

УДК 581.14:577.175.152:631.811.1./2.

## СВЯЗЬ УДЛИНЕНИЯ КОРНЯ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ С АБК-ЗАВИСИМЫМ ТРАНСПОРТОМ ЦИТОКИНИНОВ ИЗ КОРНЕЙ В ПОБЕГИ ПРИ СВЕРХОПТИМАЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ НИТРАТОВ И ФОСФАТОВ<sup>1</sup>

© 2022 г. Л. Н. Тимергалина<sup>1,\*</sup>, Л. Б. Высоцкая<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Уфимский институт биологии УФИЦ РАН  
450054, Уфа, просп. Октября, 69, Россия

\*E-mail: leinaz@mail.ru

Поступила в редакцию 22.12.2021 г.

После доработки 28.02.2022 г.

Принята к публикации 15.03.2022 г.

Известно, что регуляция удлинения корней важна для усвоения растениями минеральных питательных веществ, а фитогормоны цитокинины и абсцизовая кислота (АБК) и их взаимовлияние важны для контроля удлинения корней при изменении доступности ионов. Однако их роль в регуляции ростовой реакции на сверхоптимальные концентрации нитратов и фосфатов изучена недостаточно и является предметом изучения в настоящем исследовании. Влияние сверхоптимальных концентраций нитрат- и фосфат-ионов на удлинение корней и распределение цитокининов между корнями и побегами были изучены у мутанта ячменя Az34 с дефицитом АБК и его родительского сорта Steptoe. Концентрацию цитокининов в клетках растущих кончиков корней анализировали иммуногистохимическим методом. Сверхоптимальные концентрации нитратов и фосфатов привели к накоплению АБК и цитокининов в кончиках корней, что сопровождалось снижением содержания цитокининов в побегах и ингибированием роста корней растений сорта Steptoe. У мутанта Az34 не был обнаружен ни один из этих эффектов, что свидетельствовало о важности способности растений аккумулировать АБК для контроля этих реакций. Поскольку известно, что цитокинины ингибируют удлинение корней, влияние сверхоптимальных концентраций нитратов и фосфатов на рост корней, вероятно, связано с накоплением цитокининов, вызванным АБК-индуцированным ингибированием транспорта цитокининов от корней к побегам.

*Ключевые слова:* ячмень *Hordeum vulgare* L., мутант ячменя Az34, абсцизовая кислота (АБК), цитокинины, минеральное питание, удлинение корней.

DOI: 10.31857/S0002188122060114

### ВВЕДЕНИЕ

Растения ведут прикрепленный образ жизни. Ограниченность места их произрастания компенсируется способностью корневой системы к быстрому росту, что очень важно для оптимизации усвоения питательных веществ. Нитраты являются преобладающей формой азота, обладают высокой подвижностью и поэтому часто выщелачиваются в нижние слои почвы. В этих условиях эффективное их усвоение зависит от быстрого удлинения корней, увеличивающего глубину укоренения [1, 2]. Однако быстрое удлинение корней не всегда выгодно, поскольку находящиеся в поверхностных слоях почвы корни позволяют полу-

чать ресурсы верхнего почвенного слоя, состоящие из немобильных фосфатов. В этом случае более выгодной стратегией становится замедление роста корней в толще почвы. Таким образом, адекватные изменения удлинения корней важны для адаптации растений к изменяющейся корневой среде, и важно понимать, как растения ощущают концентрацию ионов в почве, и как эти сигналы преобразуются в изменения длины корней.

Доступность минеральных питательных веществ влияет на концентрацию гормонов в растениях. В свою очередь гормоны растений регулируют многочисленные процессы, включая рост и развитие. Поэтому считается, что гормоны действуют как посредники в реакциях растений на доступность питательных веществ. Цитокинины

<sup>1</sup> Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-04-00305.

(ЦК) при этом играют особую роль как часть нитратной сигнальной системы [3, 4]. Было показано, что дефицит нитратов снижает экспрессию генов изопентенилтрансферазы (ИПТ) [5], ответственной за синтез ЦК [6], и наоборот – добавление N в среду, содержащую недостаточно N, приводило к усилению регуляции этих генов [7]. Эти реакции зависели от функции нитратных сенсоров (NRT1), называемых трансцепторами из-за их двойной функции: в качестве переносчика N и рецепторов [8]. Этот вывод был основан на экспериментах с мутантами, характеризующимися нарушением функции NRT1 и отсутствием изменений либо в экспрессии генов ИПТ [9], либо в содержании корневых ЦК [10] в условиях дефицита N.

Дефицит не только N, но также и фосфатов (P) влиял на экспрессию генов ИПТ [11] и содержание ЦК в растениях [12], вовлекая эти гормоны в реакцию растений на дефицит P. При этом основное внимание было уделено транспорту ЦК от корней к побегам, который действует как сигнал на большие расстояния и контролирует функцию побега в ответ на доступность питательных веществ [13]. Участие гормонов в ростовых реакциях корней привлекало меньше внимания. Тем не менее, снижение уровня корневых ЦК в P- и N-голодающих растениях сопровождалось ускорением роста корней [11, 12, 14]. Поскольку ЦК могут ингибировать удлинение корней [15], снижение их содержания рассматривалось как причина ускоренного роста корней в ответ на дефицит минеральных питательных веществ [16]. Это предположение было подкреплено отсутствием реакции роста корней у мутанта *nrt1-1*, у которого N-голодание не изменило содержание ЦК в корнях [10].

Действие дефицита питательных веществ на содержание гормонов и рост корней изучено хорошо, в отличие от долгосрочных эффектов сверхоптимальной концентрации минеральных питательных веществ. В одном из немногих сообщений было показано накопление ЦК в части корней, подвергнутых воздействию высоких концентраций минеральных питательных веществ, имитирующих локальное внесение удобрений, что сопровождалось ингибированием удлинения корней [14]. Однако механизм этого эффекта оставался неясным.

Абсцизовая кислота (АБК) принимает участие в регуляции реакций доступности минеральных питательных веществ наряду с ЦК. Эксперименты с растениями пшеницы, обработанными флуридоном (ингибитором синтеза АБК), и растениями ячменя с дефицитом АБК показали, что из-

менения концентрации ЦК в ответ на нехватку минеральных питательных веществ зависели от способности растений накапливать АБК [11, 16]. Однако взаимодействие АБК и ЦК в ответ на длительное действие сверхоптимальных концентраций минеральных питательных веществ не изучали.

