

УДК 581.1

НАКОПЛЕНИЕ И ИНАКТИВАЦИЯ ЭНДОГЕННЫХ ЦИТОКИНИНОВ В ПОБЕГАХ И КОРНЯХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ В ОТВЕТ НА ОБРАБОТКУ КОРНЕЙ РИБОЗИДОМ ЗЕАТИНА

А.В. КОРОБОВА

*Институт биологии Уфимского научного центра Российской академии наук
450054 Уфа, просп. Октября, 69
e-mail: muksin@mail.ru*

В результате обработки корней растений пшеницы раствором рибозидов зеатина обнаружено значительное увеличение содержания цитокининов в корнях и относительно меньшее — в побегах. При этом активность фермента цитокининоксидазы под влиянием экзогенного рибозидов зеатина в корнях не повышалась, а в побегах — возрастала. Показана важная роль цитокининоксидазы в защите растений от избытка цитокининов, поступающих из корнеобитаемой среды. Через 2 сут после добавления в питательный раствор цитокинина масса сухого вещества побегов по сравнению с необработанными растениями увеличивалась. Сделан вывод, что цитокининоксидаза полностью не инактивировала поступившие в растения цитокинины, а лишь снижала уровень их накопления, вероятно, предотвращая тем самым возможное ингибирующее действие этих соединений.

Ключевые слова: *Triticum durum* Desf., цитокинины, рибозид зеатина, цитокининоксидаза.

Цитокинины — группа растительных гормонов, регулирующих многие процессы роста и развития растений [11, 13]. Эффекты цитокининов связаны в основном с их способностью стимулировать деление определенной группы клеток-предшественников [5]. Их функция проявляется на всех этапах онтогенеза, начиная от развития оплодотворенной яйцеклетки и заканчивая процессами старения растительного организма [4].

Несмотря на важные открытия в области синтеза, метаболизма и механизма действия цитокининов [7, 10, 14], данные об их сигнальной функции на уровне целого растения противоречивы.

Много внимания уделяется ферменту цитокининоксидазе [8, 17]. По некоторым данным, она локализуется в местах проникновения цитокининов из почвы в корни растения [6]. Предполагается, что в результате этого снижается способность гормонов, содержащихся в ризосфере, влиять на рост растений. Вместе с тем, по литературным данным [1], ризосферные гормоны способны влиять на рост растений. Таким образом, важно было определить степень инактивации экзогенных цитокининов ферментом цитокининоксидазой: влияют ли цитокинины корнеобитаемой зоны на рост растений или они полностью метаболизируются. Для этого мы применили комплексный подход: в одинаковых условиях выращивания растений пшеницы одного сорта мы определяли активность фермента цитокининоксидазы, содержание цитокининов в тканях, из-

меряли рост растений после добавления в питательный раствор цитокинина (рибозида зеатина).

Методика

Объектом исследования были растения твердой яровой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) сорта Безенчукская 139. Семена проращивали в темноте в течение 3 сут на водопроводной воде при 24 °С. Трехсуточные проростки пересаживали на 10 %-й раствор Хогланда—Арнона I (Х—А). За день до обработки цитокинином растения распределяли по сосудам со 100 мл 100 %-го раствора Х—А для адаптации. В возрасте растений 7 сут питательный раствор заменяли свежим, при этом в половину сосудов добавляли рибозид зеатина ($4 \cdot 10^{-7}$ М).

Активность фермента цитокининоксидазы определяли через 6 и 24 ч после введения в корнеобитаемую среду рибозида зеатина по деградации субстрата изопентениладенозина (ИПА) при наличии ионов Cu^{2+} за 4 ч инкубации [3]. Количество неразрушенного ферментом субстрата определяли иммуноферментным анализом [2].

Цитокинины из растительного материала экстрагировали 80 %-м этанолом [16], очищали и экстрагировали на картридже С-18. Концентрацию цитокининов определяли иммуноферментным анализом.

Через 2 сут после внесения рибозида зеатина в питательный раствор определяли массу сырого вещества побегов и корней, рассчитывали соотношение их масс.

