

На правах рукописи



ШТРАТНИКОВА
Виктория Юрьевна

**Цитокинин-зависимая экспрессия *ARR5::GUS* конструкции
в ходе роста трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.
на нитратном и аммонийном источниках азота**

03.00.12 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2009

Работа выполнена в лаборатории экспрессии генома растений Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, г. Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Кулаева Ольга Николаевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

кандидат биологических наук

Клячко Нелла Леопольдовна

Бровко Фёдор Александрович

Ведущая организация: Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева, г. Москва

Защита состоится «19» мая 2009 г. в 11 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (495) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «15» апреля 2009 г.

Ученый секретарь

совета по защите докторских

и кандидатских диссертаций

кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

ВВЕДЕНИЕ

Цитокинины принимают участие в регуляции жизни растения на всех этапах онтогенеза от оплодотворения яйцеклетки до старения и смерти. Они участвуют в регуляции деления клеток, индуцируют стеблевой морфогенез, активируют дифференцировку хлоропластов и задерживают старение листьев, участвуют в регуляции транспорта метаболитов в растении; с их помощью корневая система регулирует функциональную активность в надземных органах, в частности, в листьях (Skoog and Miller, 1957; Кулаева, 1973, 1987; Mok and Mok, 2001).

Цитокинины также играют крайне важную роль в качестве медиаторов, обеспечивающих регуляцию роста надземных органов в ответ на нитратное питание растений. Влияние нитратов на реакцию растений на цитокинин было показано ещё в 1962 г. (Кулаева, 1962). С тех пор выяснено, что нитраты индуцируют экспрессию генов ключевых ферментов биосинтеза цитокининов — изопентенилтрансфераз (*AtIPT3*) (Takei et al., 2004). Нитраты активируют биосинтез цитокининов в корнях и усиливают их транспорт в надземные органы, вызывая стимуляцию ростовых процессов (Walch-Liu et al., 2000; Takei et al., 2001; Sakakibara et al., 2003). Цитокинины выполняют роль сигнала дальнего действия, с помощью которого поступающий в корни нитрат активирует рост листьев (Rahayu et al., 2005).

Маркёром действия цитокининов на листья может служить индукция генов-регуляторов ответа типа А (*ARR*-гены А типа), которые включаются цитокинином через мембранные рецепторные гистидинкиназы и индуцируемый ими фосфатный каскад (Taniguchi et al., 1998; Kiba et al., 1999). Гены *ARR* типа А являются генами прямого ответа на цитокинин, который специфично и быстро индуцирует их экспрессию. Для её изучения в лаборатории Kieber была создана генетическая конструкция, содержащая маркёрный ген бактериальной глюкононидазы (*GUS*) под контролем цитокинин-зависимого промотора *ARR5*-гена и были получены трансгенные растения *Arabidopsis thaliana* с этой конструкцией (D'Agoustino et al., 2000), которые широко используются в научных исследованиях (Romanov et al., 2002; Werner et al., 2003; Aloni et al., 2005). Было показано, что экспрессия конструкции *ARR5::GUS* повышалась при обработке *Arabidopsis thaliana* возрастающими концентрациями бензиладенина (БА) (D'Agoustino et al., 2000; Romanov et al., 2002; Lopez-Bucio et al., 2007), и уменьшалась при снижении концентрации эндогенных

цитокининов в результате трансформации растений геном оксидазы цитокинина (Werner et al., 2003).

Анализ активности GUS в таких трансформантах, проведённый параллельно с иммуногистохимическим изучением цитокининов, показал, что активность GUS отражает уровень активных форм цитокининов в тканях и может использоваться для оценки их распределения в растениях (Aloni et al., 2005). Это дало возможность изучения изменений уровня цитокининов в ходе развития отдельных органов и всего растения, а также в ответе растений на различные внешние воздействия.

К числу важных проблем жизни растений относится их реакция на снабжение азотом и участие в этом цитокининов. Известно, что аммоний в качестве единственного источника азота угнетает рост многих растений (Сао et al., 1993; Полесская и др., 2000; Walch-Liu et al., 2000), который восстанавливается под действием нитратов (Rahayu et al., 2005). Предполагается, что цитокинины вносят свой вклад в это восстановление (Walch-Liu et al., 2000; Rahayu et al., 2005).

Однако до сих пор не проводилось исследований, позволяющих установить изменение распределения цитокининов по растению в ходе его развития. Также не было данных, характеризующих это распределение при выращивании растений на различных источниках азотного питания в течение длительного срока развития. Анализ экспрессии *GUS*-гена под цитокинин-зависимым промотором *ARR5*-гена в трансформированных растениях *A. thaliana* дал хорошую методическую возможность для выяснения этих вопросов.

Цели и задачи исследования. Цель работы состояла в том, чтобы изучить, как уровень активных форм цитокининов, о котором судили по активности GUS в растениях *A. thaliana*, трансформированных *GUS*-геном под контролем цитокинин-зависимого промотора *ARR5*-гена, коррелирует с ростовыми процессами в трансформантах и как эти процессы зависят от нитратного и аммонийного питания растений.

В задачи работы входило

1. Проверка реакции промотора *ARR5*-гена на изменение уровня цитокинина в листьях трансгенных растений *Arabidopsis*.

2. Сравнение роста листьев растений и цитокинин-зависимой экспрессии в них *GUS*-гена в качестве критерия уровня в них активных форм цитокининов.
3. Изучение изменений в локализации активных форм цитокининов в ходе роста растений.
4. Сравнение особенностей распределения активных форм цитокининов в листьях и корнях растений, выращенных на нитратном и аммонийном источниках азота.
5. Изучение влияния экзогенного цитокинина на морфогенез и экспрессию *ARR5::GUS*-конструкции в трансгенных растениях *Arabidopsis* в условиях аммонийного питания.

Научная новизна и практическая ценность работы

Впервые охарактеризована динамика уровня активных форм цитокининов в ходе онтогенеза листа и установлено, что рост листа коррелирует с накоплением активных форм цитокининов, а прекращение роста — с резким падением их уровня. Установлено перемещение центров локализации цитокининов из нижних, закончивших рост листьев, в растущие листья верхних ярусов в ходе роста растений. Впервые установлены особенности активности *GUS* и, следовательно, распределения активных форм цитокининов в растениях, растущих на аммонийном азоте при полном отсутствии нитратов в питательной среде. В таких условиях угнеталось развитие надземной части и корневой системы растений, снижалась активность *GUS* в корнях, а также в гидатодах листьев. Это даёт основания предполагать подавление синтеза цитокининов в кончиках корней и их транспорта в надземные органы, что может быть причиной угнетения развития надземных органов. Добавление 10^{-9} мМ зеатина в питательную среду, содержащую в качестве единственного источника азота 2 мМ хлорида аммония, заметно исправляло нарушения морфогенеза в надземных органах, подтверждая роль недостатка цитокининов в угнетении роста растений на аммонийном источнике азота.

Проделанная работа вносит ощутимый вклад в понимание взаимодействия минерального питания и гормональной регуляции роста растения, что представляет интерес не только с точки зрения фундаментальной науки, но и при решении задач оптимизации роста растений. Полученные результаты могут быть использованы для

разработки теоретических основ управления продуктивностью растений. Проведенное нами детальное изучение в ходе развития *A. thaliana* экспрессии конструкции *ARR5::GUS*, широко используемой в научных работах во всём мире, является важным источником информации для дальнейших исследований с применением данной конструкции.

Апробация результатов работы. Основные результаты работы были представлены на всероссийских конференциях: в Сыктывкаре, 2007; Москве, 2007, 2008; Новосибирске, 2008; Екатеринбурге, 2008 и на XVI Конгрессе FESPB, Tampere, Финляндия, 2008.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 2 — в журналах, рекомендованных ВАК: 1 в центральном российском журнале по физиологии растений и 1 в зарубежном журнале.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, списка сокращений, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения и обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложений. Диссертационная работа изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы, 68 рисунков, 5 приложений. Список цитированной литературы составляет 147 наименований, из них 140 на английском языке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использовали растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (экотипа Wassilewskija), трансформированные конструкцией, содержащей бактериальный ген β-глюкуронидазы (*GUS*) под контролем цитокинин-зависимого промотора *ARR5*-гена (D'Agostino, 2000). Семена трансгенных растений были любезно предоставлены профессором Kieber J.J. (Университет Северной Каролины, США).