Высокие концентрации N увеличивали содержание АБК в кончиках корней, что было связано с наблюдаемыми изменениями в росте корней [17]. Тем не менее, нелегко связать величину содержания АБК с изменениями в росте корней из-за несоответствия между результатами, полученными в экспериментах с экзогенной АБК, и экспериментами, связывающими реакцию роста корней с изменениями концентрации эндогенной АБК. Обработка АБК в основном ингибирует удлинение корней [18], в то время как при некоторых условиях накопление эндогенной АБК сопровождалось ускорением роста корней [19, 20]. Это можно объяснить, если принять во внимание взаимодействие АБК с другими гормонами. Однако это делали довольно редко – эксперименты с экзогенной АБК не позволяют строго контролировать накопление и распределение этого гормона в растениях. Использование мутантов с дефицитом АБК позволяет получить представление о механизмах ее действия. Этот подход был успешно использован в случае трансгенного арабидопсиса с дефицитом ЦК. Фенотипирование этих растений подтвердило способность ЦК стимулировать рост побегов и подавлять рост корней растений [15]. Предыдущие эксперименты с АБК-дефицитными растениями ячменя показали зависимость метаболизма ЦК и роста корней от способности P-дефицитных растений накапливать АБК [11]. Цель работы – проверка гипотезы о том, что АБК участвует в контроле роста корней и распределении ЦК между корнями и побегами, выращенными при сверхоптимальной концентрации минеральных питательных веществ. Это было достигнуто путем сравнения роста и содержания ЦК в растениях ячменя с дефицитом АБК и их родительского сорта, подвергнутых воздействию высокой (300%) концентрации раствора Хогланда–Арнона (Х–А). Использовали повышенную концентрацию всех компонентов раствора Х–А, а не отдельных ионов для того, чтобы не нарушать баланс между минеральными питательными веществами, от которого зависит их усвоение растениями [21].

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

*Условия выращивания растений.* Семена ячменя *Hordeum vulgare* L. (АБК-дефицитного мутанта

Az34 и его дикого типа сорта Steptoe) стерилизовали в 2%-ном растворе NaClO в течение 10 мин, промывали 1 ч проточной водопроводной водой, раскладывали в один слой на смоченной дистиллированной водой фильтровальной бумаге в контейнере, покрывали его алюминиевой фольгой и помещали на 1 сут для стратификации семян в холодильник при температуре 4°C. Затем контейнер оставался при комнатной температуре еще 1 сут, после чего проростки помещали на плотки из запаянных и связанных вместе стеклянных трубочек на водопроводной воде (200 семян/2 л воды), при освещении 340 мкмоль/с/м<sup>2</sup>, световой период – 14 ч. В возрасте 4 сут проростки переносили на 10%- и 300%-ную питательную среду X–A. Был выбран 10%-ный раствор, т.к. результаты предыдущих экспериментов показали, что он был оптимальным для роста растений этого возраста [20]. Через 2 сут после переноса на питательные среды X–A растения в возрасте 6 сут были взяты для анализа гормонов и транспирации. Ростовые показатели измеряли у 8-суточных растений.

*Обработка карбонилцианид-м-хлорфенилгидразом.* Для ингибирования вторичного активного трансмембранного транспорта [22] карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон (КЦХГ) добавляли в питательный раствор 6-суточных растений для получения концентрации 10 мкМ. Корни и побеги отбирали для анализа гормонов через 1 ч после начала обработки КЦХГ.

*Сбор ксилемного сока.* Для сбора ксилемного сока побеги ячменя отрезали под водой и соединяли побеги с корнями тонкими силиконовыми трубками [16]. Сравнение скорости транспирации интактных и соединенных после разрезания трубками растений показало, что эта процедура не оказывала существенного влияния на транспирацию в течение 10 мин. После 10 мин сбора корневого экссудата трубки отсоединяли и перенесенный в пробирки корневого экссудат взвешивали, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C для очистки, разделения на ТСХ и определения концентрации ЦК с помощью иммуноанализа (ИФА). Доставку ЦК из корней в побег рассчитывали путем умножения измеренной концентрации ЦК на скорость транспирации.

*Определение скорости транспирации.* Транспирацию определяли гравиметрическим методом. Для этого растения помещали в пластиковые стаканы (по 10 растений в стакан), накрывали фольгой, чтобы предотвратить испарение с поверхности раствора, и взвешивали каждые 15 мин. По разнице в весе стакана рассчитывали количество

воды, потраченное на транспирацию (мг воды/растение/ч).

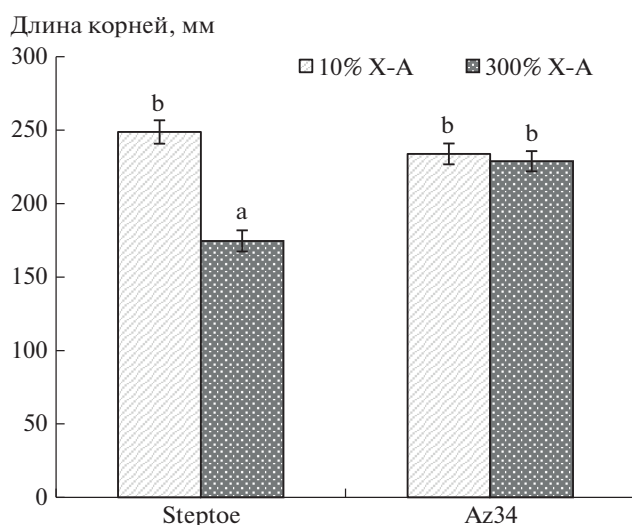
*Экстракция и очистка гормонов.* Гормоны экстрагировали из гомогенизированных тканей побегов и корней растений ячменя 80%-ным этанолом в течение ночи при 4°C. ЦК и АБК экстрагировали различными способами из аликвот водного остатка как описано в работе [11]. ЦК концентрировали на колонке C18 (Waters, Милфорд, США), промывали водой и элюировали 5 мл 80%-ного этанола, который упаривали досуха. Осадок растворяли в 20 мкл этанола и наносили на покрытые силуфолом 60 (F-254 толщиной 0.25 мм) пластины размером 5 × 20 см (Merck, Дармштадт, Германия). Разделение оснований ЦК и их производных проводили в системе растворителей: бутанол : аммиак : вода = 6 : 1 : 2. Эта процедура позволила выделить и проанализировать нуклеотид зеатина (ZN, Rf 0–0.1), рибозид зеатина (ZR, Rf 0.4–0.5), зеатин (Z, Rf 0.6–0.7) [23]. Затем элюаты из зон, соответствующих положению стандартов ЦК, подвергали ИФА.

