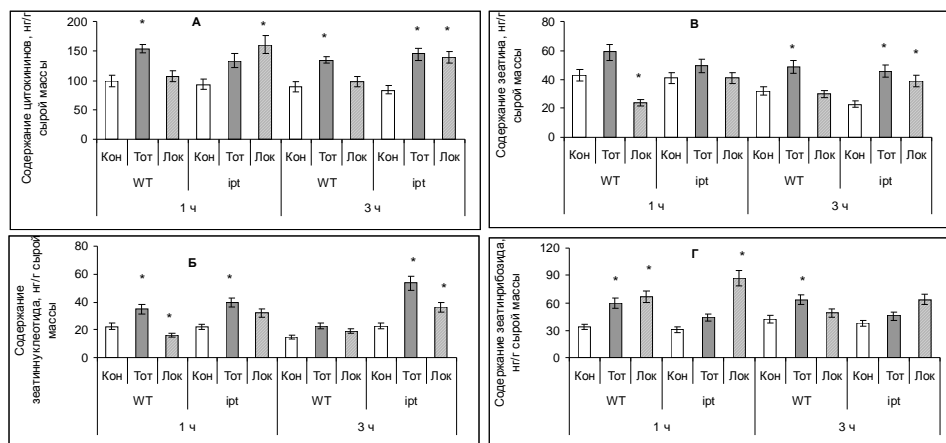
Описательную статистику, t-тест и корреляционный анализ проводили по данным трех независимых экспериментов по 5 биологических повторений в каждом, используя встроенные функции программы MS Excel.

При этом наиболее заметно возросло содержание транспортной формы цитокининов (рибозида зеатина, рис. 1Г), что указывает на возможность оттока цитокининов из корней в побег.

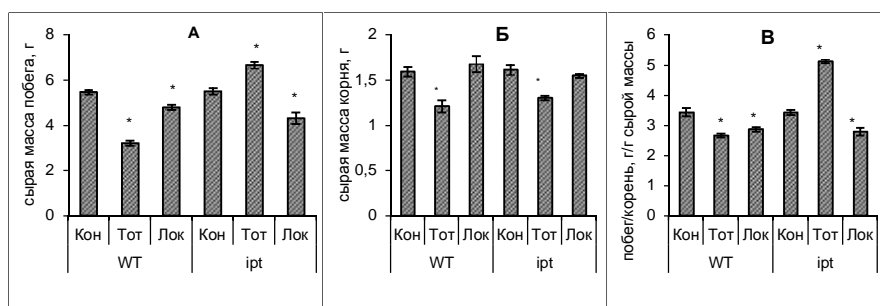
### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Прогрев корней приводил к накоплению цитокининов в корнях трансгенных растений, чего и следовало ожидать, исходя из того, что тепловой шок индуцировал экспрессию гена изопентенилтрансферазы, катализирующей синтез цитокининов [7] (рис. 1).