Семена стерилизовали и затем инкубировали при 4°C в чашках Петри на агаризованной (0,7% агара) питательной среде Мурасиге и Скуга с половинной концентрацией минеральных солей (MC1/2) или её модификациях в течение трёх дней для синхронизации прорастания. Модификации состояли в добавлении в среду MC1/2 в качестве единственного источника азота KNO₃, 20 или 2 мМ, или (NH₄)₂SO₄ 10 или 1 мМ (в среду с аммонийной солью добавляли KCl, соответственно, 10 или 2 мМ). Содержание сахарозы составляло 1%. Во все среды добавлялся MES-буфер для

стабилизации рН на уровне 5,7—6,0. Затем растения выращивали на указанной среде в климатической камере при освещении 120 $\mu\text{моль фотонов}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$, температуре 23°C, продолжительности светового периода 16 ч. Пробы для анализа отбирали 2 раза в неделю.

В ряде опытов семена проращивали на чашках Петри со средой МС в течение 10 дней, проростки переносили в почву и продолжали выращивать в тех же температурных и световых условиях. Розеточные листья 2 и 3 ярусов срезали с 3—7-недельных растений и использовали для определения хлорофилла, содержания белка и измерений активности GUS флуоресцентным методом.

В экспериментах с добавлением цитокининов в среду МС1/2, содержащую в качестве единственного источника азота 2 мМ NH_4Cl , добавляли раствор *транс*-зеатина в концентрациях 10^{-10} — 10^{-6} М.

Активность GUS определяли двумя методами:

1) Флуорометрический анализ активности GUS проводился согласно (Jefferson, 1987).

2) Выявление активности GUS с использованием X-Gluc (5-бромо-4-хлоро-3-индолил- β -D-глюкуронид) проводили согласно (Vitha, 1995). Затем растения фотографировали, фотографии растений, окрашенных в результате GUS-реакции в синий цвет, переводили в чёрно-белое изображение (8-битная цветопередача), и интенсивность окраски количественно оценивали с помощью программы ImageJ. Результаты приведены в условных единицах (0—255) по системе HSV компьютерной графики, представляющих собой среднюю интенсивность окраски на единицу проанализированной площади. Площадь листьев и семядолей, длину черешков и корней измеряли на фотографиях растений с использованием программы ImageJ.

Растворимый белок определяли по методу (Bradford, 1976). Содержание хлорофилла измеряли согласно (Arnon, 1949).

Определение нитратов в растениях проводили ионометрическим методом.

Обработку полученных данных проводили в программе Excel. Опыты проводили минимум в трёх биологических повторностях и повторяли 2—3 раза, на графиках приведены данные характерного опыта. Бары представляют собой стандартную ошибку.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ применимости метода оценки уровня цитокининов по активности GUS в тканях растений *Arabidopsis thaliana*, трансформированных маркёрным геном GUS под контролем цитокинин-зависимого промотора ARR5-гена

Для проверки правомерности изучения уровня активных форм цитокининов в трансформантах по активности GUS листья 1 яруса, срезанные с 3-недельных растений, инкубировали на растворах БА (10^{-8} М— 10^{-6} М) в течение 24 ч в темноте. Активность GUS определяли по анализу окраски листьев с помощью X-Gluc в качестве субстрата. Приведённые на рис. 1 данные показали зависимость активности GUS от логарифма концентрации БА в растворе. Результаты подтвердили правомерность суждения в наших опытах об уровне активных форм цитокининов в тканях растений по интенсивности активности GUS.

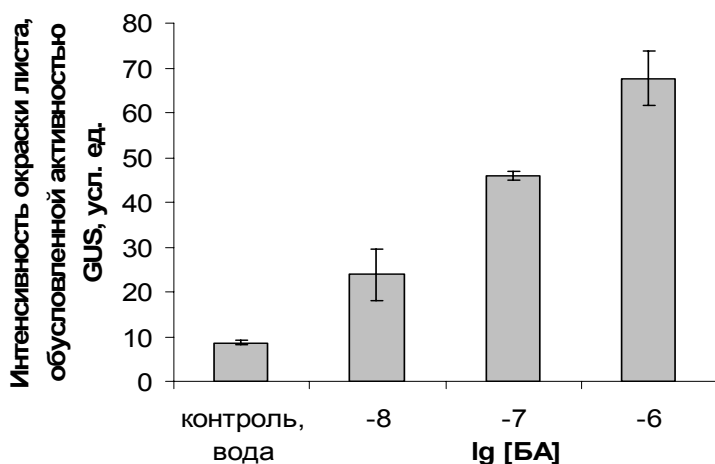


Рисунок 1. Зависимость активности GUS в срезанных листьях от логарифма концентрации БА в растворе инкубации листьев. После инкубации с цитокинином активность GUS определяли с использованием X-Gluc.

Этот вывод был подтверждён в опытах по определению активности GUS флуоресцентным методом в листьях 2-3 яруса, срезанных с 5-недельных растений *A. thaliana*, выращенных в почве, после инкубации листьев в течение 72 ч в темноте на растворе БА в концентрациях 10^{-8} М— 10^{-5} М. Было показано, что индукцию активности GUS в листьях вызывали также такие природные цитокинины (в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М), как *транс*-зеатин и изопентениладенин, тогда как аденин, производным которого являются природные цитокинины, но который лишён цитокининовой активности, не вызывал индукцию активности GUS в листьях. Её не индуцировали также другие регуляторы роста: абсцизовая кислота ($5 \cdot 10^{-5}$ М),

индолил-3-уксусная кислота (10^{-6} М), метилжасмонат ($5 \cdot 10^{-6}$ М), салициловая кислота ($5 \cdot 10^{-5}$ М) и спермин (СП, $5 \cdot 10^{-5}$ М).

Всё это говорит о высокой специфичности ответа промотора гена *ARR5* на цитокинины и подтверждает возможность оценки присутствия активных форм цитокининов в тканях по активности GUS в растениях *A. thaliana*, трансформированных GUS-геном под промотором *ARR5*-гена.

Сравнительное изучение роста листьев и активности в них GUS

В ходе работы была выявлена неоднородность имеющейся популяции трансгенных растений *Arabidopsis* по проявлению активности GUS и были получены чистые линии растений (растений, происходящих от одного предка), характеризующихся высокой («В») и низкой («Н») активностью GUS. В дальнейшем работа велась параллельно на обеих линиях. Основные полученные на них закономерности в общих чертах совпадали. Поэтому результаты представлены для одной из линий, с указанием, на какой линии они получены.

В качестве среды, служащей эталоном для сравнения и обеспечивающей нормальное развитие растений, была выбрана среда, содержащая 20 мМ нитрата в качестве единственного источника азота. На этой среде у растений формировалась полная розетка листьев с хорошо развитыми черешками. Растение переходило к цветению на третьей-четвёртой неделе жизни. Площадь листа могла достигать 8 мм², длина черешков — 4—8 мм. В наших условиях растения экотипа *Wassilewskija* закладывали 6-7 листьев розетки (считая семядольные) (рис. 5А).

В молодом листе активность GUS не обнаруживалась или была низкой (рис. 2.Г1). По мере роста листа она появлялась в сосудистой системе черешка и в области апикальной гидатоды (рис. 2.А1, В1, Г1). Наиболее высокая активность GUS наблюдалась в областях сосудистой системы (рис. 2.В1). Как показывает рис. 2, рост листа совпадал с периодом увеличения активности GUS, что указывало на увеличение уровня активных форм цитокининов в листе. Почти сразу после достижения листом максимального размера происходило значительное снижение активности GUS в пластинке (рис. 2.В1, Г1). Это доказывает, что прекращение роста листа происходит в условиях снижения содержания в них активных форм цитокининов, что связано, возможно, с оттоком или с перераспределением цитокининов, поступающих из корней, от закончившего рост листа в растущие листья. Дольше всего активность GUS сохранялась в базальных областях листа, в сосудистой системе черешка и в гидатодах (рис. 2.В1, Г1).