Результаты и обсуждение

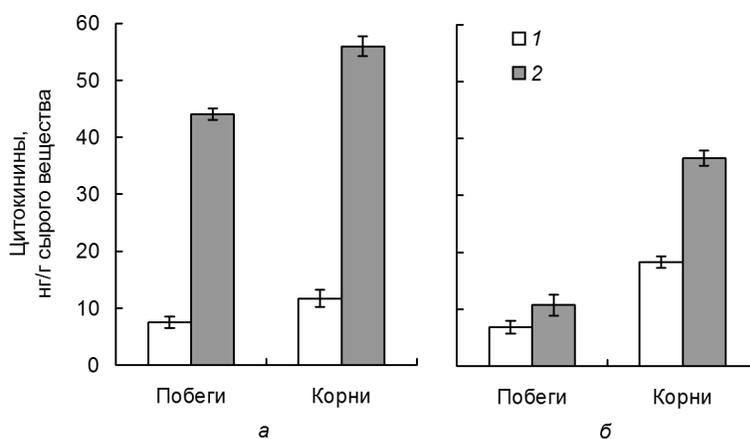
Для нормального прохождения клеточного цикла необходим жесткий контроль уровня цитокининов, определяющегося их синтезом и распадом в самих делящихся клетках. На основании этого возникло предположение о необходимости защиты меристематических клеток от цитокининов, поступающих извне, концентрация которых превышает физиологический уровень [17]. Эту роль, по всей видимости, выполняет цитокининоксидаза, проявляющая высокую активность в межклетниках [6]. Так, у растений арабидопсиса под влиянием экзогенных цитокининов повышалась экспрессия некоторых генов семейства цитокининоксидаз [12].

Согласно результатам наших экспериментов, активность цитокининоксидазы в корнях растений, не обработанных рибозидом зеатина, была в 2,5—3 раза выше, чем в побегах (табл. 1), что соответствует литературным данным [9]. После введения гормона в питательный раствор способность фермента катализировать распад цитокининов в корнях увеличивалась незначительно.

Локализация цитокининоксидазы в растениях пшеницы не установлена. В растениях кукурузы она обнаружена в ризодерме корней, вокруг сосудов и в примордиях, что подтверждает возможность инактивации цитокининов, поступающих в растение из корнеобитаемой среды [6]. Предполагалось, что активность этого фермента в ризодерме корней способна предотвращать проникновение цитокининов из среды в растение, а локализация цитокининоксидазы вокруг сосудов может препятствовать попаданию экзогенных цитокининов в побеги [6]. Однако, если такой механизм и функционировал у растений пшеницы в наших экспе-

ТАБЛИЦА 1. Активность цитокининоксидазы в побегах и корнях 9-суточных растений пшеницы через 6 и 24 ч после добавления в питательный раствор рибозид зeaтина (опыт) и необработанных растений (контроль)

Время после обработки растений рибозидом зeaтина, ч	Орган растения	Активность цитокининоксидазы, нг ИПА/(ч · г сырого вещества)	
		Контроль	Опыт
6	Побег	2,52 ± 0,31	4,85 ± 0,39
	Корень	7,74 ± 0,66	7,31 ± 0,62
24	Побег	2,79 ± 0,29	3,51 ± 0,33
	Корень	6,12 ± 0,74	5,83 ± 0,62



Суммарное содержание цитокининов (зеатин + рибозид зeaтина + зeaтиннуклеотид) в побегах и корнях растений пшеницы через 6 (а) и 24 ч (б) после добавления в питательный раствор рибозид зeaтина (1, 2 — соответственно необработанные и обработанные растения)

риментах, он был недостаточно эффективен, что подтверждает 6-кратное накопление цитокининов в корнях обработанных цитокинином растений (рисунок, а), повышение активности цитокининоксидазы в побегах (см. табл. 1) через 6 ч после введения гормона в питательный раствор и то, что концентрация гормонов в побегах растений через 6 ч после введения в питательный раствор рибозид зeaтина в 5 раз превосходила концентрацию цитокининов в побегах необработанных растений (см. рисунок, а).

