



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



ОЦЕНКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОКИНИНОВ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ ЛИСТА КАК ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ФЛОЭМНОГО ТРАНСПОРТА ЦИТОКИНИНОВ У РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

Веселов С.Ю.¹, Тимергалина Л.Н.², Ахиярова Г.Р.², Кудоярова Г.Р.²

¹ Башкирский Государственный университет, ул. Заки Валиди 32, 450076, Уфа, Россия

² Уфимский институт биологии РАН, пр. Октября 69, 450054, Уфа, Россия

Резюме

Присутствие цитокининов как в ксилемном, так и флоэмном соках свидетельствует о том, что эти гормоны способны выполнять функции дальних сигналов. Транспорт цитокининов из корней в побег хорошо изучен, однако существует гораздо меньше информации об их транспорте из побега в корень. В настоящей работе мы оценили изменение концентрации свободных оснований и рибозидов цитокининов во флоэмном соке (диффузате из листьев) после инкубации листьев пшеницы в растворе с зеатином или изопентениладенином. Различные процедуры фиксации для связывания свободных оснований или их рибозидов были использованы для выявления присутствия этих цитокининов в клетках листьев. Иммулокализация показала увеличение содержания рибозилированных форм зеатина в клетках обкладки сосудов обработанных зеатином листьев. Эти результаты свидетельствуют о необходимости превращения зеатина в рибозид для его транспорта из побега в корни. Было обнаружено, что экзогенный изопентениладенин не был модифицирован и диффундировал из листьев в корни в форме свободного основания. Хотя возможно, что эти различия в метаболизме не универсальны и зависят от вида растений и их возраста, однако наши данные свидетельствуют о том, что оценка распределения цитокининов между клетками листа после специфической фиксации свободных оснований или их рибозидов может быть источником ценной информации о метаболизме и транспорте цитокининов.

Ключевые слова: иммулокализация, транспорт и метаболизм цитокининов, флоэма, *Triticum durum*

Введение

Взаимодействие между побегом и корнем необходимо на протяжении всего жизненного цикла растений. Расшифровка обмена сигналами между этими двумя системами может обеспечить углубление представлений о том, как растения регулируют свое развитие на уровне целого организма в ответ на внешние воздействия. Способность цитокининов влиять на множество процессов в растениях [Sakakibara, 2006] и их присутствие как во флоэмном, так и ксилемном соках [Stirk, Van Staden, 2010] свидетельствует об участии этих гормонов в обмене сигналами между побегом и корнем и координации их роста [Puig et al., 2012]. Тем не менее, цитокинины в основном рассматривают как корневые сигналы благодаря устоявшемуся мнению о том, что они синтезируются только в корнях [Puig et al., 2012]. Роль активного поглощения цитокининов клетками корней как

механизма, контролирующего экспорт цитокининов в побег, была выявлена в экспериментах, в которых генерируемый на клеточных мембранах градиент ионов водорода целенаправленно разрушали с помощью протонофора карбонил цианид *m*-хлорфенилгидразона (КЦХФ) для ингибирования вторично активного поглощения экзогенных и эндогенных цитокининов [Kudoyarova et al., 2014]. Было показано, что у арабидопсиса ABC транспортеры из семейства G14 в основном экспрессируются в корнях и играют важную роль в доставке цитокининов в побеги [Ko et al., 2014]. Открытие *ipt*-генов, контролирующих синтез цитокининов, и обнаружение их экспрессии в листьях [Miyawaki et al., 2004], привлекло внимание исследователей к возможности транспорта цитокининов из побега в корни. Недавние публикации подтвердили, что транспорт цитокининов из побега в корни по флоэме важен для