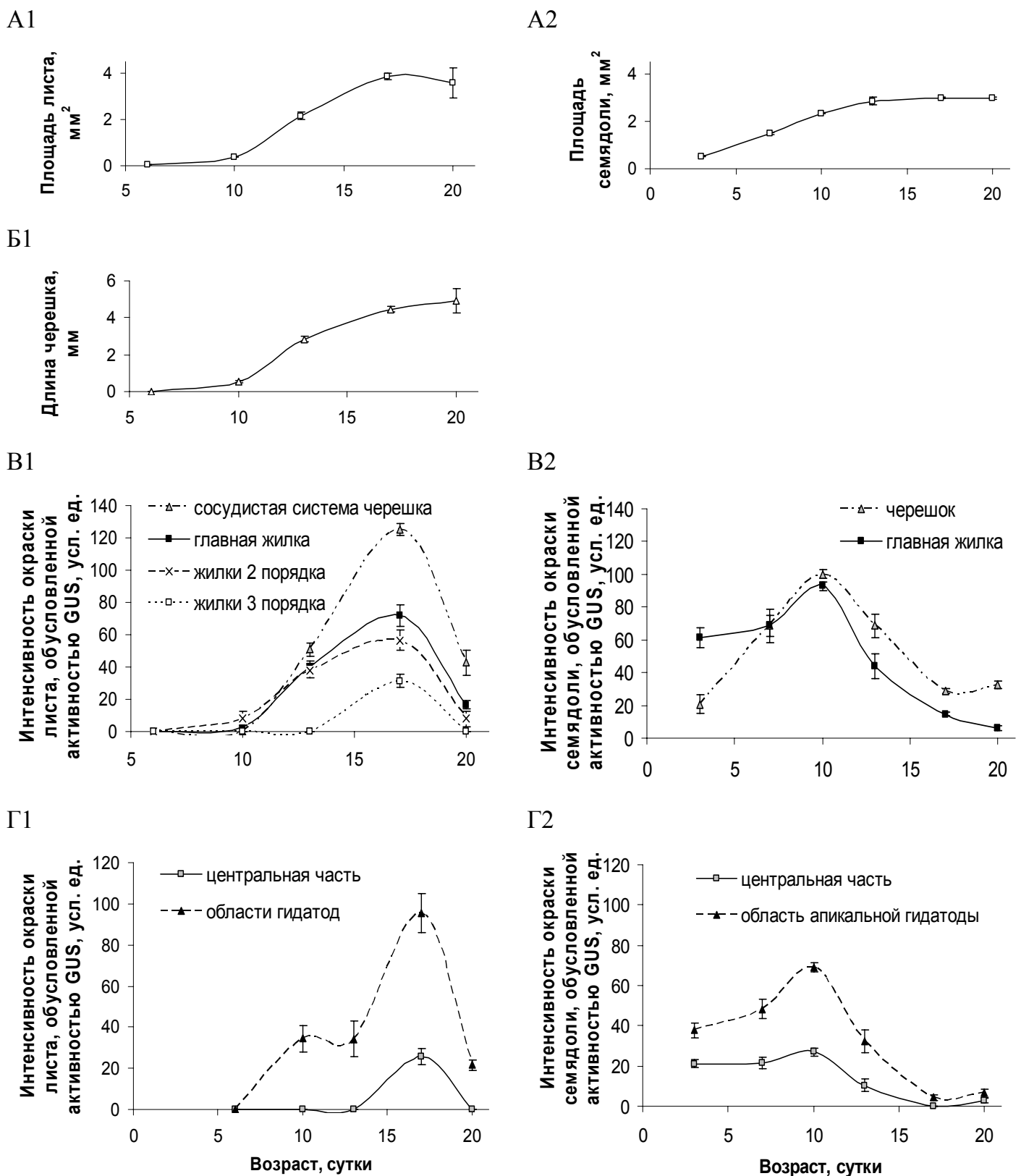


Рисунок 2. Характеристика роста и активности GUS в листе первого яруса и семядолях *Arabidopsis thaliana*, выращенных на среде, содержащей 20 мМ нитрат калия в качестве единственного источника азота. Линия Н. 1. Лист 1-го яруса. 2. Семядоли. Площадь листа (A1) и семядоли (A2), длина черешка листа (B1), активность GUS в сосудистой системе листа (B1) и семядоли (B2), активность GUS в пластинке листа (Г1) и семядоли (Г2).

Линия В отличалась высокой активностью GUS в мезофилле листьев, поэтому изменение активности GUS в мезофилле на ней прослеживалось более отчётливо. На растениях линии Н сильнее проявлялось преобладание активности GUS в сосудистой системе и приуроченность её к областям гидатод, что указывало на поступление цитокининов в листья по сосудистой системе с пасокой.

Сходные закономерности были получены на семядолях (рис. 2.2) (данные приведены для линии Н). Менее резко была выражена стадия усиления активности GUS на ранних этапах роста семядолей. Поскольку семядоли являются запасующим органом растения, то высокая активность GUS на начальных стадиях роста семядолей могла быть связана с присутствием в них запасных цитокининов, которые переходят в активную форму.

В целом данные, полученные на двух линиях, указывали на одинаковые закономерности: 1) увеличение активности GUS в ходе роста листа, 2) её снижение после прекращения роста листа, 3) преобладание активности GUS в проводящей системе.

Дополнительные эксперименты, проведённые на растениях, выращенных в почве, показали, что в ходе роста листьев активность GUS снижалась с возрастом значительно быстрее, чем проявлялось падение содержания хлорофилла. Таким образом, цитокинин-зависимая активность GUS в трансгенных растениях *A. thaliana* лучше характеризовала возрастные изменения листа, чем содержание хлорофилла.

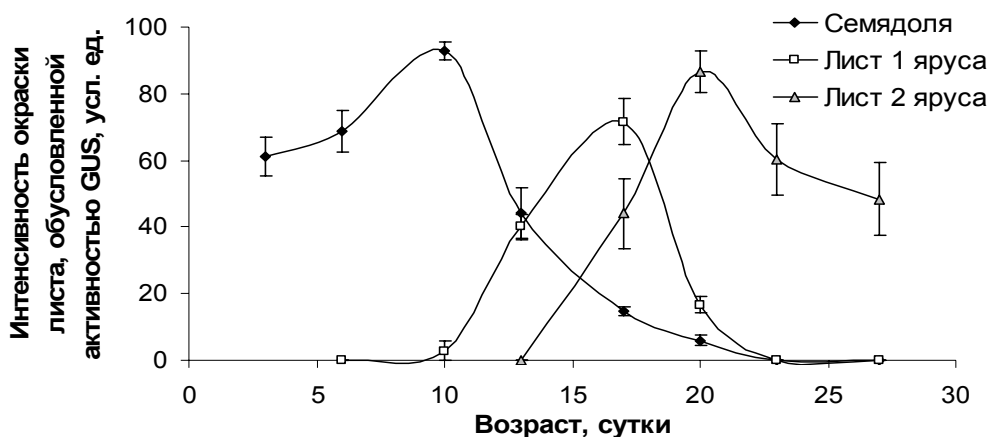


Рисунок 3. Развитие активности GUS в семядолях и розеточных листьях первого и второго ярусов растений, выращенных на среде, содержащей в качестве единственного источника азота 20 мМ нитрат калия. Линия Н.

Динамика активности GUS в семядольных листьях (рис. 2.2) и листьях первого и второго ярусов совпадала с данными для листьев первого яруса. Рис. 3 позволяет

увидеть, что снижение активности GUS, а, следовательно, и содержания активных форм цитокининов в нижерасположенных органах соответствовало по времени росту активности GUS в вышерасположенных развивающихся листьях. Это указывает на перераспределение цитокининов в растениях в пользу более молодых, растущих органов.