АБК экстрагировали диэтиловым эфиром из водного остатка после его разбавления дистиллированной водой и подкисления до pH 2.5 раствором 1 н. HCl. Затем гормоны переносили из органической фазы в раствор NaHCO<sub>3</sub>, повторно экстрагировали из подкисленной водной фазы диэтиловым эфиром, метилировали диазометаном и подвергали ИФА [20]. Уменьшение количества экстрагента на каждой стадии и повторная экстракция повышали селективность извлечения гормонов [24].

*Иммуноанализ.* ИФА зеатина, его рибозида и нуклеотида из растительных тканей и сока ксилемы проводили с использованием сыворотки, полученной против рибозида зеатина (ZR), которая, как было показано, обладает высокой специфичностью к производным зеатина [22]. Перекрестная реактивность сыворотки против ZR к производным других оснований ЦК (дигидрозеатина и изопентениладенина) низкая. Достоверность метода была подтверждена результатами физико-химического анализа [22].

Для ИФА АБК использовали соответствующие антитела. Перекрестная реактивность антител к АБК, фазеевой кислоте и ксантоксину составила 100, 0.1 и 0.001% соответственно.

ИФА проводили по протоколу, в котором конъюгат ZR или АБК с овальбумином абсорбируется на твердую фазу (лунки микропланшета). В каждую лунку добавляли стандарт или образец, а также специфическую сыворотку и инкубировали. Несвязанные кроличьи антитела смывали,



**Рис. 1.** Суммарная длина корней 8-суточных растений ячменя сорта Steptoe и мутанта Az34, выращенных в 10%- и 300%-ном растворе X–А. Представлены средние  $\pm$  SE. Статистически разные средние ( $n = 20$ ) обозначены разными буквами ( $P < 0.05$ , ANOVA, тест Дункана). То же на рис. 2–6.

и козий анти-кроличий IgG, конъюгированный с пероксидазой, инкубировали с адсорбированным комплексом антиген–антитело. Все лунки снова промывали и добавляли раствор субстрата, содержащий *o*-фенилендиамин. Цветовую реакцию количественно измеряли на микрофотометре при длине волны 492 нм.

**Иммунолокализация ЦК в кончиках корней.** Для иммунолокализации ЦК конъюгировали с белками цитоплазмы, чтобы предотвратить их вымывание в процессе обезвоживания. В частности, свободные ЦК основания в тканях кончиков корней длиной 5 мм фиксировали в смеси 4% параформальдегида (Ридель–Деен, Зельце, Германия) и 0.1% глутарового альдегида (Sigma, Штайнхайм, Германия), как описано в [22]. После промывания 0.1 М фосфатным буфером (ФБ) ткани обезвоживали в серии разведений этанола. После этого ткани были погружены в метакрилатную смолу JB-4 (Electron Microscopy Sciences, Хатфилд, Пенсильвания, США). Иммунолокализацию гормонов проводили с использованием сыворотки против ZR. Гистологические срезы толщиной 1.5 мкм были получены с помощью ротационного микротомы (HM 325, MICROM Laborgerate, Германия). После нанесения блокирующего раствора (0.1 М ФБ, содержащего 0.2% желатина и 0.05% Твина-20) в течение 30 мин корневые срезы инкубировали с разбавленной кроличьей сывороткой против ZR (разведение 1 : 80) в течение ночи при 4°C. За-

тем слайды трижды промывали в 0.1 М ФБ с 0.05% Tween-20 и наносили вторичные антитела IgG против кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 555 (Invitrogen, Рокфорд, США), в течение 3 ч при 37°C. Затем срезы снова 5 раз промывали ФБ, покрывали и затем визуализировали с помощью конфокальной микроскопии с помощью FV3000 Fluoview (FV31-HSD) (Токио, Олимп, Япония). Флуоресценцию снимали при длине волны возбуждающего лазера 561 нм и эмиссии 568 нм. Ранее специфичность и надежность использования антител при иммуногистохимической локализации гормонов были подтверждены в экспериментах с обработкой растений экзогенными гормонами [24] или с использованием трансгенных растений с индуцированной экспрессией гена *ipt*, контролирующего синтез ЦК [25] (положительный контроль). В качестве контроля использовали неиммунную кроличью сыворотку, и отсутствие иммунного окрашивания при замене сыворотки против ZR на неиммунную сыворотку подтвердило надежность метода. Среднюю интенсивность флуоресценции изображений, полученных с помощью конфокального микроскопа, оценивали с помощью программного обеспечения ImageJ (Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэриленд, США <https://imagej.nih.gov/ij>). Флуоресценцию выражали в произвольных единицах, при этом максимальную окрашивающую флуоресценцию принимали за 100%, минимальную – за 0%.

**Статистический анализ.** Данные были обработаны с использованием программного обеспечения Statistica версии 10 (Statsoft, Москва, Россия). На рисунках и таблицах данные представлены в виде среднего со стандартной ошибкой (SE). Значимость различий оценивали с помощью ANOVA с последующим тестом Дункана ( $p < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Количество первичных корней было одинаковым у растений ячменя обоих генотипов (7–9 шт./растение) и не зависело от концентрации минеральных питательных веществ в растворе. Однако корни растений сорта Steptoe, выращенных на 300%-ном растворе X–А, были короче, чем у растений того же генотипа, выращенных на 10%-ном растворе (рис. 1). Между тем, не было никакой существенной разницы в длине корней растений Az34, выращенных на растворах с различной концентрацией минеральных питательных веществ.

