

СПОСОБНОСТЬ ПОГЛОЩАТЬ ЭКЗОГЕННЫЕ ЦИТОКИНИНЫ И СОДЕРЖАНИЕ ЭНДОГЕННЫХ ЦИТОКИНИНОВ У МУТАНТНЫХ ПО ПЕРЕНОСЧИКУ РИБОЗИДОВ ENT РАСТЕНИЙ АРАБИДОПСИСА

Коробова¹ А.В., Möhlmann² Т., Кудоярова¹ Г.Р., Веселов³ С.Ю.

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия; muksin@mail.ru

²University of Kaiserslautern, Kaiserslautern, Germany

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный университет», Уфа, Россия

Резюме

Изучена роль мембранного переносчика, кодируемого геном *ENT3*, в транспорте рибозилированной формы зеатина. Объектом исследования служили растения арабидопсиса исходного генотипа *Columbia* и мутантные по гену *ENT3*. Анализ содержания цитокининов в побегах и корнях растений обоих генотипов без какого-либо воздействия и при введении в корнеобитаемую среду протонифора карбонил-цианид-м-хлорфенилгидразона и/или зеатинрибозида показал необходимость указанного переносчика для нормального транспорта цитокининов через мембрану и их поглощения клетками.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, *ENT3*, цитокинины, карбонил-цианид-м-хлорфенилгидразон, транспорт

Введение

Мембранные белки, способные осуществлять транспорт различных веществ, играют важную роль в жизни растений. На примере переносчиков ауксинов показана их роль в регуляции транспорта гормонов, обеспечивающего накопление ауксинов в определенных клетках, что определяет их дальнейшую судьбу [Petrasek, Friml, 2009]. Так, дифференциальная экспрессия генов, контролирующих синтез переносчиков ауксинов, приводит к накоплению этих гормонов в отдельных клетках перицикла и инициации закладки примордиев боковых корней [Benkova et al., 2003]. Хорошо известно, что гормоны класса цитокининов взаимодействуют с ауксинами в регуляции роста и развития растений [Bishopp et al., 2011]. Вместе с тем, о переносчиках цитокининов до последнего времени было мало известно, и лишь с 2000 года появились отдельные публикации о способности переносчиков азотистых оснований и их рибозидов транспортировать через мембрану также и цитокинины [Burkle et al., 2003; Hirose et al., 2005]. Вместе с тем, их способность к трансмембранному переносу цитокининов была показана, в основном, в

модельных опытах с клетками дрожжей, экспрессирующих гены *ENT*, а роль этих переносчиков в регуляции уровня и распределения цитокининов в растениях остается слабо изученной. Поэтому цель данной работы состояла в том, чтобы проверить, отличаются ли мутантные по гену *ENT* растения арабидопсиса от растений исходного генотипа по уровню эндогенных цитокининов и способности поглощать экзогенный гормон.

Материалы и методы.

Объектом исследования служили четырехнедельные растения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) исходной линии *Columbia* (*col*) и мутантные растения по гену *ENT3*, кодирующего мембранный переносчик рибозидов азотистых оснований.

Для синхронизации прорастания семена на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри помещали в холодильную камеру на трое суток. Затем переносили в сосуды с песком, насыщенным раствором Хогланда-Арнона. Растения выращивали в климатической камере (MLR-350H, Sanyo, Япония) при освещенности 120 $\mu\text{моль фотонов}/(\text{м}^2$

с), температуре 23°C днем и 19°C ночью, продолжительности светового периода 16 ч. После прорастания семян относительную влажность песка поддерживали на уровне 65%. Возраст растения отсчитывали от даты переноса с +4°C в климатическую камеру.

В возрасте 3 недель растения пересаживали на плотки и выращивали на жидкой среде Хогланда-Арнона. В питательный раствор части 28-дневных растений обоих генотипов добавляли зеатинрибозид до конечной концентрации 4×10^{-7} М. Через 24 ч проводили фиксацию тканей побегов и корней в 80%-ном этаноле, при этом за 1 ч до сбора материала в среду части обработанных и необработанных цитокинином растений добавляли протонофор карбонил цианид-м-хлорфенилгидразон (КЦХФ) до конечной концентрации 10 μ М.