Период активного роста семядолей и листьев у *A. thaliana* совпадает с высоким уровнем в них физиологически активных форм цитокининов, а прекращение роста происходит на фоне резкой убыли этих фитогормонов и нарастания их содержания в вышерасположенных, активно растущих листьях. Такая динамика эндогенного содержания активных форм цитокининов в ходе роста листа показана впервые. Перераспределение накопления активных форм цитокинина в растениях от прекративших рост органов в более молодые происходит задолго до появления внешних признаков старения листа. Высокая активность GUS в проводящей системе черешка и листьев и в областях гидатод является ещё одним свидетельством в пользу поступления цитокининов в листья из корней в составе пасоки.

Влияние нитратного и аммонийного азота в питательной среде на рост и цитокинин-зависимую активность GUS в растениях *Arabidopsis*

Для того чтобы проверить, будут ли наблюдаться изменения по активности GUS в растениях в зависимости от их снабжения нитратом, растения подвергали азотному голоданию в течение недели, а затем переносили на соли азота.

Трансформанты *Arabidopsis* выращивали на среде Хогланда. Затем растения переносили на среду Хогланда без азотсодержащих солей. Для этого $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ замещали на 3 мМ KCl+1 мМ CaCl_2 на 8 дней и измеряли в них содержание нитрата и активность GUS. Затем целые растения или срезанные с них полностью развитые листья 2—3 ярусов переносили на растворы солей 5 мМ нитрата или 5 мМ аммония. Через 3 суток в листьях интактных растений и в срезанных листьях измеряли активность GUS флуоресцентным методом.

Снижение содержания нитратов в растениях сопровождалось резким падением активности GUS в листьях (рис. 4А). При переносе голодающих интактных растений на нитрат активность GUS в листьях усиливалась в течение трёх суток (рис. 4Б). Этого не происходило в срезанных листьях, что указывает на индукцию нитратом синтеза цитокининов в корнях с их последующим транспортом в листья. Аммонийная

соль практически не увеличивала активность GUS после голодания. Это говорит о том, что аммоний не индуцировал синтез цитокининов в растениях.

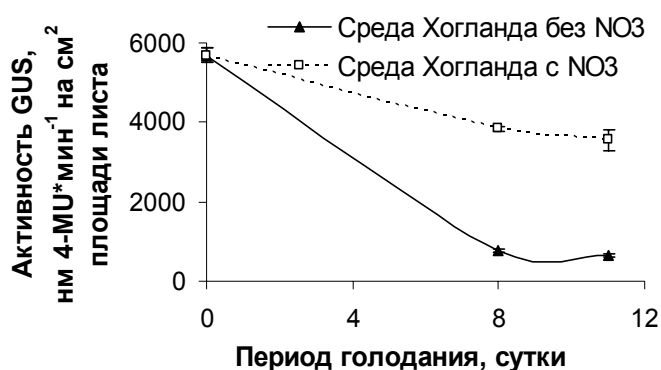
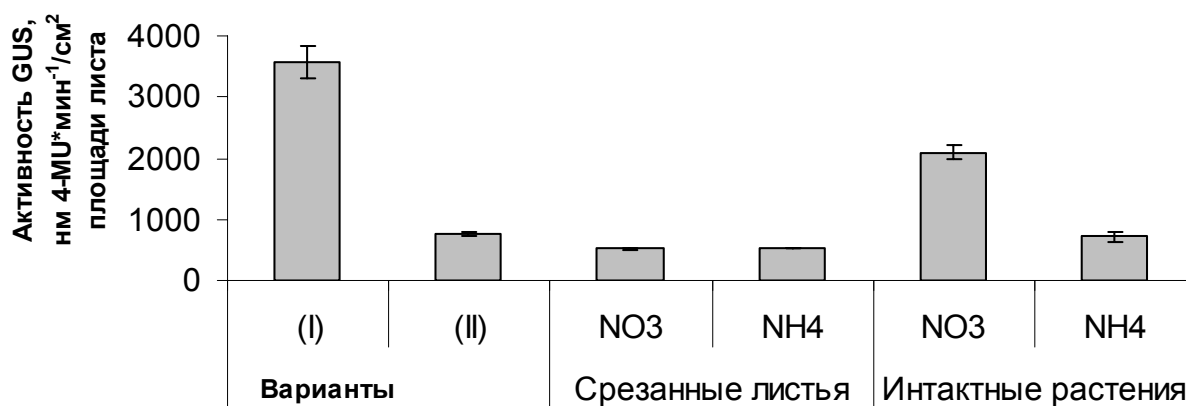


Рисунок 4А. Активность GUS при голодании по азоту растений *A. thaliana*.

Рисунок 4Б. Активность GUS при переносе голодающих по азоту растений *A. thaliana* на азотсодержащие растворы на три дня. (I) Контрольные растения (8 суток на обычной среде Хогланда и затем 3 дня на 5 мМ

А

нитрата). (II) Растения после 8-дневного голодания на среде Хогланда без нитрата. Обозначения растворов: NO₃ — 3 мМ KNO₃ + 1 мМ Ca(NO₃)₂, NH₄ — 5 мМ NH₄Cl.



Б

Чтобы проверить, как полное отсутствие нитрата влияет на содержание активных форм цитокининов в растении, мы исследовали в растениях, выращенных на аммонии, цитокинин-зависимую активность GUS.

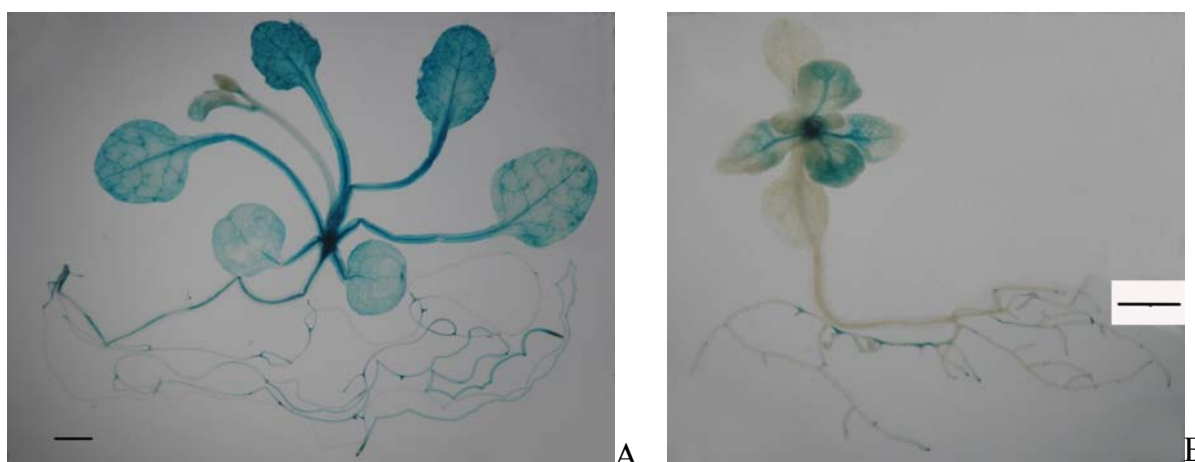


Рисунок 5. Растения, выращенные на MS1/2, содержащей в качестве единственного источника азота А) 20 мМ нитрата калия, Б) 20 мМ сульфата аммония. Бар — 1 мм. Линия В. Возраст растения: А) 20 дней, Б) 23 дня.

В наших опытах в питательную среду добавляли MES-буфер, который обеспечивал pH 5,7—6,0, наиболее часто использующийся в литературе при выращивании *Arabidopsis*. Такое значение pH не оптимально для аммонийного питания, которое нуждается в подщелачивании среды. Однако оно позволяло проводить опыты с нитратным и аммонийным питанием в одинаковых условиях.

Отсутствие нитрата и наличие аммония в питательной среде приводили к серьёзным морфологическим изменениям надземной части у обеих изученных линий: скученной розетке листьев, снижению общей площади листьев примерно в 6 раз, отсутствию выраженных черешков, нарушениям формирования сосудистой системы, преждевременной гибели растения (рис. 5Б). Однако следует помнить, что условия аммонийного питания в наших опытах могли быть не оптимальными при выбранном pH. Отличия в морфологии семядолей были менее выражены.