Концентрация ЦК (выраженная в нг/г сырой массы) (рис. 2) и их содержание, рассчитанное на

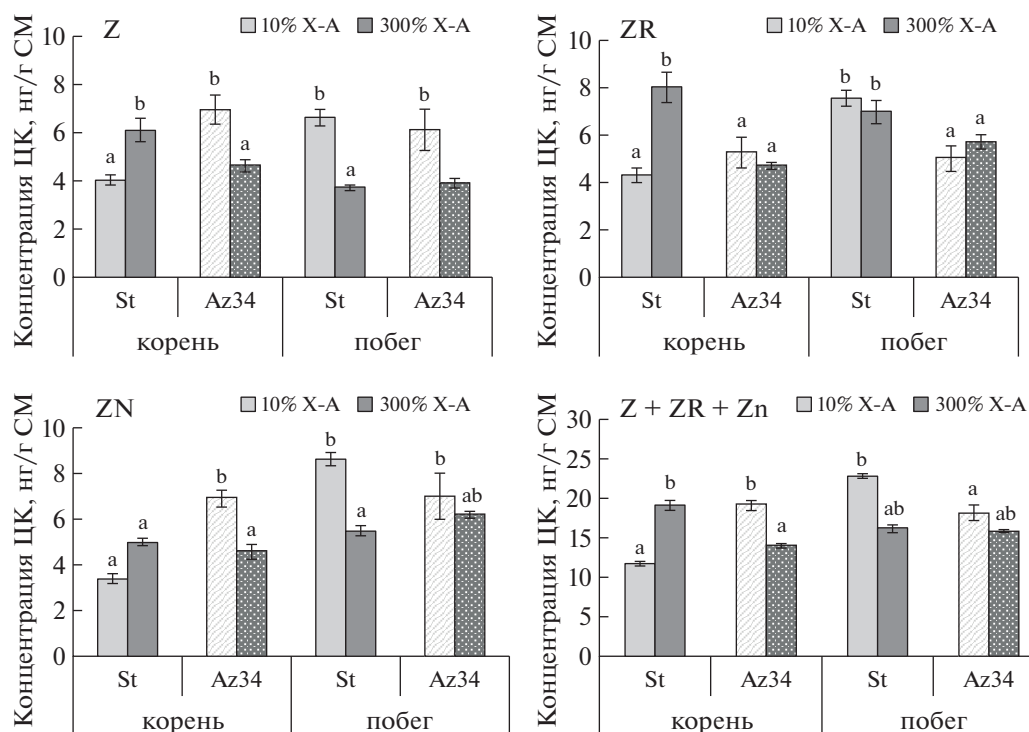


Рис. 2. Концентрация (нг/г сырой массы (СМ)) Z, ZR, ZN в корнях и побегах 6-суточных растений ячменя дикого типа (St) и мутанта Az34, выращенных в 10%- и 300%-ном растворе X–A,  $n = 9$ .

орган (табл. 1) в корнях растений сорта Steptoe на 300%-ном X–A были больше, чем на 10%-ном X–A. Концентрация Z и ZR также была больше в корнях растений, получавших 300%-ный раствор X–A, по сравнению с 10%-ным раствором X–A, наибольшее увеличение обнаружено в форме ZR. Противоположная картина была обнаружена в побегах растений сорта Steptoe, где концентрация ЦК была больше при более низкой концентрации питательных веществ (рис. 2). В отличие от сорта Steptoe, у растений Az34 на 300%-ном X–A уровень гормона не увеличивался в корнях и не снижался в побегах. Количество Z и ZN было даже снижено при высокой концентрации питательных веществ.

У растений сорта Steptoe при сверхоптимальной концентрации минеральных питательных веществ соотношение содержания ЦК в корне к содержанию ЦК в побеге увеличивалось примерно в 1.5 раза (с 0.18 до 0.28), в то время как для Az34 была выявлена противоположная закономерность.

Обработка растений сорта Steptoe протонофром карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразоном (КЦХГ) предотвращала накопление цитокинина в корнях растений, выращенных в 300%-ном растворе X–A (рис. 3).

Измерение концентрации ЦК в ксилемном соке показало в 1.6 раза более низкий уровень ZR в растениях сорта Steptoe, выращенных на 300%-ном растворе X–A по сравнению с 10%-ным раствором X–A (рис. 4).

По данным проведенных ранее экспериментов, процедура отбора проб ксилемного экссудата

Таблица 1. Содержание цитокининов (нг/орган) в побегах и корнях растений ячменя

Генотип	Среда	Z	ZR	ZN	Z + ZR + ZN
Корни					
St	10% X–A	0.26 <sup>a</sup>	0.28 <sup>a</sup>	0.22 <sup>a</sup>	0.77 <sup>a</sup>
	300% X–A	0.34 <sup>b</sup>	0.46 <sup>b</sup>	0.29 <sup>b</sup>	1.10 <sup>b</sup>
Az34	10% X–A	0.31 <sup>b</sup>	0.23 <sup>a</sup>	0.31 <sup>b</sup>	0.85 <sup>ab</sup>
	300% X–A	0.22 <sup>a</sup>	0.22 <sup>a</sup>	0.22 <sup>a</sup>	0.65 <sup>a</sup>
Побеги					
St	10% X–A	1.26 <sup>b</sup>	1.44 <sup>b</sup>	1.65 <sup>b</sup>	4.35 <sup>a</sup>
	300% X–A	0.88 <sup>a</sup>	1.65 <sup>b</sup>	1.30 <sup>ab</sup>	3.82 <sup>b</sup>
Az34	10% X–A	1.00 <sup>ab</sup>	0.82 <sup>a</sup>	1.15 <sup>a</sup>	3.00 <sup>a</sup>
	300% X–A	0.81 <sup>a</sup>	1.19 <sup>ab</sup>	1.29 <sup>ab</sup>	3.29 <sup>a</sup>

Примечание. Статистически разные средние показатели для каждого метаболита цитокинина ( $n = 9$ ) обозначены разными буквами ( $P < 0.05$ , ANOVA, тест Дункана). То же в табл. 2.

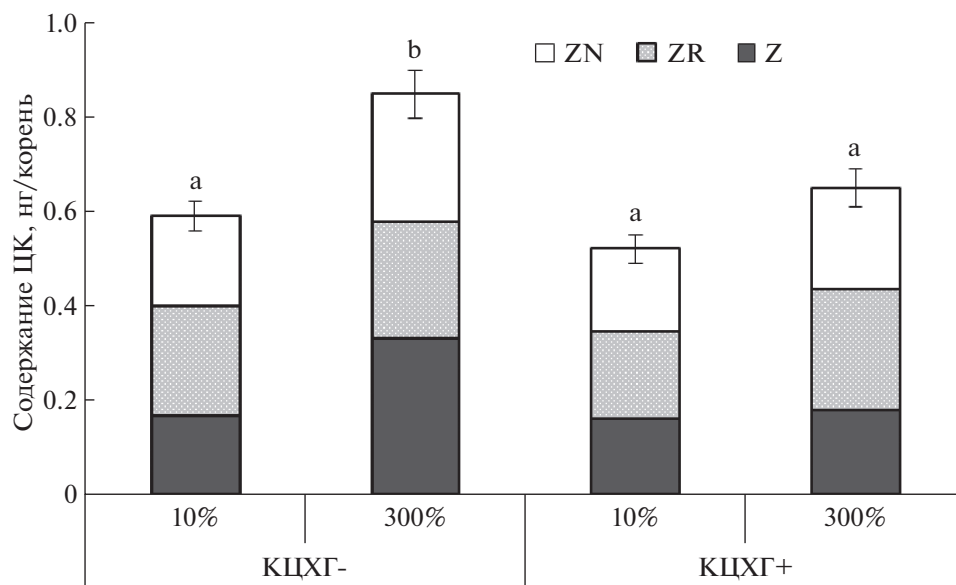


Рис. 3. Суммарное содержание ЦК (Z, ZR и ZN, нг/орган) в корнях 6-суточных растений ячменя сорта Steptoe, выращенных в 10%- и 300%-ном растворе X–A через 1 ч после обработки КЦХГ, n = 9.

