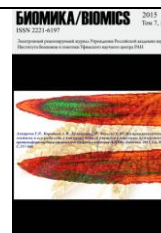




БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



ИММУНОЛОКАЛИЗАЦИЯ ЗЕАТИНА И ЕГО РИБОЗИДА В КОНЧИКАХ КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ВВЕДЕНИИ ПРОТОНОФОРА КАРБОНИЛЦИАНИД-М-ХЛОРФЕНИЛГИДРАЗОНА (КЦХФ)

Ахиярова Г.Р.¹, Коробова А.В.¹, Кудоярова Г.Р.¹, Веселов С.Ю.²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Уфимский институт биологии
Российской академии наук, Уфа, e-mail: muksin@mail.ru

²Башкирский государственный университет, Уфа

Резюме

С помощью модифицированного метода связывания цитокининов, позволяющего отдельно с помощью антител к рибозиду зеатина выявлять на срезах присутствие свободных азотистых оснований и их рибозилированных форм, проведено сравнительное изучение локализации в клетках кончика корней зеатина и его рибозид. Показано интенсивное окрашивание кончиков корней как на зеатин, так и его рибозид, ослабевающее в области коры по мере перехода клеток к растяжению. Особенность иммуногистохимического выявления рибозид зеатина заключалась в присутствии рядов интенсивно меченных клеток в области центрального цилиндра. Окрашивание на зеатин резко снижалось под влиянием ингибирования вторично активного трансмембранного переноса, в то время как окрашивание на рибозид зеатина под воздействием протонифора изменялось незначительно.

Ключевые слова: пшеница, зеатин, рибозид зеатина, трансмембранный перенос, протонифор, срезы корней, иммунолокализация

Введение

Мобильными формами гормонов цитокининов являются свободные основания и их рибозиды. Поскольку клеточные мембраны проницаемы для этих соединений цитокинины способны покидать клетки, где они синтезированы, и выполнять функции сигналов, передаваемых на расстояние [Glover et al., 2008]. Обнаружение в клеточных мембранах переносчиков, способных обеспечивать трансмембранный перенос цитокининов против градиента их концентрации, свидетельствует об их возможном участии в транспорте цитокининов [Burkle et al., 2003; Hirose et al., 2005]. В опытах с суспензионной культурой корней арабидопсиса было показано, что вторично активное поглощение клетками цитокининов в форме свободного основания зависит от энергии трансмембранного электрохимического градиента протонов водорода, и нарушение его формирования под влиянием протонифора снижает способность клеток поглощать эти соединения [Cedzich et al., 2008]. Зависимость поглощения рибозилированных

форм цитокининов от градиента водорода изучена в меньшей степени, а имеющиеся данные противоречивы [Hirose et al., 2005]. С помощью метода иммуноанализа и иммуногистохимической локализации нами был выявлен более высокий уровень накопления цитокининов в клетках корней, обработанных экзогенным зеатином, по сравнению с корнями, в которые вводили рибозид зеатина [Коробова и др., 2013]. Ингибирование вторично активного трансмембранного переноса с помощью протонифора карбонилцианид-м-хлорфенилгидразона (КЦХФ) резко снижало накопление цитокининов у растений при введении в них свободного зеатина [Kudoyarova et al., 2014]. Влияние КЦХФ на накопление экзогенного рибозид зеатина было выражено в меньшей степени [Коробова и др., 2015]. Представляло интерес выяснить, как обработка растений протонифором влияет на содержание в клетках эндогенных цитокининов. С этой целью мы провели иммуногистохимическую локализацию этих гормонов в кончиках корней, где, по данным

литературы, высок уровень эндогенных цитокининов [Aloni et al., 2005].