Активность GUS в листе первого яруса у растений, получавших аммонийный источник азота, различалась для двух исследуемых линий. В мезофилле листьев первого яруса растений линии Н активность GUS не обнаруживалась (рис. 6.1). Активность GUS наблюдалась только в черешке, центральной жилке, жилках второго порядка и её значения были ниже, чем для нитратных растений (рис. 6.Б1, В1).

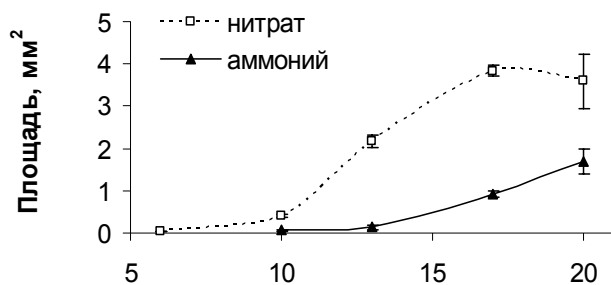
В мезофилле и сосудистой системе листьев 1 яруса растений линии В, получавших аммонийный азот, наблюдалась довольно высокая активность GUS. Это указывает на высокий уровень в них активных форм цитокининов, который может быть результатом задержки транспорта цитокининов ввиду подавления роста листьев следующих порядков. При этом была слабее выражена разница окраски сосудистой системы и мезофилла. У листьев 2 яруса растений линии В падение активности GUS наблюдалось ещё в процессе роста листа, что связано, видимо, с серьёзными нарушениями процессов роста уже на ранних этапах развития листа. В трёхнедельном возрасте растения этой линии были значительно обеднены цитокининами по сравнению с нитратными растениями того же возраста (рис. 5Б).

В семядолях растений обеих линий, выращенных на аммонийном азоте, активность GUS была довольно высока (6.Б2). Её значения могли превышать активность GUS в семядолях растений, получавших нитратный азот.

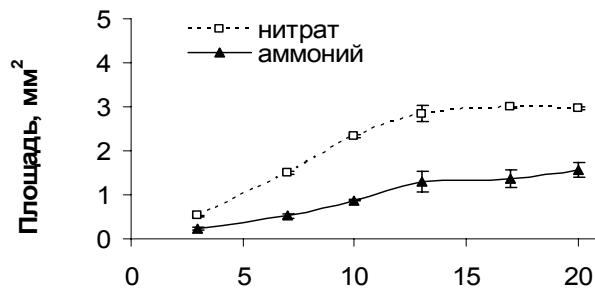
Характерной особенностью листьев и семядолей аммонийных растений было отсутствие выраженной активности GUS в областях гидатод по сравнению с другими

участками листа (рис. 6.Б2), что чётко прослеживалось у растений, получавших нитраты (рис. 6.В2). Возможно, это отражает сниженное поступление цитокининов из корней с пасокой в пластинку листа растений на аммонийном азоте.

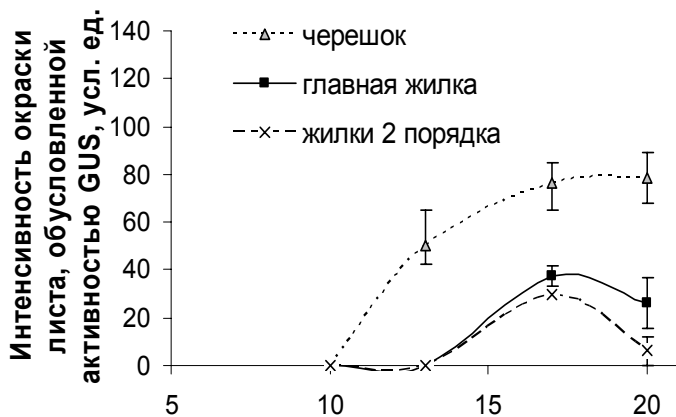
A1



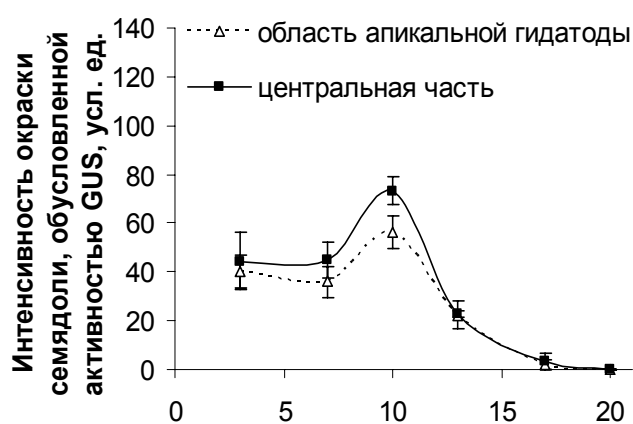
A2



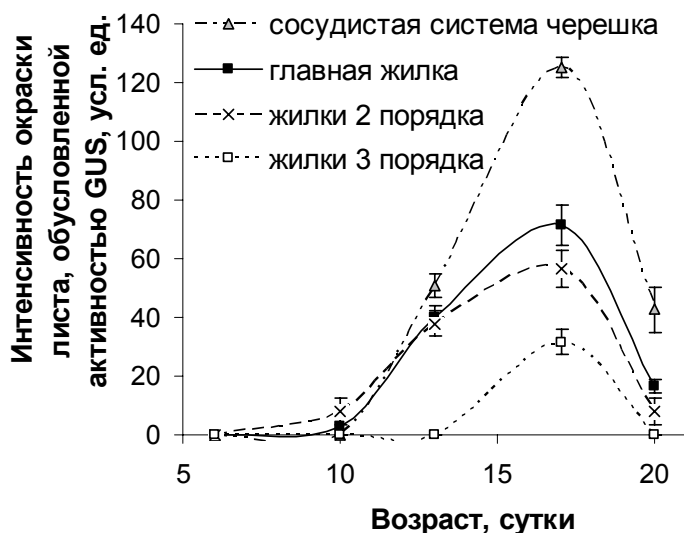
Б1, (NH₄)₂SO₄, 20 мМ



Б2, (NH₄)₂SO₄, 20 мМ



В1, KNO₃, 20 мМ



В2, KNO₃, 20 мМ

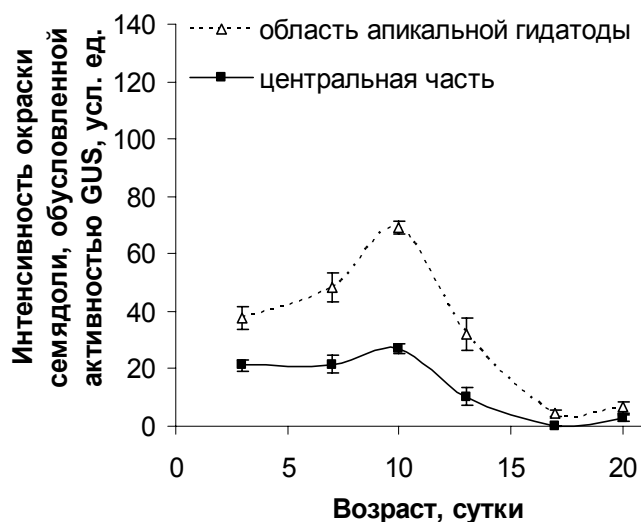


Рисунок 6. Рост и активность GUS в листьях 1 яруса (1) и семядолях (2) растения, выращенного на среде MC1/2, содержащей в качестве источника азота 20 мМ сульфата аммония. Для сравнения приведены данные для растений, выращенных на среде, содержащей в качестве источника азота 20 мМ нитрата калия. Линия Н. Площадь листьев (A1) и семядолей (A2). Активность GUS в листе 1 яруса (Б1) и семядоле (Б2) у растений, получавших 20 мМ сульфат аммония. Активность GUS в листе 1 яруса растения, выращенного на 20 мМ нитрате калия (В1) и в семядолях этих растений (В2).