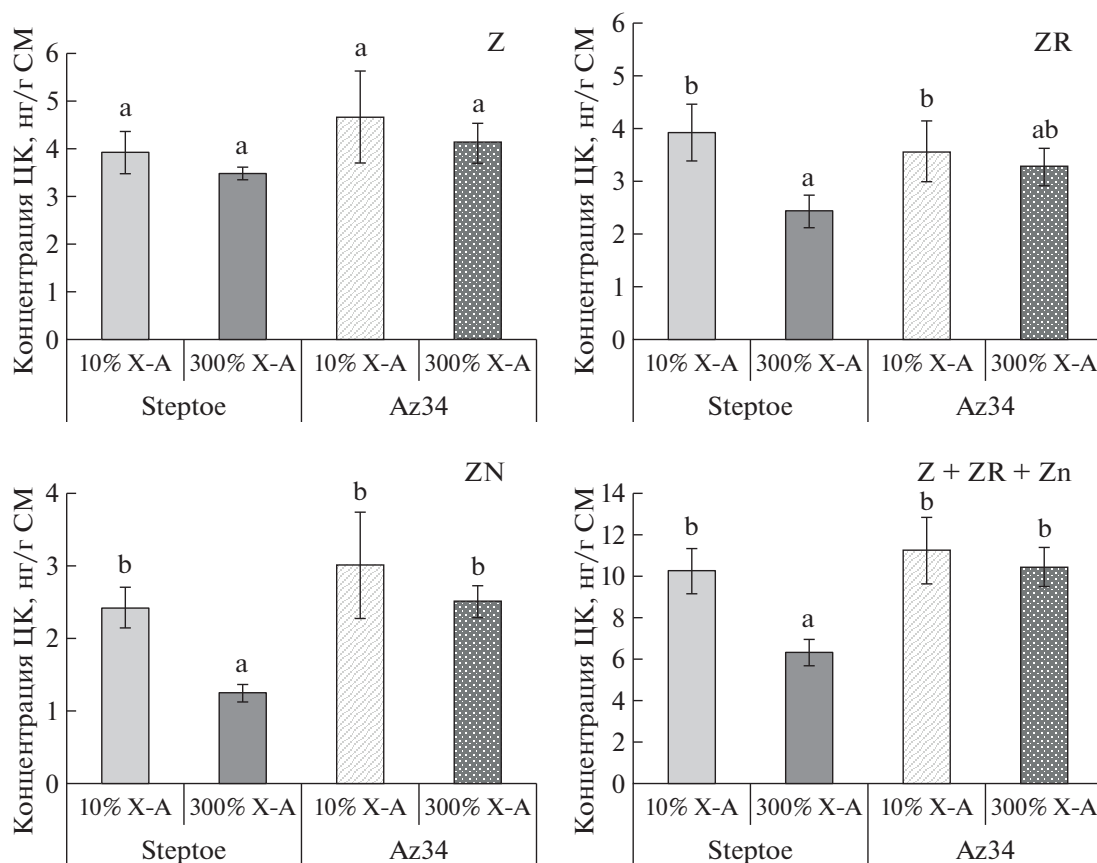


Рис. 4. Концентрация (нг/г сырого массы (СМ)) Z, ZR, ZN в ксилемном эксудате 6-суточных растений ячменя сорта Steptoe и мутанта Az34, выращенных в 10%- и 300%-ном растворе X–A, n = 9.

**Таблица 2.** Транспирация и доставка ЦК из корней в побеги у 6-суточных растений ячменя сорта Steptoe (St) и его мутанта (Az34), растущих на 10%- и 300%-ном растворе X–A

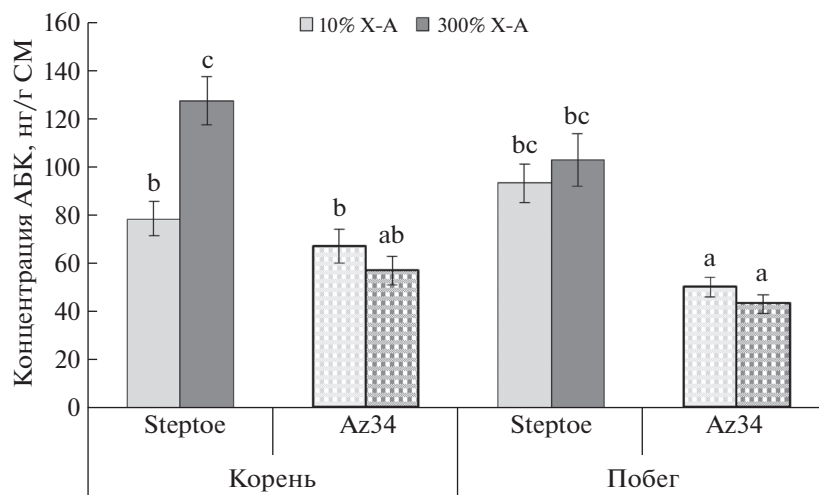
Генотип и среда	Транспирация, мг H <sub>2</sub> O/ч/растение	Доставка, нг ЦК/ч/растение		
		Z	ZR	ZN
St, 10% X–A	51.6 ± 2.8 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.02 <sup>b</sup>
St, 300% X–A	47.7 ± 1.9 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>a</sup>
Az34, 10% X–A	61.5 ± 2.7 <sup>b</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.22 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>c</sup>
Az34, 300% X–A	60.5 ± 2.5 <sup>b</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.20 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>bc</sup>

в течение 10 мин не влияла на скорость транспирации [16]. У растений сорта Steptoe на 300%-ном X–A наблюдали снижение транспирации на 10% (табл. 2). Расчет доставки ЦК производили путем умножения концентрации ЦК в ксилемном соке на скорость транспирации. Обнаружили еще большее (в 1.8 раза) снижение доставки ZR от корней к побегам растений сорта Steptoe, выращенных на 300%-ном растворе X–A по сравнению с 10%-ным раствором. У растений мутанта Az34 концентрация ЦК в ксилемном соке и транспирация при различных уровнях питательных веществ не изменились, что отразилось в неизменной доставке ЦК от корней к побегам.