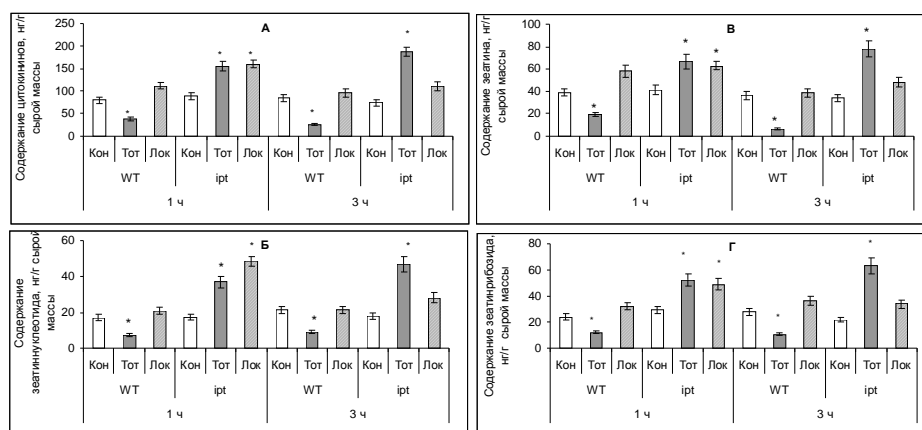
Содержание этой формы цитокининов при данном воздействии (локальном ТШ) возросло также и у нетрансформированных растений. Эти данные позволяют предполагать, что тенденция к увеличению уровня цитокининов (рис. 3Г) в листьях нетрансформированных растений, подвергнутых локальному прогреву корней, могла быть связана с увеличением притока этих гормонов из корней. У нетрансформированных растений накопление цитокининов в корнях после прогрева всего растения, очевидно, было следствием снижения оттока гормонов из корней, на что указывало резкое падение их содержания в побегах. Для достижения цели данной работы важно было сравнить уровень цитокининов в корнях со скоростью их роста. При тотальном прогреве растений накопление цитокининов в корнях растений обоих генотипов сопровождалось уменьшением их сырого веса по сравнению с контролем, что соответствует представлению о ростингибирующем действии цитокининов на корни. Вместе с тем, этому предположению противоречили данные, полученные при локальном прогреве корней. У трансгенных растений накопление цитокининов в корнях при локальном тепловом шоке не сопровождалось снижением их сырого



**Рис. 1.** Содержание цитокининов: суммарное (А), зеатиннуклеотида (Б), зеатина (В) и зеатинрибозида (Г) в корнях нетрансформированных (WT) и трансгенных (ipt) растений табака через 1 и 3 ч после последнего воздействия теплового шока (нагревание до 40°C в течение 1 ч) на целое растение (Тот) и локально на корень (Лок). Контрольные растения (Кон) в течение всего эксперимента не подвергались нагреванию, находясь в одинаковых условиях с опытными. Прим.\* – вероятность различий с контролем  $\geq 0,95$



**Рис. 2.** Сырой вес побега (А), корня (Б) и соотношение массы побег:корень (В) нетрансформированных (WT) и трансгенных (ipt) растений табака через 6 дней после ежедневного воздействия теплового шока (нагревание до 40°C в течение 1 ч) на целое растение (Тот) и локально на корень (Лок). Контрольные растения (Кон) находились в одинаковых условиях с опытными в течение всего эксперимента, но не подвергались тепловому шоку. Прим. \* – вероятность различий с контролем  $\geq 0,95$



**Рис. 3.** Содержание цитокининов: суммарное (А), зеатиннуклеотида (Б), зеатина (В) и зеатинрибозида (Г) в 5-6 листьях нетрансформированных (WT) и трансгенных (ipt) растений табака через 1 и 3 ч после последнего воздействия теплового шока (нагревание до 40°C в течение 1 ч) на целое растение (Тот) и локально на корень (Лок). Контрольные растения (Кон) в течение всего эксперимента не подвергались нагреванию, находясь в одинаковых условиях с опытными. Прим. \* – вероятность различий с контролем  $\geq 0,95$

веса по сравнению с контролем. Чтобы найти объяснение этому противоречию, важно было понять, что происходило в побегах при прогреве растений. Как тотальный прогрев всего растения, так и локальный прогрев корней трансгенных растений приводили к накоплению цитокининов в листьях (рис. 3). При тотальном прогреве это, скорее всего, могло быть следствием индукции экспрессии *ipt*-