В листьях аммонийных растений наблюдались частые аномалии в развитии сосудистой системы: слабое развитие жилок 3 порядка, раздвоение главной жилки, отсутствие апикальной петли, отсутствие выраженной иерархии в системе жилок.

Таким образом, уровень активных форм цитокининов, показателем которого является активность GUS, был значительно снижен в растениях, выросших на среде, содержащей аммоний в качестве единственного источника азота. Это согласуется с литературными данными о снижении содержания цитокининов в пасоке растений при недостатке нитрата (Walch-Lju et al., 2000).

Изучение роста растений и активности GUS в тканях надземных органов при снижении концентрации солей аммония в питательной среде с 20 мМ до 2 мМ, так же, как и сравнение влияния хлоридной и сульфатной солей аммония, значительных отличий в динамике роста и активности GUS не обнаружило.

Следовательно, обнаруженное в опытах угнетение роста надземных органов зависело не столько от выбранной концентрации аммония, сколько от замены им нитрата в питательной среде.

Таким образом, при элиминации солей нитрата из питательной среды, в растениях на аммонийном азоте снижается не только рост, но и экспрессия *GUS*-гена под контролем цитокинин-зависимого промотора, что говорит о снижении в них уровня активных форм цитокининов. Отсутствие активности GUS в областях гидатод указывало на снижение поступления активных форм цитокининов в листья из корней, что подтверждалось отсутствием активных форм цитокининов в мезофилле листьев линии Н. Обнаруженное на растениях линии В повышение активности GUS в мезофилле ещё ждёт своего объяснения, наиболее вероятно, что оно связано с ослаблением оттока цитокининов.

Морфологические параметры и активность GUS в корнях растений *Arabidopsis thaliana*, выращенных на средах с различными источниками азота

Были изучены активность GUS в корнях растений и их морфологические характеристики на разных источниках азотного питания. Данные приведены для растений линии В, выращенных на средах, содержащих в качестве единственного источника азота 2 мМ нитрата калия или 2 мМ сульфата (или хлорида) аммония или 20 мМ сульфата аммония.

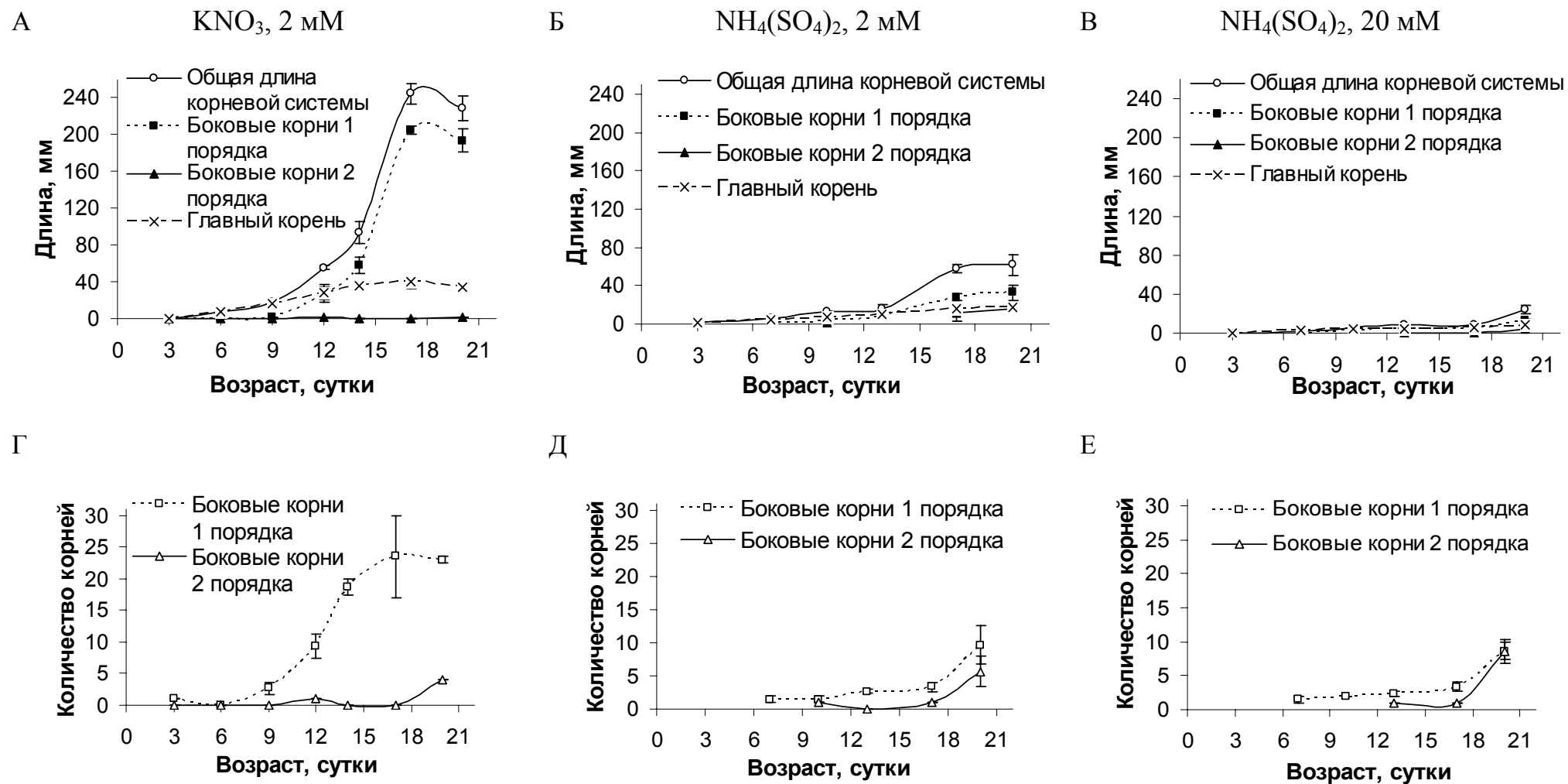


Рисунок 7. Параметры роста корневой системы растений, выращенных на среде MC1/2, содержащей в качестве единственного источника азота 2 мМ нитрата калия (А, Г), 2 мМ сульфат аммония (Б, Д), или 20 мМ сульфат аммония (В, Е). Линия В.