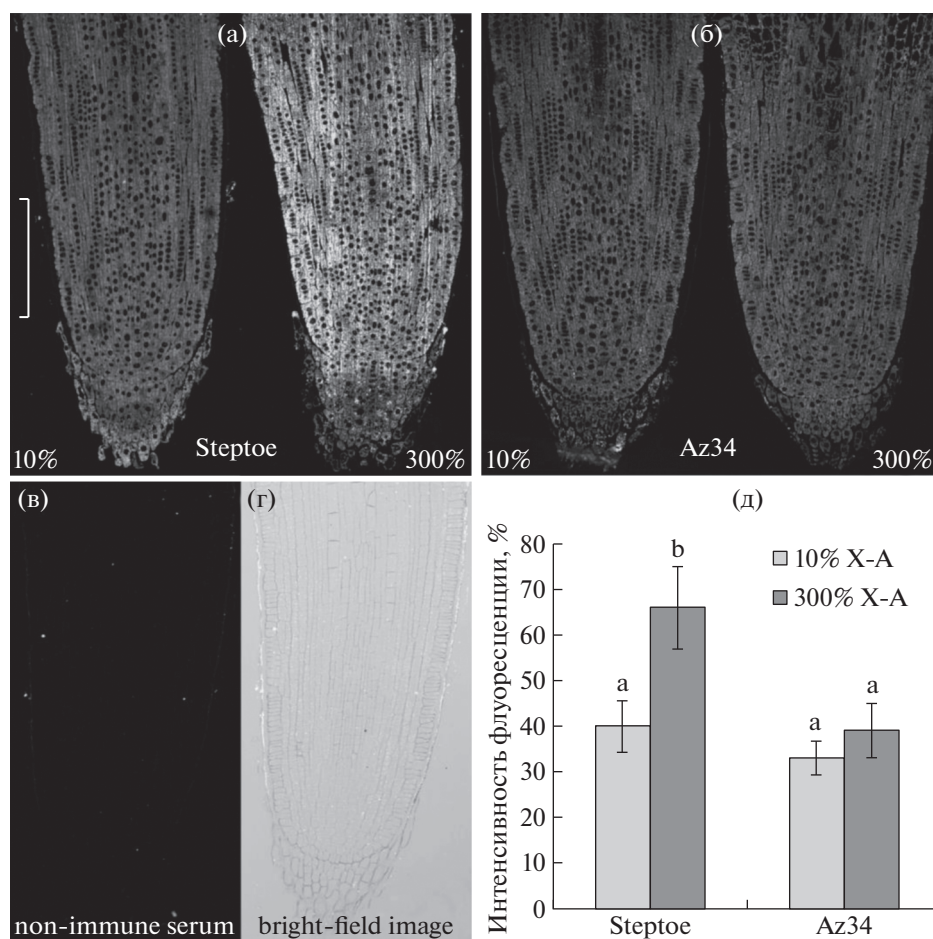
Как и ожидалось, концентрация АБК была меньше у мутанта Az34, чем у растений сорта Steptoe. Концентрация АБК в корнях была больше у растений Steptoe, выращенных на 300%-ном растворе X–A, по сравнению с 10%-ным раствором, в то время как у растений Az34, выращенных на любом уровне питательных веществ, не было обнаружено существенной разницы в содержании АБК в корнях (рис. 5).

Иммуногистохимическое исследование срезов корней показало повышенную флуоресценцию в случае растений сорта Steptoe, выращенных на 300%-ном X–A по сравнению с 10%-ным X–A (рис. 6а), в то время как у мутанта Az34 не было обнаружено различий во флуоресценции корней растений, выросших при разных уровнях минеральных питательных веществ (рис. 6б). Специфичность метода была подтверждена отсутствием флуоресценции контрольных срезов, обработанных неиммунной сывороткой (рис. 6в, г). Статистическая значимость различия между участками флуоресценции была подтверждена результатами оценки средней интенсивности флуоресценции изображений, полученных с помощью конфокального микроскопа с программным обеспечением ImageJ (рис. 6д).

Укорочение корней растений сорта Steptoe, выращенных на 300%-ном растворе X–A, сопровождалось и, вероятно, было связано с накоплением ЦК, обнаруженных как в целых корнях (рис. 1, табл. 1), так и в их кончиках (рис. 6). Эти результаты согласовались с известным эффектом –

**Рис. 5.** Концентрация АБК в корнях и побегах 6-суточных растений ячменя сорта Steptoe и мутанта Az34, выращенных в 10%- и 300%-ном растворе X–A, n = 9.





**Рис. 6.** Локализация цитокининов в кончиках корней растений сорта Steptoe (а) и мутанта Az34 (б), выращенных в 300%- или 10%-ном растворе X–А. Иммуногистохимический контроль с использованием неиммунной сыворотки (в) и изображение кончиков корней в проходящем свете (г). Флуоресценция цитокининов (среднее  $\pm$  SE, условные единицы, максимальная флуоресценция принята за 100%, минимальная – за 0%) (д). Шкала 200 мкм,  $n = 8$ .

ингибирующим действием ЦК на рост корней [26]. Взаимосвязь между ними подтверждена данными о том, что 300%-ный X–А не влиял на длину корня растений мутанта Az34, что, вероятно, было связано с отсутствием у них накопления ЦК. Усиление окрашивания на ЦК, обнаруженное в кончиках корней, выросших на 300%-ном X–А, очень важно для объяснения замедления роста корня, поскольку процесс роста происходит именно в этой его части. Иммуногистохимический метод показал более высокое содержание ЦК как в делящихся, так и в удлиняющихся клетках корня, что соответствовало способности ЦК ингибировать как деление [27], так и удлинение клеток корня [28], что приводило к торможению их роста. Аналогичные результаты были получены ранее в опытах с разделенной корневой системой, помещенной в контейнеры с разной концентрацией ионов, которые показали накопление ЦК в корнях, контактирующих с концентрирован-

ном раствором, что сопровождалось ингибированием их роста [14]. Однако механизм накопления ЦК в этих экспериментах оставался неясным. Настоящий эксперимент показал, что это могло быть связано с ингибированием экспорта ЦК из корней. Обнаружили накопление ЦК в корнях богатых питательными веществами растений сорта Steptoe одновременно со снижением уровня ЦК в их побегах. Кроме этого, пониженная концентрация ЦК, обнаруженная в ксилемном соке этих растений, могла служить прямым доказательством снижения транспорта ЦК из корней. Доставка ЦК от корней к побегам растений ячменя на 300%-ном растворе X–А снижалась даже в большей степени, чем их концентрация, из-за более низкой скорости транспирации (табл. 1). Снижение транспирации этих растений можно объяснить пониженной концентрацией ЦК, обнаруженных в их побегах, поскольку известно, что эти гормоны поддерживают транспирацию [29].