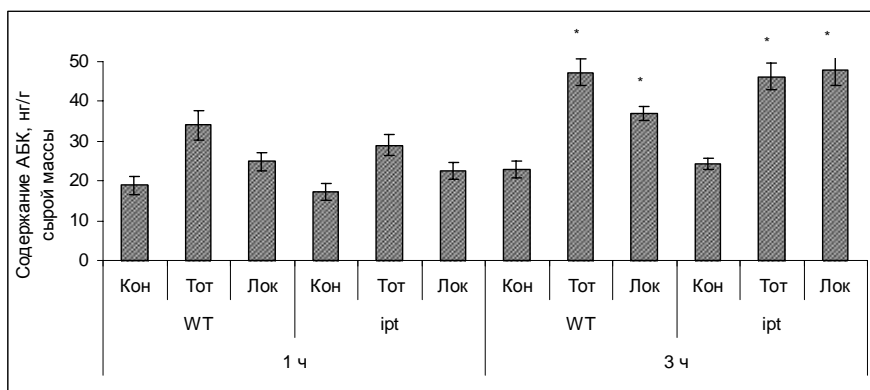
гена в самих побегах. При локальном прогреве корней температура в области нижнего яруса листьев побега повышалась лишь на 2-3 градуса и не достигала уровня, необходимого для индукции гена. Остается предположить, что в этом случае уровень цитокининов в листьях растений возрастал за счет увеличения их притока из корней. Необходимо отметить, что в отличие от тотального прогрева,

локальный прогрев корней вызывал лишь кратковременное накопление цитокининов в листьях, а затем уровень гормонов снижался до контрольного (непрогретых растений). Анализ отдельных форм цитокининов выявил преимущественное накопление нуклеотида зеатина в листьях трансгенных растений при воздействии как локального, так и тотального теплового шока. Как известно [8], нуклеотиды цитокининов не только являются той формой, в которой цитокинины синтезируются в растениях, но и одной из их запасных форм, в которую легко превращаются как зеатин, так и его рибозид. Накопление цитокининов в этой форме обеспечивает гомеостатирование активной формы цитокининов (зеатина). Таким образом, накопление нуклеотида зеатина в листьях растений могло обеспечивать временную инактивацию части цитокининов и их запасание.

Сравнение скорости роста побега и содержания цитокининов в 5 и 6 листе, которые наиболее активно росли на протяжении эксперимента и вносили основной вклад в массу побега, позволяет выявить четкую связь между изменением этих показателей при тотальном действии теплового шока. Так

резкое падение содержания цитокининов при данном воздействии в листьях нетрансформированных растений сопровождалось торможением их роста, в то время как у трансгенных растений накопление цитокининов в растущих листьях (5 и 6) приводило к возрастанию сырого веса побегов. Способность цитокининов стимулировать рост листьев и побега в целом не вызывает сомнений [9, 10]. При тепловом шоке их действие может заключаться не только в поддержании деления клеток, но и уровня фотосинтеза. Так показано, что прогрев вызывает ингибирование фотосинтеза, а цитокинины оказывают протекторное действие на фотосинтетический аппарат в этих условиях [11].

Вместе с тем, анализ одних только цитокининов не позволяет объяснить причины снижения сырого веса побега по сравнению с контролем под влиянием локального прогрева корней трансгенных растений. В этом случае содержание цитокининов, хотя и снижалось после первоначального временного накопления, но было не ниже уровня контроля (непрогретых растений). Понять причину торможения роста побега в этом случае помогает анализ данных по АБК (рис. 4).



**Рис. 4.** Содержание АБК в 5-6 листьях нетрансформированных (WT) и трансгенных (ipt) растений табака через 1 и 3 ч после последнего воздействия теплового шока (нагревание до 40°C в течение 1 ч) на целое растение (Тот) и локально на корень (Лок). Контрольные растения (Кон) находились в одинаковых условиях с опытными в течение всего эксперимента, но не подвергались тепловому шоку. Прим. \* – вероятность различий с контролем  $\geq 0,05$