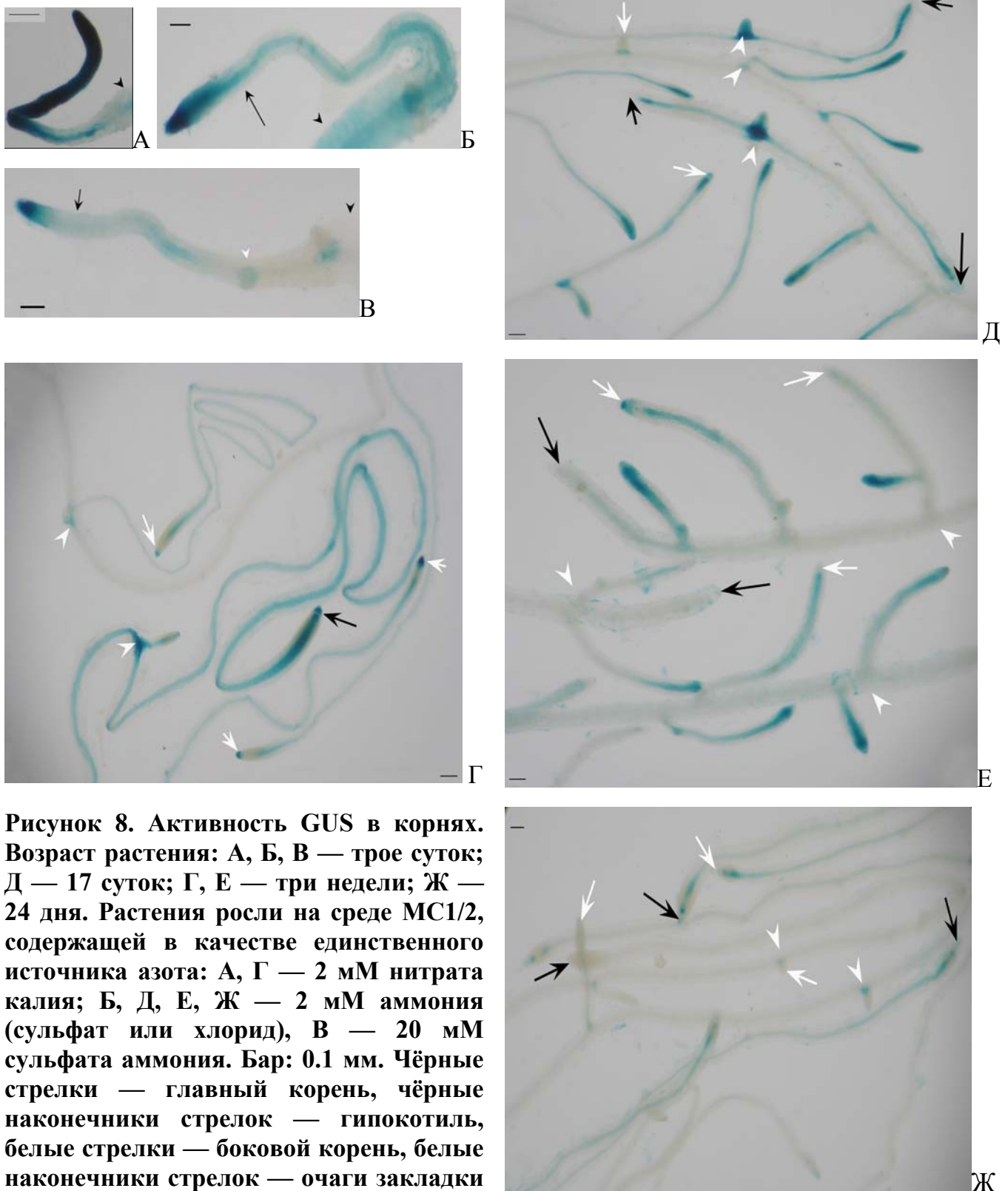


Рисунок 8. Активность GUS в корнях. Возраст растения: А, Б, В — трое суток; Д — 17 суток; Г, Е — три недели; Ж — 24 дня. Растения росли на среде МС1/2, содержащей в качестве единственного источника азота: А, Г — 2 мМ нитрата калия; Б, Д, Е, Ж — 2 мМ аммония (сульфат или хлорид), В — 20 мМ сульфата аммония. Бар: 0.1 мм. Чёрные стрелки — главный корень, чёрные наконечники стрелок — гипокотиль, белые стрелки — боковой корень, белые наконечники стрелок — очаги закладки боковых корней.

Как показывает рисунок 7, замена в питательной среде нитратного азота на аммонийный существенно снижала рост корневой системы. При этом наблюдалось значительное снижение длины корневой системы у растений, выросших на аммонии

(рис. 7Б). Ингибирование роста корней по основным изученным параметрам было особенно ярким при использовании аммония в концентрации 20 мМ (рис. 7В).

Определение активности GUS в корнях растений на нитратном и аммонийном источниках азота обнаружило серьезные различия по её проявлению. В корне проростков на питательной среде с нитратом активность GUS была высокой. Уже через три дня от начала прорастания семян на аммонийном азоте происходило существенное снижение активности GUS в кончике корня и по длине сосудистой системы корня (рис. 8А, Б, В), особенно резко это проявлялось в присутствии 20 мМ аммония (рис. 8В). У растений на среде с нитратами высокая активность GUS сохранялась в кончике корня и боковых корнях в течение всего изученного срока (3 недели) (рис. 8Г). В растениях на питательной среде с аммонием активность GUS исчезала из обычных участков её местонахождения: из меристем, корневого чехлика, общая её интенсивность в сосудистой системе снижалась и постепенно исчезала (рис. 8Д, Е, Ж). В присутствии 20 мМ аммония в питательной среде снижение активности GUS в кончике корней и по всей длине корня происходило быстрее. Это показывало, что корневая система не выполняла функции снабжения побегов цитокининами. Возможно, это являлось одной из причин ингибирования роста надземных органов растений на аммонийном источнике азота.

Влияние экзогенных цитокининов

Для проверки вопроса о том, насколько опосредуют цитокинины влияние нитрата на морфологию растения и наоборот, насколько дефицит цитокининов определяет нарушение морфологии растений на аммонийном азоте, были поставлены эксперименты, в которых в питательную среду, содержащую в качестве единственного источника азота хлорид аммония, добавляли *транс*-зеатин в концентрациях от 10^{-10} до 10^{-6} М. Основные данные были получены на растениях линии Н.

Высокие концентрации цитокининов (10^{-6} М) оказывали негативное влияние на морфологию растения. Полностью отсутствовал корень, нарушалась форма семядолей, настоящие листья у растения практически не развивались. Активность GUS была высокой в семядолях, в основании гипокотыля и полностью отсутствовала в семядольном узле. Растения, выросшие на среде, содержащей *транс*-зеатин в

концентрации 10^{-10} М, практически не отличались от контрольных растений, выросших на среде без цитокининов.

На среде, содержащей цитокинины в концентрациях 10^{-8} и 10^{-9} М, у большинства растений развитие надземной части было более близким к развитию растений, выращенных на нитрате: увеличивалась площадь листьев, приближаясь по размеру к листьям растений, выращенных на нитрате (рис. 9А). Листья имели отчётливые черешки, однако длина черешков при этом была промежуточной — выше, чем у аммонийных растений, однако ниже, чем у растений, выращенных на нитрате (рис. 9Б).