Поле инкубации зафиксированных в этаноле тканей при +4°C в течение ночи из отфильтрованного экстракта удаляли этанол упариванием и водный остаток наносили на картридж С-18, который затем промывали 20 мл дистиллированной воды. Цитокинины элюировали 80%-ным спиртом, упаривали досуха и, растворив в минимальном количестве 80%-ного спирта, наносили на силуфоловую пластину для тонкослойной хроматографии (ТСХ), которую проводили в системе растворителей бутанол : аммиак : вода (6 : 1 : 2). После детекции в УФ свете

положения метчиков зеатина и его рибозида, содержащее зон элюировали 0,1 М натрий-фосфатным буфером (рН 7,2-7,4). После удаления силикагеля путем центрифугирования, в надосадочной жидкости определяли содержание цитокининов с помощью твердофазного иммуноферментного анализа [Arkhipova et al., 2007].

Статистический анализ проводили по стандартным программам MS Excel, на рисунках представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Результаты и их обсуждение

Мы определяли содержание трех форм цитокининов – зеатина, его рибозида и нуклеотида. Было показано, что эти гормоны могут легко превращаться друг в друга [Mok D.W., Mok M.C., 2001]. Суммарное содержание измеренных нами трех форм цитокининов в *ent* растениях было в 2-3 раза выше, чем у *col* растений (рис. 1). При этом у мутантных растений возрастала концентрация всех изученных форм цитокининов. Более высокий уровень гормонов у мутантных растений регистрировали как в побегах, так и в корнях. Особенность отдельных органов заключалось в том, что в побегах, в отличие от корней *ent* мутанта, было выявлено повышенное содержание нуклеотидов.

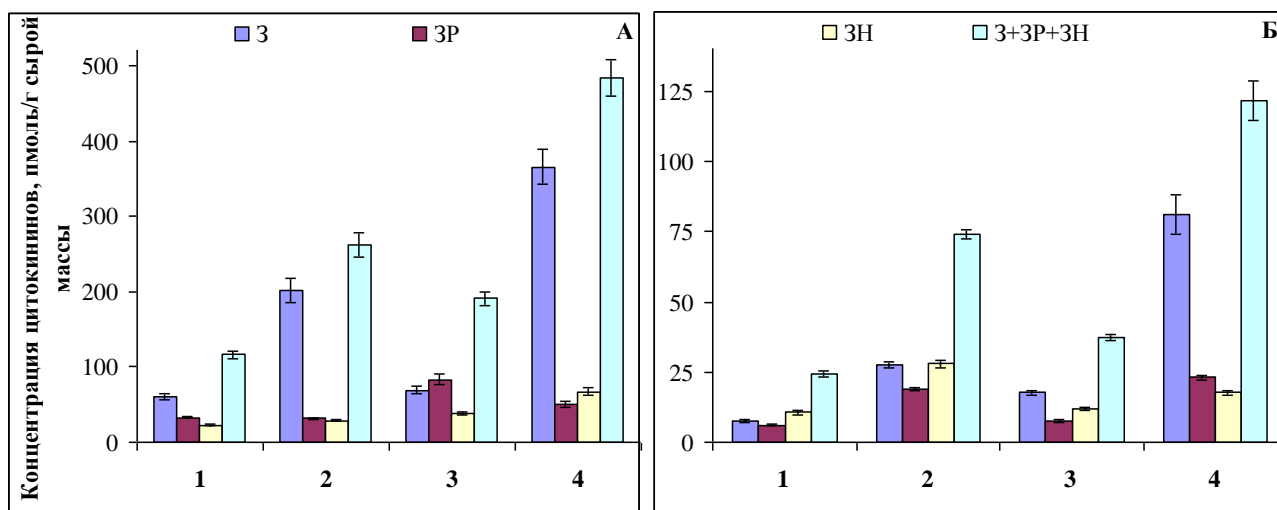


Рис. 1. Содержание зеатина (З), зеатинрибозида (ЗР) и зеатиннуклеотида (ЗН), а также их суммарная концентрация (З + ЗР + ЗН) в корнях (А) и побегах (Б) четырехнедельных растений *A. thaliana: col* (1) и *ent* (2) без дополнительных воздействий; *col* (3) и *ent* (4) после введения в среду протонофора КЦХФ.