Материалы и методы

Исследования проводили на проростках твердой яровой пшеницы (*Triticum durum* Desf., сорта *Безенчукская 139*). Семена проращивали в темноте в течение трех суток, затем проростки пересаживали на 10%-ную среду Хогланда-Арнона и выращивали при освещенности $400 \mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$ и 14-часовой продолжительности светового дня. Температура воздуха в течение светового периода была в пределах 22-25°C. Шестисуточные растения рассаживали по 10 штук в сосуды со 100 мл 100%-го питательного раствора Хогланда-Арнона для адаптации. В возрасте 7 суток проводили обработку растений протонофором карбонилцианид-м-хлорфенилгидразоном (КЦХФ) до конечной концентрации 10^{-5} М. Фиксацию кончиков корней (5 мм) для иммунолокализации цитокининов производили через 1 ч после введения КЦХФ в среду.

Распределение цитокининов в тканях растений оценивали с помощью иммуногистохимического подхода, используя специфические антитела к рибозиду зеатина [Веселов и др., 1999; Kudoyarova et al., 2014], с помощью модификации, позволяющей отдельно выявлять присутствие в клетках или зеатина или его

рибозилированной формы [Веселов, Вальке, 2000]. Модификация основана на конъюгации рибозилированных форм с помощью периодата натрия, а свободных оснований – с помощью смеси альдегидов, растворенных в фосфатном буфере (рН 7.2). Подавление конъюгирования с белком оснований в присутствии смеси альдегидов достигалось путем повышения рН до 9.6 с помощью карбонатно/бикарбонатного буфера, что было показано в модельных опытах [Веселов, Вальке, 2000].

Результаты и обсуждение

Для апексов корней было характерно интенсивное окрашивание клеток как на зеатин, так и на его рибозид (рис. 1а,б). Эти данные соответствуют результатам оценки уровня цитокининов в кончиках корней трансгенных растений арабидопсиса, трансформированных с помощью чувствительной к цитокининам репортерной *ARR5::GUS* конструкции. При этом высокая активность глюкуроניзады, кодируемой *ARR5::GUS*, также была выявлена в кончиках корней [Aloni et al., 2005]. Накопление цитокининов в кончиках корней очевидно обусловлено повышенной экспрессией в них *IPT1* гена, кодирующего фермент изопентенилтрансферазу, которая катализирует ключевой этап синтеза цитокининов [Miyawaki et al., 2004].