закладки сосудов в меристеме корней [Bishopp et al., 2011] и что продуцируемые в побеге цитокинины индуцируют цветение [Bernier, 2013 и ссылки в статье] и обеспечивают подавление образования клубеньков [Sasaki et al., 2014]. Однако механизм и функции флоэмного транспорта цитокининов все еще слабо изучены [Murago et al., 2011]. Были идентифицированы несколько предполагаемых мембранных переносчиков цитокининов, включая транспортеры рибозидов из семейства ENT [Hirose et al., 2005] и пуриновых оснований из семейства PUP [Burkle et al., 2003], и была выявлена во флоэме экспрессия кодирующих их генов. Несмотря на то, что свободные основания цитокининов и их рибозиды считаются мобильными формами цитокининов, способными диффундировать через мембраны клеток [Glover et al., 2008], существование транспортеров, способных переносить или основания цитокининов, или их рибозиды, дает основание предполагать, что эти метаболиты могут играть различную роль в процессе транспорта цитокининов. Необходимость дальнейшего изучения транспорта цитокининов особенно ощутима в случае однодольных растений, для которых остро ощущается дефицит знаний о транспорте цитокининов. В данной работе мы изучили свободные основания и их рибозиды во флоэмном соке (диффузате из листа) после инкубации листьев пшеницы в растворе, содержащем или зеатин, или изопентениладенин. Акцент на изучение свободных оснований и их рибозидов обусловлен их мобильностью и способностью диффундировать через мембрану [Collier et al., 2003]. Были использованы различные процедуры фиксации для связывания или свободных оснований или их рибозидов с белками цитоплазмы перед дегидратацией с тем, чтобы обеспечить дифференциальную локализацию этих цитокининов в клетках листа, с особым акцентом на клетки сосудов. Цель данной работы состояла в том, чтобы выявить, (1) в какой форме цитокинины предпочтительнее транспортируются из листьев в корни и (2) насколько важен метаболизм цитокининов для контроля их транспорта.

Материалы и методы

Эксперименты проводили с 7-суточными проростками твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf., сорт Безенчукская 139). Семена проращивали в темноте на стеклянных плитках в водопроводной воде при 24°C в течение трех дней, а затем перемещали на 10% раствор Хогланда-Арнона в 3-литровый контейнер и выращивали при освещенности 400 $\mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$ и 14-часовом фотопериоде в течение 3 дней. Температура воздуха

была 22–25°C. За сутки до эксперимента проростки переносили в сосуды с 100 мл 100% раствора Хогланда-Арнона для адаптации. Эксперименты проводили с 7-дневными проростками. Транс-зеатин (З) или изопентениладенин (ИП) (Sigma, USA) растворяли в минимальном количестве этанола и добавляли к 0,05% раствору Твина 20 в дистиллированной воде до конечной концентрации 4×10^{-7} М. Листья горизонтально ориентированных побегов растений, корни которых оставались в питательном растворе, на 30 мин погружали в раствор с экзогенными цитокининами. Листья контрольных растений помещали в раствор Твина 20 той же концентрации со следами этанола. Затем оставшиеся капли раствора цитокининов аккуратно стряхивали для предотвращения проникновения экзогенных цитокининов в питательный раствор с размещенными в нем корнями.

Для измерения транспорта цитокининов по флоэме основание срезанных побегов погружали в 1,5 мл 5 mM Na₂EDTA для предотвращения закупорки сосудов и держали в темноте при 24°C в течение 3 часов, как описано [Jiang et al., 2007].

Очистку и иммуноанализ цитокининов проводили, как описано [Kudoyarova et al., 2014]. Цитокинины из диффузата листьев концентрировали на C18 колонке (Bond-Elut, RP-C18) и после промывания дистиллированной водой элюировали 5 мл 80% этанола. После упаривания элюата цитокинины разделяли с помощью тонкослойной хроматографии на силуфоловой пластине Merck в системе растворителей 2-бутанол: 14 М NH₄OH: H₂O (6:1:2 v/v, верхняя фаза). Из зон, положение которых определяли с помощью стандартов, цитокинины элюировали 0,1М фосфатным буфером pH 7,4 в течение 12 часов и добавляли в микропланшеты для определения их содержания с помощью иммуноферментного анализа. Тонкослойная хроматография разделяла рибозид зеатина (ЗР, Rf 0,4 – 0,5), изопентениладенозин (ИПА, Rf 0,5-0,6), зеатин (З, Rf 0,6 – 0,7) и изопентениладенин (ИП, Rf 0,7-0,8). Для анализа производных З и ИП использовали антитела против ЗР и ИПА, соответственно. Кросс-реактивность антиЗР сыворотки по отношению к производным ИП и антиИПА сыворотки по отношению к производным зеатина была низкой (меньше 1%).