Обработка растений ингибитором вторично активного транспорта КЦХФ повышала содержание цитокининов у растений обоих генотипов (как мутанта, так и его исходной формы) (рис. 1). В

корнях повышалось содержание всех изученных метаболитов цитокининов (зеатина, его рибозида и нуклеотида), а в побегах для растений обоих генотипов было характерно преимущественное

накопление зеатина под влиянием обработки растений протонофором.

Добавление в питательную среду растений экзогенного зеатинрибозид, как и следовало ожидать, приводило к повышению уровня цитокининов как у *col*, так и *ent* растений (рис. 2).

Однако степень увеличения уровня цитокининов была выше у растений исходного генотипа, чем у мутанта (уровень цитокининов у обработанных экзогенным гормоном растений был в 2 и 1,25 раза выше, чем в контроле у *col* и *ent* растений, соответственно).

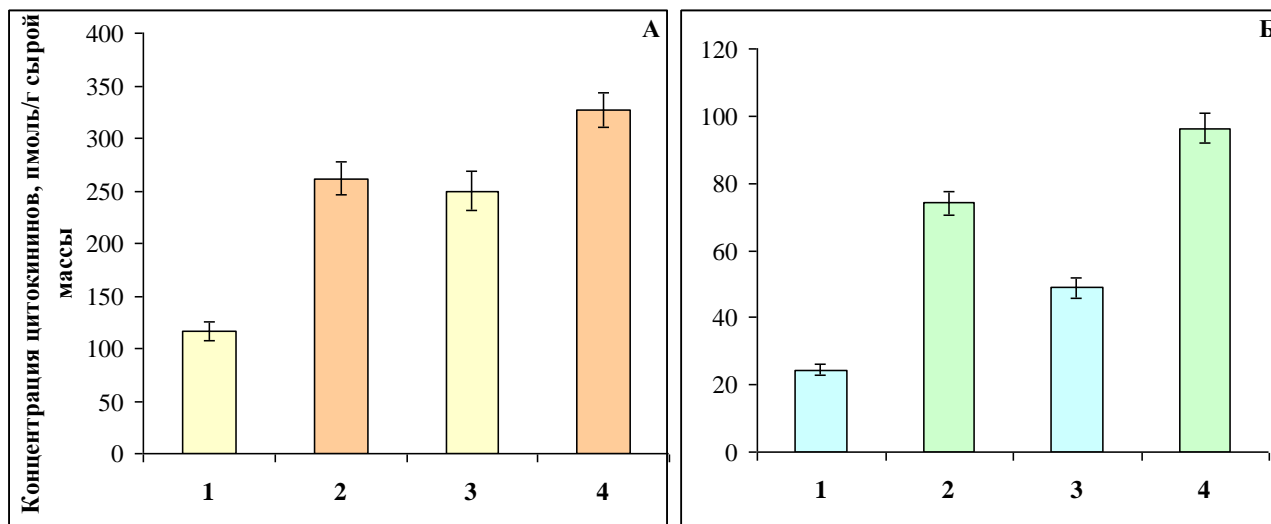


Рис. 2. Суммарное содержание цитокининов (зеатина, зеатинрибозид и зеатиннуклеотида) в корнях (А) и побегах (Б) четырехнедельных растений *A. thaliana*: *col* (1) и *ent* (2) без дополнительных воздействий; *col* (3) и *ent* (4) после введения в среду зеатинрибозид.

Пониженный уровень накопления цитокининов у мутантных растений, обработанных экзогенным рибозидом зеатина, легко объяснить мутацией предполагаемого гена переносчика цитокининов. Таким образом, полученные нами результаты подтверждают, что переносчик, кодируемый геном *ENT*, действительно необходим для нормального транспорта цитокининов через мембрану и их поглощения клетками. То, что, судя по увеличению уровня цитокининов у обработанных экзогенным гормоном мутантных растений, поглощение гормона все же происходило, можно объяснить или процессом пассивной диффузии гормона через мембрану по градиенту концентрации без участия переносчиков или тем, что перенос мог осуществляться другими белками данного семейства, которые имеются у растений арабидопсиса [Hirose et al., 2005].