Содержание этого гормона возрастало как при локальном, так и тотальном прогреве, что может быть следствием, как прямого действия неоптимальной температуры, так и вызванного им нарушения водного обмена [12]. Как известно, АБК может тормозить рост растений и ингибировать фотосинтез [13], что позволяет объяснить торможение роста растений при локальном прогреве корней накоплением в них АБК. Цитокинины являются антагонистами АБК в их действии на фотосинтез и рост [14], что позволяет объяснить отсутствие торможения роста у трансгенных растений при тотальном тепловом шоке. В этом случае стабильное накопление цитокининов в листьях могло нейтрализовать ростингибирующее действие как непосредственно высокой температуры, так и вызванного ею накопления АБК. При локальном прогреве корней накопление цитокининов в листьях было, вероятно, недостаточно высоким и продол-

жительным для того, чтобы нейтрализовать действие АБК. Взаимодействие АБК и цитокининов в регуляции роста подтверждалось более высоким уровнем коэффициента корреляции сырого веса растений с соотношением цитокининов и АБК, чем с содержанием одних цитокининов в листьях (0,96 и 0,80 соответственно). *Ipt*-трансгенные растения, индуцированные тепловым шоком, широко используются в научных исследованиях, как способ включения синтеза цитокининов, а содержание АБК, как правило, при этом не учитывается. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что индукция тепловым шоком накопления АБК не менее важный и стабильный эффект, чем накопление цитокининов в трансформантах.

Важно было выяснить, не поможет ли анализ процессов, которые происходят в побегах растений, лучше понять механизм торможения роста корней. Как указывалось выше, накопление цито-

кининов в корнях трансгенных растений сопровождалось торможением роста корней при тотальном, но не при локальном прогреве. Эти результаты не позволяют считать накопление цитокининов единственной причиной торможения роста корней. Наиболее ярким различием между действием тотального и локального прогрева на трансгенные растения было стабильное накопление цитокининов в листьях растений при тотальном прогреве и меньшее по уровню кратковременное накопление этих гормонов в листьях при локальном прогреве корней. Доступность ассимилятов для роста корней зависит от конкурентных отношений между зонами роста побега и корня [15]. Ранее высказывалось предположение, что торможение роста корней под влиянием цитокининов может быть следствием ростстимулирующего действия этих гормонов на рост побега [16]. Полученные нами результаты соответствуют этой гипотезе. Они позволяют предполагать, что торможение роста корней у трансгенных растений при тотальном действии теплового шока может быть следствием активации роста побега в результате резкого и стабильного накопления цитокининов в активно растущих листьях побега, а отсутствие торможения роста корней при локальном тепловом шоке связано с торможением роста побега в этих условиях. Таким образом, цитокинины могут подавлять рост корней через стимуляцию роста побега, снижая тем самым конкурентоспособность корней как акцепторов ассимилятов.

Полученные нами результаты и анализ данных литературы свидетельствуют о том, что изменение соотношения роста побега и корня под влиянием цитокининов является сложным процессом, который складывается не только из прямого действия этих гормонов на рост побега и корня, но зависит и от взаимодействия цитокининов с абсцизовой кислотой, их влияния на фотосинтез и распределение ассимилятов между побегом и корнем, что в свою очередь определяется конкурентными взаимоотношениями между зонами роста побега и корня.

## EFFECT OF TOTAL AND LOCAL HEAT SHOCK ON SHOOTS AND ROOTS THE MASS RATIO OF IPT-TRANSGENIC AND UNTRANSFORMED TOBACCO PLANTS

© 2011 M.A. Dedova, L.B. Vysotskaya, I.I. Ivanov, G.R. Kudoyarova

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

The effect of heating (up to 40°C) the entire plant or just roots on the content of cytokinins and growth of untransformed and transgenic tobacco plants in which the ipt-gene responsible for synthesis of cytokinin, was induced by heat shock. There is a parallelism in the changes of the content of cytokinins in the 5th and 6th leaf and shoot fresh weight of plants of both genotypes under total heat shock. Correlation between the changes in the content of cytokinins in roots and their fresh weight could not be detected.