Иммунолокализацию цитокининов проводили в высечках из дифференцированной части первого листа контрольных и обработанных зеатином растений с помощью сыворотки к ЗР. Перед дегидратацией для предотвращения вымывания гормонов их конъюгировали с белками цитоплазмы: свободные основания - с помощью смеси 4% параформальдегида и 0,1% глутарового

альдегида в 100 мМ фосфатном буфере рН 7,2, рибозилированные формы – периодатом натрия с последующей фиксацией смесью альдегидов в карбонатном буфере рН 9,6, в котором свободные основания не связывались с белками [Veselov, Valke, 2000]. Заключение в смолу, обработку первыми антителами, вторыми антителами, меченным коллоидным золотом, и проявление окраски с помощью препарата серебра проводили, как описано ранее [Kudoyarova et al., 2014].

Результаты

Инкубация листьев в растворе экзогенного гормона приводила к 4-5 кратному, по сравнению с контролем, возрастанию содержания цитокининов в диффузате из листьев (Рис. 1). При инкубации листьев в растворе зеатина, в диффузате возрастал уровень рибозида зеатина. В случае обработки листьев ИП, в диффузате из листьев увеличивалось содержание той же свободной формы ИП.

Поскольку ИП транспортировался в неизменной форме, больший интерес представляло изучение транспорта зеатина. Поэтому проводили иммулокализацию именно этой формы цитокининов с помощью антител к рибозиду зеатина. Сравнение иммунного окрашивания контрольных листьев и листьев, обработанных зеатином, показало увеличение окрашивания под влиянием обработки как на зеатин, так и его рибозид,

что свидетельствует об увеличении содержания этих форм гормонов в клетках в результате поглощения экзогенного гормона. Увеличение окрашивания на рибозид зеатина было лучше всего заметно в области сосудов (Рис. 2, 3).

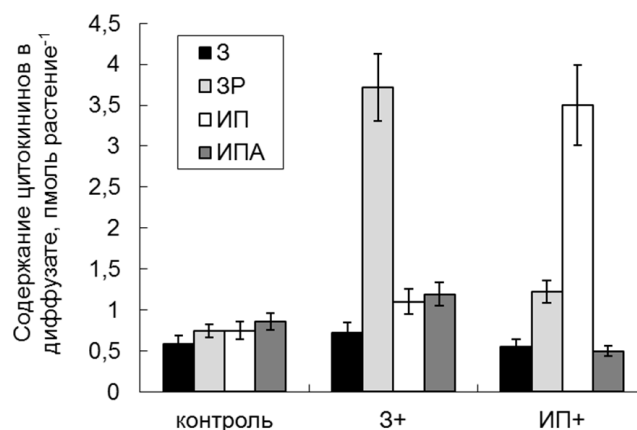


Рисунок 1. Содержание цитокининов в диффузате из листьев пшеницы, обработанных зеатином или ИП через листья. Контроль не обработан цитокининами. Представлены средние значения ± стандартные ошибки (n=9)