Таким образом, судя по пониженному уровню накопления цитокининов у обработанного рибозидом зеатина мутанта, его клетки отличались пониженной способностью к поглощению цитокининов. Как же тогда можно объяснить повышенный уровень эндогенных цитокининов, который мы обнаружили как у мутантных растений по сравнению с растениями исходного генотипа, так

и у обработанных КЦХФ растений, у которых данный ингибитор подавлял процесс вторично активного поглощения? Хорошо известно, что растения обладают гибкой системой гомеостатирования уровня цитокининов, которая обеспечивает включение механизмов, направленных на поддержание их уровня в клетках, необходимого для протекания жизненно важных процессов [То, Kieber, 2007]. Эта система гомеостатирования уровня цитокининов включает, например, ферменты из класса цитокининоксидаз. Так, обработка растений экзогенными цитокининами активировала ферменты, катализирующие их распад [Jones, Schreiber, 1997]. Это позволяет предполагать, что снижение способности клеток поддерживать уровень цитокининов за счет активности их переносчиков, включает компенсаторные механизмы, направленные на повышение их уровня. Такими процессами могут быть повышение уровня синтеза гормонов, снижение скорости их распада или освобождение из связанных форм.

Выяснение того, какой их перечисленных процессов мог реализоваться в данном случае, - задача будущего. В настоящее время мы можем лишь констатировать, что снижение способности клеток поглощать цитокинины приводит к

повышению их общего содержания в растениях. Поскольку определение суммарного содержания цитокининов не позволяет дифференцировать цитокинины, которые накапливаются в самих клетках и вне них, с помощью этого метода мы зарегистрировали повышение их общего содержания в органах растений с пониженной способностью к поглощению цитокининов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-00666.

Литература

1. 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 Soil*. 2007. V. 292. P. 305–315.
2. Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G., Friml J. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation // *Cell*. 2003. V. 115. P. 591–602.
3. Bishopp A., Benkova E., Helariutta Y. Sending mixed messages: auxin–cytokinin crosstalk in roots // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2011. V. 14. P. 10–16.
4. Burkle L., Cedzich A., Dopke C., Stransky H., Okumoto S., Gillissen B., Kuhn K., 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. 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.
6. Jones R., Schreiber B.M.N. Role and function of cytokinin oxidase in plants // *Plant Growth Regul.* 1997. V. 23. P. 123–134.
7. Mok D.W., Mok M.C. Cytokinin metabolism and action // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001. V. 52. P. 89–118.
8. Petrasek J., Friml J. Auxin transport routes in plant development // *Development*. 2009. V. 136. P. 2675–2688.
9. To J.P., Kieber J.J. Cytokinin signaling: two-components and more // *Trends Plant Sci.* 2007. V.13. P. 85–92.

ABILITY OF *ENT3* MUTANTS OF ARABIDOPSIS PLANTS TO UPTAKE EXOGENOUS CYTOKININS AND ENDOGENOUS CYTOKININS CONTENT

Korobova¹ A.V., Möhlmann² T., Kudoyarova¹ G.R., Veselov³ S.Yu.

¹Institute of Biology, Ufa Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia; guzel@ufaras.ru;

²University of Kaiserslautern, Kaiserslautern, Germany;

³Bashkir State University, Ufa, Russia.

Resume

Role of membrane transporter encoded by *ENT3* gene in transport of ribosylated zeatin form was investigated. *Arabidopsis* plants of wild type (*Columbia*) and their *ent3* mutants were used for this study. Analysis of cytokinin content in shoots and roots of both genotypes without any impact and after treatment with protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone and/or zeatin riboside showed the importance of the transporter for normal transmembrane transport of cytokinins and their uptake by cells.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, *ENT3*, cytokinins, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, transport