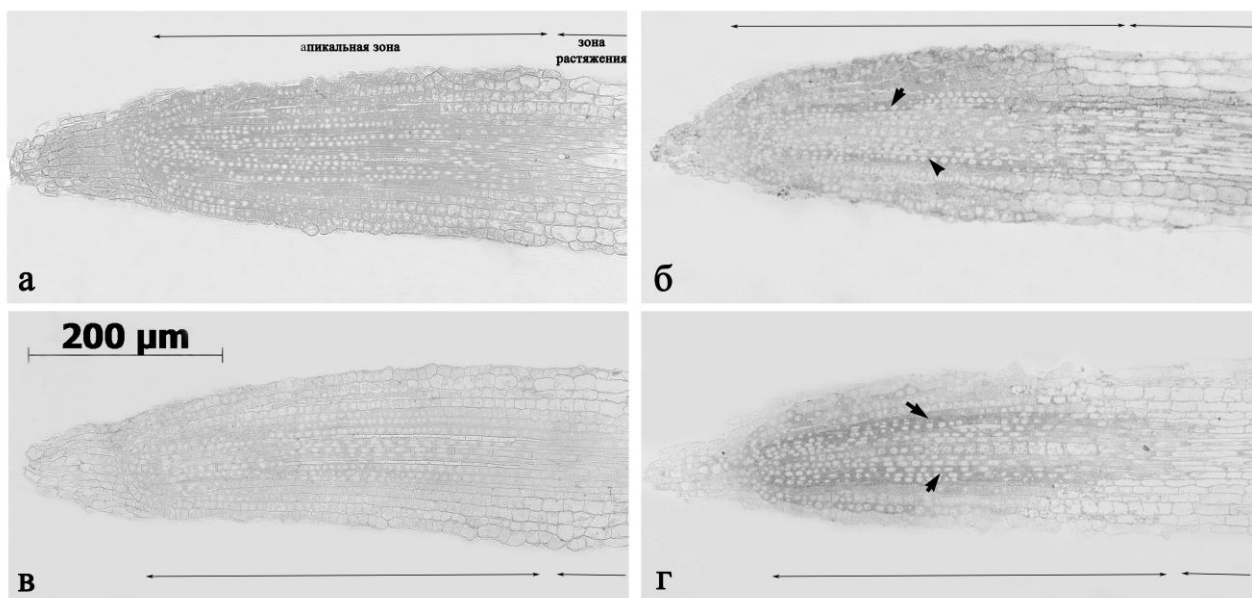


Рис. 1. Иммуногистохимическая локализация зеатина (а, в) и его рибозида (б, г) в апикальной зоне корней семисуточных контрольных (а, б) растений пшеницы и через 1 ч после введения протонофора КЦХФ в питательный раствор (в, г).

По мере удаления от кончика корней, с увеличением размера клеток, свидетельствующем о начале растяжения, уменьшалось окрашивание на цитокинины (как на зеатин, так и на его рибозид), наиболее заметное в области коры. При окрашивании на рибозид зеатина, в центральном цилиндре заметны ряды интенсивно меченых клеток (рис. 1б, отмечены стрелками). Их локализация по краям центрального цилиндра соответствует расположению формирующихся сосудов, где у трансгенных растений с помощью репортерной конструкции выявлена повышенная экспрессия *IPT5*-гена [Miyawaki et al., 2004]. Значение этих результатов в том, что рибозид зеатина является основной транспортной формой цитокининов, присутствие которой в области сосудов соответствует их предполагаемой транспортной функции.

Инкубация корней растений пшеницы в растворе протонофора КЦХФ резко снижала окрашивание на зеатин (рис. 1в). Таким образом, ингибирование вторично активного транспорта не только снижало поглощение экзогенного зеатина клетками [Kudoyarova et al., 2014], но и уменьшало содержание в клетках эндогенных цитокининов. Содержание зеатина в тех или иных клетках корней определяется балансом между процессами, обеспечивающими их накопление (синтез непосредственно в самих клетках и поглощением зеатина, синтезируемого другими клетками) и утечкой зеатина из клеток, в частности, за счет простой диффузии. Поскольку зеатин является относительно гидрофобным веществом, он может пассивно диффундировать через мембрану, и удерживанию зеатина внутри клеток, очевидно, способствует их вторично активное поглощение обратно в клетки. Таким образом, поддержание присутствия зеатина внутри клеток кончика корней зависит от генерации градиента водорода, чья энергия противостоит диффузии зеатина из клеток.

Ингибирование вторично активного трансмембранного переноса с помощью протонофора также несколько уменьшало окрашивание на рибозид зеатина (рис. 1г), хотя степень снижения была меньше, чем в случае окрашивания на зеатин. Эти результаты подтверждают меньшую зависимость накопления рибозида зеатина в клетках от вторично активного транспорта по сравнению с зеатином. Меньшая зависимость удержания рибозида зеатина в клетках от вторично активного трансмембранного переноса может объясняться тем, что присутствие остатка рибозы повышает гидрофильность этого вещества и, соответственно, снижает проницаемость для него мембран и возможность утечки из клеток, которой

противостоит процесс вторично активного поглощения.

Снижение окрашивания на рибозид зеатина под влиянием протонофора заметно в области коры и корневого чехлика, а в центральном цилиндре интенсивность окрашивания на рибозид зеатина у корней, обработанных КЦХФ, была не ниже чем в контроле (необработанные КЦХФ корни). Наряду с рассмотренным выше механизмом, этот феномен может объясняться тем, что в этой области происходит синтез цитокининов [Miyawaki et al., 2004], превращение которых в более гидрофильные формы может обеспечивать их удержание в клетках на фоне ингибирования вторично активного переноса. Альтернативное объяснение может заключаться в том, что открытые недавно транспортеры переносят транспортную форму цитокининов, т.е. рибозилированные формы из клеток наружу, что обеспечивает загрузку этих гормонов в ксилему [Ko et al., 2014]. Снижение энергии электрохимического градиента может уменьшать выход рибозида зеатина из клеток. Необходимы дальнейшие исследования для проверки этого предположения.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ 13-04-00666.