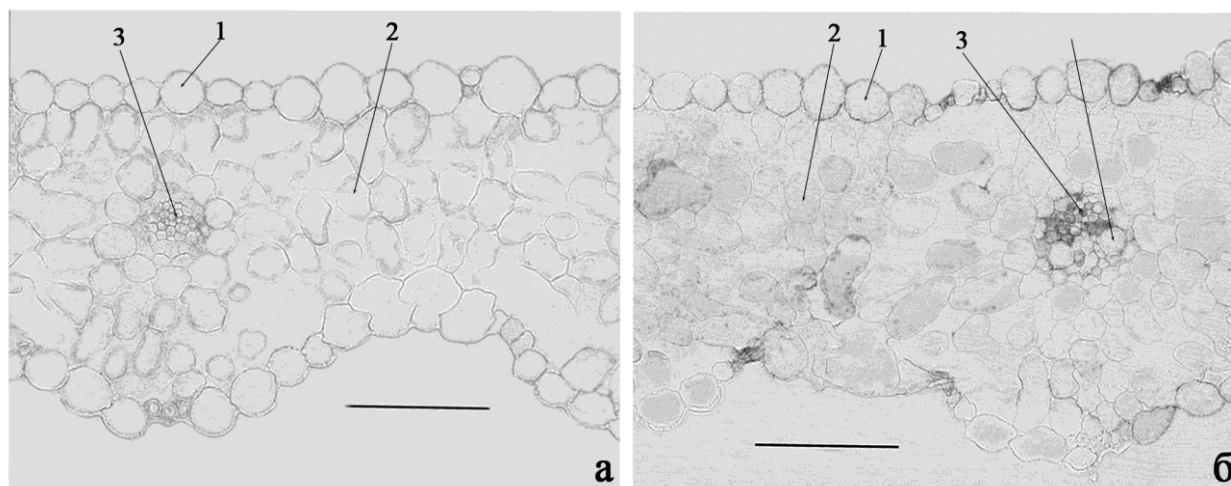


Рисунок 2. Иммунное окрашивание на рибозид зеатина (высечки листьев фиксировали периодатом натрия с последующей фиксацией смесью альдегидов при рН 9,6). а – контроль; б – листья, обработанные зеатином. 1-эпидермис, 2-мезофилл, 3-флоэма, 4-ксилема, 5-проводящий пучок. Линейка – 100мкм.

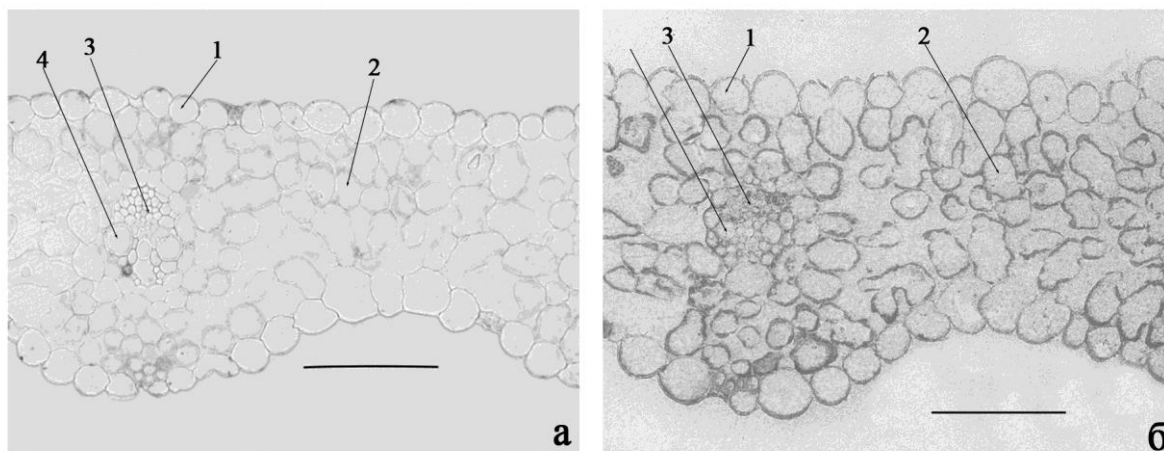


Рисунок 3. Иммуноокрашивание на зеатин (высечки листьев фиксировали смесью альдегидов при рН 7,2). а – контроль; б – листья, обработанные зеатином. 1-эпидермис, 2-мезофилл, 3-флоэма, 4-ксилема. Линейка – 100мкм.

Обсуждение

В данной работе нами были обнаружены как производные зеатина, так и ИП в диффузате из листьев контрольных растений пшеницы, не обработанных экзогенными гормонами (Рис. 1). У двудольных растений, которые в основном использовали для изучения транспорта цитокининов по флоэме, производные ИП были основной формой, транспортируемой по флоэме [Corbesier et al., 2003; Hirose et al., 2005]. Тем не менее, во флоэмном соке *L. albus* Taylor с соавторами идентифицировали рибозид зеатина как основную форму цитокининов в соке [Taylor et al., 1990]. Зеатин также присутствовал во флоэмном соке *Ricinus communis*, в то время как использование растений этого вида обеспечивает наиболее надежный сбор флоэмного сока [Baker, 2000].