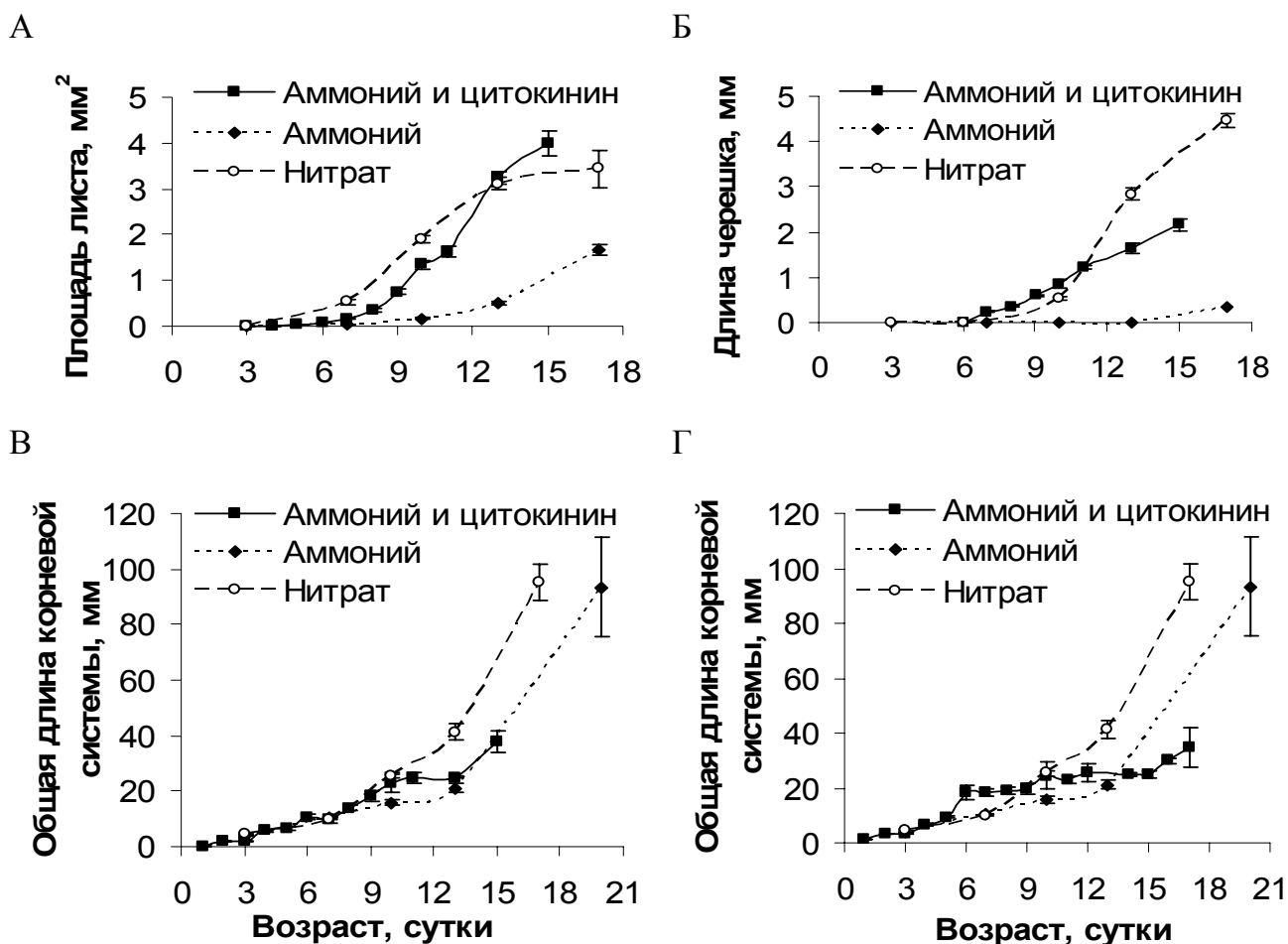


Рисунок 9. Морфологические параметры растений, выращенных на МС1/2, содержащей в качестве источника азота 2 мМ хлорида аммония с добавлением *транс*-зеатина. Линия Н. Для сравнения приведены данные для растений, выращенных на среде, содержащей в качестве единственного источника азота 2 мМ нитрата калия или 2 мМ хлорида аммония. А. Площадь листа 1 яруса. Б. Длина листа 1 яруса. В, Г. Общая длина корневой системы. Концентрации *транс*-зеатина: А, Б, В — 10^{-9} М, Г — 10^{-8} М.

Торможение роста корневой системы и ингибирование закладки боковых корней характерно для действия экзогенного цитокинина (Li et al., 2006; Debi et al., 2005), ярче оно проявлялось при концентрации цитокинина 10^{-8} М (рис. 9Г). При этом

корни растений, выращенные на среде, содержащей 10^{-9} М *транс*-зеатина, не показали значительных отклонений по длине от корней растений, выращенных на 2 мМ аммонии (рис. 9В).

Активность GUS в листьях растений линии Н, выращенных на 10^{-8} и 10^{-9} М цитокинина, проявлялась так же, как и в растениях, выращенных на нитрате: была высокой в черешках и наблюдалась в областях гидатод (рис. 10).



Рисунок 10. Растение, выращенное на MS1/2, содержащей в качестве источника азота 2 мМ хлорида аммония с добавлением 10^{-9} М *транс*-зеатина. Бар — 1 мм. Линия Н. Возраст растения: 16 дней.

Таким образом, экзогенные цитокинины в концентрации 10^{-8} — 10^{-9} М стимулировали развитие побега и до некоторой степени могли заменить недостаток нитрата в среде.

ВЫВОДЫ

На растениях *Arabidopsis thaliana*, трансформированных маркерным *GUS*-геном под контролем цитокинин-зависимого промотора *ARR5*-гена, проведено сравнительное изучение роста и активности GUS, отражающей уровень активных форм цитокининов в тканях, и получены следующие закономерности.

1. С помощью анализа экспрессии *GUS*-гена впервые установлена динамика уровня активных форм цитокининов в онтогенезе листа *Arabidopsis thaliana*, показано их накопление в ходе роста листа и падение после его остановки.
2. Показана локализация активных форм цитокининов в тканях листа с преобладанием в проводящей системе и гидатодах, что указывает на поступление цитокининов в листья из корневой системы.
3. Анализ активности GUS в ходе развития растений *Arabidopsis thaliana* показал смещение накопления активных форм цитокининов из нижних, закончивших рост листьев в верхние растущие листья, что указывает на их перераспределение в онтогенезе растений.

4. Анализ активности GUS в трансформантах, выращенных на нитратном или аммонийном источниках азота, выявил следующие закономерности их влияния на уровень цитокининов в растении:
- а) Уровень активных форм цитокининов был выше у растений на нитратном азоте, что соответствовало более активному их росту и развитию по сравнению с растениями на аммонийном азоте.
 - б) Голодание растений по нитратам вызывало резкое снижение уровня активных форм цитокининов в листьях, который восстанавливался после предоставления растениям нитратного, но не аммонийного азота.
 - в) Аммонийное питание в отсутствие нитратов угнетало в наших условиях рост растений, приводило к нарушениям развития в листьях сосудистой системы, снижало уровень активных форм цитокининов в растении и изменяло их локализацию в тканях листа.
 - г) В ходе роста растений на аммонийной среде происходило снижение уровня цитокинина в корнях: исчезновение активности GUS в меристемах, корневом чехлике и сосудистой системе, что свидетельствует о подавлении в корнях метаболических процессов, связанных с синтезом цитокининов.
5. Добавление *транс*-зеатина в питательную среду, содержащую в качестве единственного источника азота соли аммония, в значительной степени исправляло вызванные им нарушения роста в надземных органах растений.

Список работ по материалам диссертации

1. Штратникова В.Ю., Кулаева О.Н. (2007) Влияние форм азотного питания на GUS-реакцию растений *Arabidopsis thaliana*, трансформированных GUS-геном под контролем цитокинин-зависимого промотора гена *ARR5*. В сб. тезисов: *Современная физиология растений: от молекул до экосистем. Часть 1*. Сыктывкар, с. 397—398.
2. Кудрякова Н.В., Кузнецов В.В., Штратникова В.Ю., Кулаева О.Н. (2007) Факторы индукции старения в регуляции экспрессии *P_{ARR5}-GUS* гена у *Arabidopsis thaliana*. В сб. тезисов: *Современная физиология растений: от молекул до экосистем. Часть 1*. Сыктывкар, с. 192—193.
3. Штратникова В.Ю., Кулаева О.Н. (2007) Влияние форм азотного питания на GUS-реакцию *Arabidopsis thaliana*, трансгенного по гену *ARR5::GUS*. В сб.

- тезисов: *Физиология трансгенного растения и проблемы биобезопасности*. М., с. 89—90.
4. **Штратникова В.Ю.** (2008) Влияние форм азотного питания на рост и GUS-активность растений *Arabidopsis thaliana*, трансформированных конструкцией *pARR5::GUS*. В сб. тезисов: *Ломоносов-2008. Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных; секция «Биология»*. М., МАКС Пресс, с. 200—201.
 5. **Штратникова В.Ю.** (2008) Цитокинин-зависимая экспрессия гена *pARR5::GUS* при развитии растений *Arabidopsis thaliana* в зависимости от форм азотного питания. В сб. тезисов: *Студент и научно-технический прогресс*. Новосибирск, с. 43—44.
 6. **Shtratnikova V.Y., Kulaeva O.N.** (2008) Effects of types of nitrogen nutrition on growth and GUS-activity in *Arabidopsis thaliana* plants transformed with *pARR5::GUS* construct. In: *Abstracts of XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB)*, Tampere, Finland. *Physiologia Plantarum*, **133**, P01-67.
 7. **Kudryakova N.V., Kusnetsov V.V., Shtratnikova V.Y., Kulaeva O.N.** (2008) Effects of cytokinin and senescence-inducing factors on expression of *P_{ARR5}-GUS* gene construct during leaf senescence in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Growth Regul.*, **56**, 21—30.
 8. **Штратникова В. Ю., Кулаева О. Н.** (2008) Цитокинин-зависимая экспрессия *ARR5::GUS*-конструкции в ходе роста трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*. *Физиология растений*, **55**, 842—850.
 9. **Кудрякова Н.В., Штратникова В.Ю., Кулаева О.Н.** (2008) Экспрессия *pARR5::GUS* в срезанных листьях растений *Arabidopsis thaliana* и её индукция нитратами. В сб. тезисов *Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений*. Екатеринбург, с. 231—232.