**Key words:** *Nicotiana tabacum*, cytokinins, ABA, growth, ipt-transgenic plants.

Dedova Marya Aleksandrovna; Vysotskaya Lydia Borisovna, Candidate of Biology, e-mail: vysotskaya@anrb.ru; Ivanov Igor Igorevich, Candidate of Biology, e-mail: i\_ivanov@anrb.ru; Kudoyarova Guzel Radomesovna, Doctor of Biology, Professor, e-mail: guzel@anrb.ru

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hsiao T.C., Xu L.-K. Sensitivity of Growth of Roots versus Leaves to Water Stress: Biophysical Analysis and Relation to Water Transport // J. Exp. Bot. 2000. V. 51. P. 1595-1616.
2. Salisbury F.J., Hall A., Grierson C.S., Halliday K.J. Phytochrome Coordinates Arabidopsis Shoot and Root Development // Plant J. 2007. V. 50. P. 429-438.
3. Mason M.G., Mathews D.E., Argyros A. et al. Multiple type-B Response Regulators Mediate Cytokinin Signal Transduction in Arabidopsis // Plant Cell. 2005. V. 17. P. 3007-3018.
4. Теплова И.П., Фархутдинов Р.Г., Митриченко А.Н. и др. Реакция на повышенную температуру у трансформированных растений табака, содержащих ipt-ген // Физиология растений. 2000. Т. 47. С. 416-419.
5. Vysotskaya L.B., Kudoyarova G.R., Veselov S.Yu., Jones H.G. Unusual Stomatal Behaviour on Partial Root Excision in Wheat Seedlings // Plant Cell Environ. 2004. V. 27. P. 69-77.
6. Веселов С.Ю. Использование антител для количественного определения, очистки и локализации регуляторов роста растений. Уфа: Изд. БГУ, 1998. 138 с.
7. Schmulling T., Beinsberger S., De Greef J. et al. Construction of a heat-inducible chimaeric gene to increase the cytokinin content in transgenic plant tissue // FEBS Lett. 1989. V. 249. P. 401-406.
8. Mok D.W.S., Mok M.C. Cytokinin metabolism and action // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 2001. V. 52. P. 89-118.
9. Шпратникова Ю.В., Кулаева О.Н. Цитокинин-зависимая экспрессия ARR5::GUS-конструкции в ходе роста трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 842-850.
10. Kudoyarova G., Farkhutdinov R., Mitrchenko A. et al. Fast changes in growth rate and cytokinin content of the shoot following rapid cooling of roots of wheat seedlings // Plant Growth Regul. 1998. V. 36. P. 105-108.
11. Монахова О.Ф., Чернядьев И.И. Протекторное влияние цитокининовых препаратов на фотосинтетический аппарат растений пшеницы при водном дефиците // Прикл. биох. и микробиол. 2007. Т. 43. С. 720-729.
12. Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Foolad M.R. Heat Tolerance in Plants: An Overview // Environ. Exp. Bot. 2007. V. 61. P. 199-223.
13. Raschke K., Hedrich R. Simultaneous and Independent Effects of Abscisic Acid on Stomatal and the Photosynthetic Apparatus in Whole Leaves // Planta. 1985. V. 163. P. 105-118.
14. Кулаева О. Н., Хохлова В. А., Фофанова Т. А. Цитокинины и абсцизовая кислота в регуляции роста и процессов внутриклеточной дифференцировки // Гормональная регуляция онтогенеза растений. М.: Наука, 1984. С. 71-86.
15. Daie J. Metabolic Adjustments, Assimilate Partitioning, and Alterations in Source-Sink Relations in Drought-Stressed Plants // Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-Sink Relationships. N. Y., 1996. P. 407-420.
16. Van der Werf A, Nagel O.W. Carbon Allocation to Shoots and Roots in Relation to Nitrogen Supply is Mediated by Cytokinins and Sucrose: Opinion // Plant Soil. 1996. V. 185. P. 21-32.