Обычно снижение доставки гормонов от корней к побегам объясняется ингибированием их синтеза в корнях [7]. Однако оно не может быть применено в нашем случае, поскольку накопление ЦК, обнаруженных в корнях растений сорта Steptoe на 300%-ном растворе, свидетельствовало против этого. Открытие переносчиков ЦК [30] позволило объяснить механизм прямой регуляции доставки ЦК от корней к побегам. Ранее было показано, что ингибирование вторичного активного трансмембранного транспорта обработкой протонофором КЦХГ приводило к снижению концентрации ЦК в корнях [24]. В настоящих экспериментах добавление КЦХГ предотвращало накопление ЦК в корнях растений сорта Steptoe на 300%-ной среде X–A, что предполагало участие вторичного активного процесса захвата ЦК клетками корня в накоплении этого гормона в растениях ячменя, выращенных на 300%-ном X–A.

Важно отметить, что ни накопление ЦК в корнях, ни ингибирование их удлинения не обнаружено у мутантов ячменя с дефицитом АБК (рис. 1, 2). Концентрация АБК была меньше в растениях мутанта Az34, чем в растениях сорта Steptoe, и, в отличие от их родительского сорта, концентрация АБК не увеличивалась в корнях растений ячменя на 300%-ной среде X–A (рис. 5). Эти результаты свидетельствовали о важности способности растений накапливать АБК для регуляции корневых ЦК и реакций роста. Есть данные, что высокие концентрации N увеличивают концентрацию АБК в корнях растений кукурузы, что связано с высвобождением свободной АБК из ее конъюгатов [31]. Не исключено, что этот механизм действовал и в настоящем эксперименте. Однако отсутствие значительного накопления АБК в растениях мутанта Az34 со сниженной активностью альдегидоксидазы АБК [32] предполагает участие синтеза АБК в накоплении этого гормона в ответ на сверхоптимальные концентрации минеральных питательных веществ. Было показано, что удаление P из питательного раствора приводило к снижению концентрации ЦК в кончиках корней из-за индуцированного АБК подавления гена HvIPT-1, участвующего в контроле синтеза ЦК корнями растений ячменя [11]. Этот механизм вряд ли будет работать в корнях растений ячменя на 300%-ном X–A, поскольку под действием сверхоптимальной концентрации минеральных питательных веществ концентрация ЦК увеличивалась, а не снижалась. Известно, что N усиливает регуляцию генов IPT как у арабидопсиса, так и у кукурузы [7], и очевидно, что этот эффект преодолевал возможную АБК-индуцированную понижающую регуляцию генов в растениях Steptoe,

растущих на сверхоптимальной питательной среде, что приводило к высокой концентрации цитокининов в корнях растений. Повышенная концентрация АБК, сопровождавшаяся снижением концентрации ЦК, была обнаружена в побегах растений, подвергавшихся воздействию как дефицита N, так и их сверхоптимальной концентрации [33], и эти эффекты, скорее всего, отражают не простое совпадение, а действие АБК на синтез ЦК и их транспорт от корней к побегам. АБК, вероятно, будет действовать по-другому в растениях, богатых питательными веществами, по сравнению с растениями, испытывающими недостаток питательных веществ, ингибируя транспорт ЦК от корней к побегам, что приводит к накоплению ЦК в корнях и ингибированию их удлинения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение эффектов сверхоптимальной концентрации минеральных питательных веществ на мутанте ячменя с дефицитом АБК и его родительском сорте показало зависимость роста корней и цитокининовых реакций от способности растений продуцировать АБК. В растениях сорта Steptoe, способных накапливать АБК, сверхоптимальная концентрация минеральных питательных веществ приводила к снижению экспорта ЦК из корней в побеги, массовому накоплению ЦК в корнях и их повышенному содержанию в растущих кончиках корней, что ингибировало их удлинение. Все эти эффекты отсутствовали у растений ячменя с дефицитом АБК.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП “Агидель”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Li X., Zeng R., Liao H.* Improving crop nutrient efficiency through root architecture modifications // *J. Integr. Plant Biol.* 2016. V. 58. P. 193–202.
2. *Lynch J.P.* Root phenotypes for improved nutrient capture: An underexploited opportunity for global agriculture // *New Phytol.* 2019. V. 223. P. 548–564.
3. *Forde B.G.* Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2002. V. 53. P. 203–224.
4. *Ruffel S., Krouk G., Ristova D., Shasha D., Birnbaum K.D., Coruzzi G.M.* Nitrogen economics of root foraging: Transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 18524–18529.
5. *Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H.* Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization, and translocation. // *J. Exp. Bot.* 2008. № 59. P. 75–83.