Таким образом, повышенной активности цитокининоксидазы в побегах обработанных рибозидом зeaтина растений было недостаточно, чтобы инактивировать все экзогенные цитокинины.

Активность цитокининоксидазы в побегах растений, получавших экзогенные цитокинины, на следующие сутки эксперимента оставалась на более высоком уровне по сравнению с необработанными растениями (см. табл. 1), что, вероятно, сказалось на концентрации гормонов в побегах, которая была ниже, чем у растений, получавших рибозид зeaтина в течение 6 ч (см. рисунок). Однако содержание гормонов в побегах и корнях обработанных растений по сравнению с необработанными через 24 ч после введения в питательный раствор рибозид зeaтина было выше соответственно в 1,5 и 2 раза (см. рисунок, б). Полагают, что такое изменение концентрации цитокининов является физиологически значимым [15]. В связи с этим важно оценить влияние экзогенной обработки

НАКОПЛЕНИЕ И ИНАКТИВАЦИЯ ЭНДОГЕННЫХ ЦИТОКИНИНОВ

ТАБЛИЦА 2. Масса сухого вещества побегов и корней и их соотношение у 9-суточных растений пшеницы через 48 ч после введения в среду рибозида зеатина (опыт) и необработанных гормонов растений (контроль)

Вариант	Масса сухого вещества, г		Соотношение масс побег/корень
	побег	корень	
Контроль	0,027 ± 0,001	0,006 ± 0,000	4,33
Опыт	0,031 ± 0,001	0,006 ± 0,001	5,75

корней растений рибозидом зеатина на накопление массы. Содержание гормонов в растениях изменяется довольно быстро и предшествует ростовым реакциям. В связи с этим мы определяли массу сухого вещества побегов и корней обработанных и необработанных цитокинином растений через 48 ч после введения рибозид зеатина в питательный раствор.

Установлено, что через 48 ч после добавления в питательный раствор рибозид зеатина накопление массы сухого вещества побегами по сравнению с необработанными растениями повышалось, тогда как масса сухого вещества корней обработанных растений оставалась на уровне контрольных растений (табл. 2). В результате увеличивалось соотношение побег/корень. Наблюдавшаяся нами реакция растений не противоречит литературным данным, так как известно, что цитокинины способствуют росту побегов [17].

Таким образом, значительное накопление цитокининов в корнях растений и относительно меньшее — в побегах после добавления в питательный раствор рибозид зеатина свидетельствует о возможной регуляции загрузки цитокининов в ксилему. Несмотря на высокую активность цитокининоксидазы, инактивация экзогенных цитокининов была неполной, гормоны питательной среды влияли на рост растений, способствуя преимущественному росту побегов. Цитокининоксидаза снижала уровень накопления цитокининов, вероятно, предотвращая тем самым их возможное ингибирующее действие.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 08-04-00591-а.

1. *Архипова Т.Н., Веселов С.Ю., Мелентьев А.И. и др.* Сравнение действия штаммов бактерий, различающихся по способности синтезировать цитокинины, на рост и содержание цитокининов в растениях пшеницы // Физиология растений. — 2006. — **53**, № 4. — С. 567—574.
2. *Веселов С.Ю.* Использование антител для количественного определения, очистки и локализации регуляторов роста растений. — Уфа: Изд-во Башк. ун-та, 1998. — 138 с.
3. *Веселов С.Ю., Симонян М.В.* Использование иммуноферментного анализа цитокининов для оценки активности цитокининоксидазы // Физиология растений. — 2004. — **51**, № 2. — С. 297—302.
4. *Кулаева О.Н.* Цитокинины, их структура и функции. — М.: Наука, 1973. — 264 с.
5. *Романов Г.А.* Как цитокинины действуют на клетку // Физиология растений. — 2009. — **56**, № 2. — С. 295—319.
6. *Brugiére 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 Physiol. — 2003. — **132**. — P. 1228—1240.
7. *Choi J., Hwang I.* Cytokinin: perception, signal transduction, and role in plant growth and development // J. Plant Biol. — 2007. — **50**, N 2. — P. 98—108.
8. *Galuszka P., Popelkova H., Werner T. et al.* Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. // J. Plant Growth Regul. — 2007. — **26**. — P. 255—267.
9. *Jones R.J., Schreiber B.M.N.* Role and function of cytokinin oxidase in plants // Plant Growth Regul. — 1997. — **23**. — P. 123—134.
10. *Kakimoto T.* Biosynthesis of cytokinins // J. Plant Res. — 2003. — **116**. — P. 233—239.

11. Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M. et al. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme // *Nature*. — 2007. — **445**. — P. 652–655.
12. Lee D.J., Park J.Y., Ku S.J. et al. Genome-wide expression profiling of Arabidopsis response regulator 7 (ARR7) overexpression in cytokinin response // *Mol. Gen. Genomics*. — 2007. — **277**. — P. 115–137.
13. Mok D.W.S., Mok M.C. Cytokinin metabolism and action // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 2001. — **52**. — P. 89–118.
14. Mok M.C., Martin R.C., Mok D.W.S. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception in vitro // *Cell Dev. Biol. Plant*. — 2000. — **36**. — P. 102–107.
15. Singh S., Latham D.S., Palni L.M.S. Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VII. Endogenous cytokinin levels and exogenous applications of cytokinins in relation to sequential leaf senescence of tobacco // *Physiol. Plant*. — 1992. — **86**. — P. 388–397.
16. 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. — **27**. — P. 69–77.
17. Werner T., Motyka V., Laucou V. et al. Cytokinin-deficient transgenic arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity // *Plant Cell*. — 2003. — **15**, N 11. — P. 2532–2550.

Получено 03.06.2010

НАКОПИЧЕННЯ Й ІНАКТИВАЦІЯ ЕНДОГЕННИХ ЦИТОКІНІНІВ У ПАГОНАХ І
КОРЕНЯХ РОСЛИН ПШЕНИЦІ У ВІДПОВІДЬ НА ОБРОБКУ КОРЕНІВ
РИБОЗИДОМ ЗЕАТИНУ

А.В. Коробова

Інститут біології Уфимського наукового центру Російської академії наук, Уфа

У результаті обробки коренів рослин пшениці розчином рибозиду зеатину виявлено значне збільшення вмісту цитокінінів у коренях і відносно менше — в пагонах. При цьому активність ферменту цитокініноксидази під впливом екзогенного рибозиду зеатину в коренях не підвищувалась, а в пагонах — зростала. Показано важливу роль цитокініноксидази в захисті рослин від надлишку цитокінінів, що надходять із коренезаселеного середовища. Через 2 доби після додавання в поживний розчин цитокініну маса сухої речовини пагонів порівняно з необробленими рослинами збільшувалась. Зроблено висновок, що цитокініноксидаза повністю не інактивувала цитокініни, які надійшли в рослини, а лише знижувала рівень їх накопичення, ймовірно, усуваючи тим самим можливу токсичну дію цих сполук.

ACCUMULATION AND INACTIVATION OF ENDOGENOUS CYTOKININS IN
SHOOTS AND ROOTS OF WHEAT IN RESPONSE TO ROOTS TREATMENT WITH
ZEATIN RIBOSIDE

A.V. Korobova

Institute of Biology of Ufa Scientific Centre, Russian Academy of Sciences
69 Octyabrya Pr., Ufa, 450054, Russia

Wheat seedlings roots were treated with zeatin riboside solution. The cytokinin content increased in roots and to less extent in shoots. At the same time the cytokinin oxidase activity in roots did not increase as it was in shoots in response to exogenous zeatin riboside. The important role of cytokinin oxidase in the protection of plants from higher level of cytokinins coming from root medium was supposed. Two days after treatment higher values of shoot dry weight were registered in comparison with control plants. It was concluded that cytokinin oxidase did not inactivate exogenous cytokinins completely but just reduced a cytokinin accumulation level and thus preventing their possible negative effects.

Key words: *Triticum durum* Desf., cytokinins, zeatin riboside, cytokinin oxidase.