В наших экспериментах инкубация листьев пшеницы в растворе зеатина увеличивала содержание рибозида зеатина во флоэмном соке. Полученные нами результаты соответствуют данным Collier с соавторами [Collier et al., 2003], которые показали базипетальный транспорт цитокининов по флоэме при введении в растения рибозида зеатина. Представляет интерес преобладание формы рибозидов цитокининов несмотря на то, что в растения вводили свободное основание зеатин. Эти результаты свидетельствуют о важности метаболизма цитокининов для контроля их транспорта по флоэме.

Тем не менее, ИП в неизменной форме доминировал во флоэмном соке растений, в листья которых вводили ИП. Известно, что это свободное

основание - наиболее гидрофобное вещество из изученных цитокининов, о чем можно судить по его хроматографической подвижности. Данное физико-химическое свойство ИП позволяет ему легко пересекать мембрану, обеспечивая его эффективную пассивную загрузку во флоэму. В отличие от ИП загрузка зеатина во флоэму очевидно зависит от его метаболизма. Поскольку транспорт зеатина очевидно в большей степени контролируется, чем ИП, распределение цитокининов между клетками нами было изучено в листьях, которые обрабатывали зеатином.

Сравнение иммунолокализации зеатина и его рибозида в листьях, обработанных зеатином, показало накопление рибозилированной формы в клетках обкладки сосудов листа, что соответствовало высокому уровню рибозида зеатина в диффузате из листьев. Активное накопление веществ в непосредственной близости от ситовидных трубок важно для их эффективного транспорта по флоэме [Lemoine et al., 2013]. Высокий уровень экспрессии переносчика нуклеозидов OsENT2 (предполагаемого транспортера цитокининов) в проводящих тканях растений риса и особенно во флоэмных клетках, свидетельствует об участии этого переносчика в дальнем транспорте нуклеозидов цитокининов путем их загрузки во флоэму [Hirose et al., 2005]. Следовательно, накопление цитокининов, обнаруженное нами в области сосудистых пучков листа дает основание предполагать, что этот феномен является следствием присутствия транспортеров цитокининов в клеточных мембранах растений пшеницы.

Таким образом, интенсивное окрашивание сосудистых пучков на рибозилированные формы цитокининов и доминирование рибозида зеатина в диффузате из листьев растений, обработанных зеатином, свидетельствует о важности превращения зеатина в его рибозид для транспорта производных зеатина из побега в корни. Экзогенный ИП не был модифицирован, и диффундировал из листа в неизменной форме. Мы не можем быть уверены в универсальности этого феномена, который может зависеть от особенностей транспортеров цитокининов и изменяться в зависимости от вида растений и их возраста. Это предположение соответствует данным литературы о об изменении количества цитокининов во флоэме в зависимости от физиологического состояния растений на момент сбора сока [Hoad, 1995]. Тем не менее, наши данные свидетельствуют о том, что оценка накопления и распределения цитокининов между клетками листа после фиксации свободных оснований цитокининов или их рибозидов может быть источником ценной информации о транспорте цитокининов.

Работа поддержана РФФИ (грант 13-04-00666, Веселов С.Ю.)