Цитированная литература

1. Веселов С.Ю., Вальке Р.С., Ван Онкелен Х., Кудоярова Г.Р. Содержание и локализация цитокининов в листьях исходных и трансгенных растений табака // Физиология растений. 1999. Т. 46. С. 326-335.
2. Веселов С.Ю., Вальке Р. Раздельное иммуногистохимическое определение гликозилированных форм цитокининов и их свободных оснований у растений табака // Материалы III конференции «Иммуноанализ регуляторов роста в решении проблем физиологии растений, растениеводства и биотехнологии» / Уфа, 2000 г. С. 128-147.
3. Коробова А.В., Ахиярова Г.Р., Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю. Накопление и распределение цитокининов у растений пшеницы, обработанных зеатином и его рибозидом // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых (21-26 сентября 2015 г.). Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2015. 656 с.
4. Коробова А.В., Васинская А.Н., Ахиярова Г.Р., Веселов С.Ю., Кудоярова Г.Р., Hartung W. Зависимость распределения цитокининов в

- растениях от скорости транспирации // Физиология растений. 2013. Т. 60. С. 184 - 191.
5. 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. V. 56. P. 1535 – 1544.
 6. Burkle L., Cedzich A., Dopke C., Stransky H., Okumoto S., Gillissen B., Kuhn C., Frommer W.B. Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of Arabidopsis // Plant J. 2003. V. 34. P. 13 – 26.
 7. Cedzich A., Stransky H., Schulz B., Frommer W.B. Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures // Plant Physiology. 2008. V. 148. P. 1857 – 1867.
 8. Glover B.J., Torney K., Wilkins C.G., Hanke D.E. CYTOKININ INDEPENDENT-1 Regulates Levels of Different Forms of Cytokinin in *Arabidopsis* and Mediates Response to Nutrient Stress // J. Plant Physiol. 2008. V. 165. P. 251 – 261.
 9. Hirose N., Makita N., Yamaya T., Sakakibara H. Functional characterization and expression analysis of a gene, OsENT2, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport // Plant Physiol. 2005. V. 138. P. 196 – 206.
 10. Ko D., Kang J., Kiba T., Park J., Kojima M., Doc J., Kim R.Y., Kwon M., Endler A., Song W.-Y., Martinoia E., Sakakibara H., Lee Y. Arabidopsis ABCG14 is Essential for the Root-to-Shoot Translocation of Cytokinin // Proc. Natl Acad Sci USA. 2014. V. 111. P. 7150 – 7155.
 11. Kudoyarova G.R., Korobova A.V., Akhilarova 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 V. 65. P. 2287 – 2294.
 12. 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. V. 37. P. 128 – 138.

**IMMUNOLOCLIZATION OF ZEATIN AND ITS RIBOSIDE IN THE TIPS OF WHEAT ROOTS
UNDER APPLICATION OF PROTONOPHORE CARBONYL CYANIDE
M-CHLOROPHENYLHYDRAZONE (CCCP)**

¹Akhilarova G.R., ¹Korobova A.V., ¹Kudoyarova G.R., ²Veselov S.Yu.

¹Ufa Institute of Biology, Russian Academy of Sciences,
pr. Oktyabrya 69, 450054 Ufa, Russian Federation, E-mail: muksin@mail.ru

²Baskir State University, Ufa, Russian Federation

Resume

Comparative analysis of localization of zeatin and its riboside was carried out with the help of modified method of cytokinin binding prior to dehydration of tissues, enabling differential detection of the presence of either free bases or their ribosides on tissue sections using antibodies to zeatin riboside. We showed intensive staining for both zeatin and its riboside weakening in the cortex region with the transfer of cells to extension growth. Peculiarity of immunohistochemical detection of zeatin riboside was in the presence of files of intensively labeled cells in the region of the central cylinder. Staining for zeatin was decreased sharply by inhibition of secondary active transmembrane transfer, while staining for riboside of zeatin changed insignificantly under the influence of protonophore.

Key words: wheat, zeatin, zeatin riboside, transmembrane transfer, protonophore, root sections, immunolocalization