6. *Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T.* Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 26405–26410.
7. *Takei K., Ueda N., Aoki K., Kuromori T., Hirayama T., Shinozaki K., Yamaya T., Sakakibara H.* AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis* // *Plant Cell Physiol.* 2004, № 45.
8. *Gojon A., Krouk G., Perrine-Walker F., Laugier E.* Nitrate transceptor(s) in plants // *J. Exp. Bot.* 2011. № 62. P. 2299–2308.
9. *Wang R., Xing X., Wang Y., Tran A., Crawford N.M.* A genetic screen for nitrate regulatory mutants captures the nitrate transporter gene NRT1.1 // *Plant Physiol.* 2009. V. 151. P. 472–478.
10. *Korobova A.V., Akhiyarova G.R., Fedyaev V.V., Farkhutdinov R.G., Veselov S.Y., Kudoyarova G.R.* Participation of nitrate sensor NRT1.1 in the control of cytokinin level and root elongation under normal conditions and nitrogen deficit // *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. № 74. P. 221–226.
11. *Vysotskaya L., Akhiyarova G., Feoktistova A., Akhtyamova Z., Korobova A., Ivanov I., Dodd I., Kuluev B., Kudoyarova G.* Effects of phosphate shortage on root growth and hormone content of barley depend on capacity of the roots to accumulate ABA // *Plants.* 2020. № 9. P. 1722.
12. *Vysotskaya L.B., Trekozova A.W., Kudoyarova G.R.* Effect of phosphorus starvation on hormone content and growth of barley plants // *Acta Physiol. Plant.* 2016. V. 38. P. 108.
13. *Kudoyarova G.R., Dodd I.C., Veselov D.S., Rothwell S.A., Veselov S.Y.* Common and specific responses to availability of mineral nutrients and water // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 2133–2144.
14. *Korobova A.V., Ivanov I.I., Akhiyarova G.R., Veselov D.S., Kudoyarova G.R., Veselov S.Y.* Influence of macroelements' uneven distribution on the content of hormones and extension of the roots in wheat plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2019. V. 66. P. 748–755.
15. *Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmulling T.* 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. V. 15. P. 2532–2550.
16. *Vysotskaya L.B., Korobova A.V., Veselov S.Y., Dodd I.C., Kudoyarova G.R.* ABA mediation of shoot cytokinin oxidase activity: Assessing its impacts on cytokinin status and biomass allocation of nutrient deprived durum wheat // *Funct. Plant Biol.* 2009. V. 36. P. 66–72.
17. *Harris J.M., Ondzighi-Assoume C.A.* Environmental nitrate signals through abscisic acid in the root tip // *Plant Signal. Behav.* 2017. V. 12. e1273303.
18. *Li X., Chen L., Forde B.G., Davies W.J.* The biphasic root growth response to abscisic acid in *Arabidopsis* involves interaction with ethylene and auxin signalling pathways // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 1493.
19. *Spollen W.G., Lenoble M.E., Samuels T.D., Bernstein N., Sharp R.E.* Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production // *Plant Physiol.* 2000. V. 122. P. 967–976.
20. *Vysotskaya L.B., Korobova A.V., Kudoyarova G.R.* Abscisic acid accumulation in the roots of nutrient-limited plants: Its impact on the differential growth of roots and shoots // *J. Plant Physiol.* 2008. V. 165. P. 1274–1279.
21. *de Groot C.C., Marcelis L.F.M., van den Boogaard R., Kaiser W.M., Lambers H.* Interaction of nitrogen and phosphorus nutrition in determining growth // *Plant Soil* 2003. V. 248. P. 257–268.
22. *Arkipova T.N., Melentiev A.I., Martynenko E.V., Kudoyarova G.R., Veselov S.U.* Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants // *Plant Soil.* 2005. V. 272. P. 201–209.
23. *Veselov S.U., Kudoyarova G.R., Egutkin N.L., Gyuli-Zade V.G., Mustafina A.R., Kof E.K.* Modified solvent partitioning scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay for indole 3-acetic acid // *Physiol. Plant.* 1992. V. 86. P. 93–96.
24. *Kudoyarova G.R., Korobova A.V., Akhiyarova G.R., Arkipova T.N., Zaytsev D.Y., Prinsen E., Egutkin N.L., Medvedev S.S., Veselov S.Y.* 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.
25. *Vysotskaya L.B., Akhiyarova G.R., Sharipova G.V., Dedova M.A., Veselov S.Y., Zaitsev D.Y., Kudoyarova G.R.* The influence of local IPT gene induction in roots on content of cytokinins in cells of tobacco leaves // *Cell Tissue Biol.* 2015. № 9. P. 127–132.
26. *Werner T., Nehnevajova E., Köllmer I., Novák O., Strnad M., Krämer U., Schmülling T.* Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and tobacco // *Plant Cell.* 2010. V. 22. P. 3905–3920.
27. *Ivanov V.B., Filin A.N.* Cytokinins regulate root growth through its action on meristematic cell proliferation but not on the transition to differentiation // *Funct. Plant Biol.* 2017. V. 45. P. 215–222.
28. *Růžička K., Šimášková M., Duclercq J., Petrášek J., Zažimálová E., Simon S., Friml J., Van Montagu M.C.E., Benková E.* Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009. V. 106. P. 4284–4289.
29. *Farber M., Attia Z., Weiss D.* Cytokinin activity increases stomatal density and transpiration rate in tomato // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 67. P. 6351–6362.

30. *Duran-Medina I., Diaz-Ramirez D., Marsch-Martinez N.* Cytokinins on the Move // *Front. Plant Sci.* 2017. № 8. P. 146.
31. *Ondzighi-Assoume C.A., Chakraborty S., Harris J.M.* Environmental nitrate stimulates abscisic acid accumulation in *Arabidopsis* root tips by releasing it from inactive stores // *Plant Cell* 2016. V. 28. P. 729–745.
32. *Walker-Simmons M., Kudrna D.A., Warner R.L.* Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley // *Plant Physiology*. 1989. V. 90. P. 728–733.
33. *Wilkinson S., Hartung W.* Food production: Reducing water consumption by manipulating long-distance chemical signalling in plants // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 1885–1891.

## **Effect of Supra-Optimal Nitrates and Phosphates Concentrations on the Process of Barley Roots Elongation Associated with the ABA-Dependent Transport of Cytokinins from the Roots**

**L. N. Timergalina<sup>a,#</sup> and L. B. Vysotskaya<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences  
prosp. Octyabrya 69, Ufa 450054, Russia*

<sup>#</sup>*E-mail: leinaz@mail.ru*

Regulation of roots elongation is important for assimilation of mineral nutrients by plants. Phytohormones – cytokinins (CK) and abscisic acid (ABA) and their interaction are important for root elongation control while ion availability changes. However, their role in regulating the growth response to supra-optimal concentrations of nitrates (N) and phosphates (P) has not been sufficiently studied and it is the subject of this study. The effect of supra-optimal concentrations of N and P ions on root elongation and CK distribution between roots and shoots was studied in ABA deficient barley mutant Az34 and its parent variety Steptoe. The CK concentration in the cells of the growing root tips was analyzed by immunohistochemical method. Supra-optimal concentrations of N and P led to the ABA and CK accumulation in the root tips, which was accompanied by a decrease in the CK content in shoots and inhibition of root growth in Steptoe plants. None of these effects were detected in Az34, which indicates the importance of the ability of plants to accumulate ABA to control these reactions. Since CK are known to inhibit root elongation, the effect of supra-optimal concentrations of N and P on root growth is probably due to the accumulation of CK caused by ABA-induced inhibition of CK transport from roots to shoots.

*Key words:* barley *Hordeum vulgare* L., barley mutant Az34, root elongation, abscisic acid (ABA), cytokinins, mineral nutrition.