Список литературы

1. Baker D.A. Vascular transport of auxins and cytokinins in *Ricinus* // *Plant Growth Regul.* 2000. V.32. P. 157–160.
2. Bernier G. My favourite flowering image: the role of cytokinin as a flowering signal // *J. Exp. Bot.* 2013. V.64. P. 5795–5799.
3. Bishopp A., Lehesranta S., Vaten V., Help H., El-Showk E., Scheres B., Helariutta K., Mahonen A.P., Sakakibara H., Helariutta Y. Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem // *Curr. Biol.* 2011. V. 21. P. 927–932.
4. 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.
5. Collier M.D., Sheppard J., Crossley A., Hanke D.E. Needle cytokinin content as a sensitive bioindicator of N pollution in Sitka spruce // *Plant Cell Environ.* 2003. V. 26. P. 1929–1939.
6. Corbesier L., Prinsen E., Jacquard A., Lejeune P., Van Onckelen H., Perilleux C., Bernier G. Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition // *J. Exp. Bot.* 2003. V. 54. P. 2511–2517.
7. 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.
8. 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.
9. Hoad G.V. Transport of hormones in the phloem of higher plants // *Plant Growth Regul.* 1995. V. 16. P. 173–182.
10. Jiang F., Timergalina L., Kudoyarova G., Jeschke W.D., Hartung W. Growth and development of the facultative root hemiparasite *Rhinanthus minor* after removal of its host // *Funct. Plant Biol.* 2007. V.34. P. 237–245.
11. 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.
12. 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. V. 65. P. 2287–2294.
13. Lemoine R., La Camera S., Atanassova R., Dédaldéchamp F., Allario T., Pourtau N., Bonnemain J.L., Laloi M., Coutos-Thévenot P., Maurousset L., Faucher M., Grousse C., Lemonnier P., Parrilla J., Durand M. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors // *Front Plant Sci.* 2013 V. 24. P. 272. doi: 10.3389/fpls.2013.00272. eCollection 2013
14. 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.
15. Muraro D., Wilson M., Bennett M.C. Root development: cytokinin transport matters, too! // *Cur. Biol.* 2011. V. 21. P. R423–R425.
16. Puig J., Pauluzzi G., Guiderdoni E., Gantet P. Regulation of shoot and root development through mutual signaling // *Mol. Plant.* 2012. V.5. P. 974–983.
17. Sakakibara H. Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006. V. 57. P. 431–449.
18. Sasaki T., Soyano T., Kojima M., Sakakibara H., Kawaguchi M. Shoot-derived cytokinins

- systemically regulate root nodulation // Nature Com. 2014. V.5: 4983 doi: 10.1038/ncomms5983
19. Stirk, W.A., Van Staden, J. Flow of cytokinins through the environment // Plant Growth Regul. 2010. V. 62. P. 101-116.
20. Taylor J.S., Thompson B., Pate J.S., Atkins C.A., Pharis R.P. Cytokinins in the phloem sap of white lupin (*Lupinus albus* L.) // Plant Physiol. 1990. V. 94. P. 1714–1720.
21. Veselov S.U., Valke R. Separate histochemical determination of glycosylated forms of cytokinins and their free bases in the tobacco plants. Proceedings of the 3rd all-Russian conference Immunoassay of Growth Regulators, 3-6 October 2000, Bashkir University, Ufa, Russia, pp. 6-12.

ESTIMATION OF THE DISTRIBUTION OF CYTOKININS BETWEEN THE CELLS OF THE LEAF AS AN APPROACH TO THE STUDY OF PHLOEM TRANSPORT OF CYTOKININS IN PLANTS OF WHEAT

Veselov S.Yu.¹, Timergalina L.N.², Akhiyarova G.R.², Kudoyarova G.R.²

¹Baskir State University, Ufa, Russian Federation

²Ufa Institute of Biology, Russian Academy of Sciences,
pr. Oktyabrya 69, 450054 Ufa, Russian Federation

Summary

Presence of cytokinins both in xylem and phloem saps suggests involvement of these hormones in long distant signaling. Root-to-shoot cytokinin transport is well documented, however, much less is known about shoot-to-root transport. In the present study we followed concentration of free cytokinin bases and ribosides in the phloem sap (leaf diffusate) after incubation of leaves in a solution supplemented with either zeatin or isopentenyladenine. Different procedures of fixation were used to conjugate either cytokinin bases or their ribosides to proteins of cytoplasm to enable visualization of the differential localization of these cytokinins in the leaf cells of plants. In vivo localization shows the presence of ribosylated forms of cytokinins in leaf vascular bundles. This suggests that conversion of zeatin to its riboside is important for the shoot-to-root transport of zeatin-type cytokinins. Exogenous isopentenyladenine was not modified, but diffused from the leaves as free base. Although these metabolic differences may be not universal and may depend on the plant species and age, our data show that measurements of accumulation and distribution of cytokinins between the leaf cells after specific fixation of either free cytokinin bases or their ribosylated forms may be a valuable source of information concerning cytokinin metabolism and transport.

Key words: immunolocalization, cytokinin metabolism and transport, phloem, *Triticum durum*