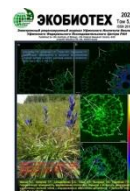




ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>


ГИДРАВЛИЧЕСКАЯ ПРОВОДИМОСТЬ, ФОРМИРОВАНИЕ АПОПЛАСТНЫХ БАРЬЕРОВ И АКТИВНОСТЬ АКВАПОРИНОВ У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА С ИНДУЦИРОВАННЫМ НАКОПЛЕНИЕМ ЦИТОКИНИНОВ

Иванов Р.С.*, Ахиярова Г.Р., Сельдимирова О.А.,
Галин И.Р., Высоцкая Л.Б., Кудоярова Г.Р.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

*E-mail: ivanovirs@mail.ru

В этом исследовании мы проследили влияние индукции гена *ipt*, который увеличивает концентрацию цитокининов в трансгенных растениях табака, на транспирацию и гидравлическую проводимость. Новизна подхода состояла в том, чтобы проследить посредством каких механизмов цитокинины могут влиять на гидравлическую проводимость растений табака при повышении транспирационного запроса вследствие накопления цитокининов и открытия устьиц. Влияние повышенной концентрации цитокининов на активный транспорт воды через аквапорины выявляли путем ингибирования их хлоридом ртути. Отложение лигнина и суберина в апопласте, от которых зависит его проводимость для воды, выявляли с помощью берберина после повторяющихся ежедневных тепловых индукций. Обнаружили, что повышенная концентрация цитокининов увеличивает гидравлическую проводимость растений табака за счет усиления активности аквапоринов и торможения образования апопластных барьеров. Одновременное влияние цитокининов как на устьичную, так и на гидравлическую проводимость позволяет растениям координировать испарение воды листьями и ее поступление из корней, поддерживая тем самым водный баланс и гидратацию листа.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum* ♦ цитокинины ♦ водный обмен ♦ *ipt*-трансгенные растения

HYDRAULIC CONDUCTIVITY, APOPLAST BARRIERS FORMATION, AND AQUAPORIN ACTIVITY IN TRANSGENIC TOBACCO PLANTS WITH INDUCED CYTOKININ ACCUMULATION

Ivanov R.S.*, Akhiyarova G.R., Seldimirova O.A.,
Galini I.R., Vysotskaya L.B., Kudoyarova G.R.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of
the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

*E-mail: ivanovirs@mail.ru

In this study, we discovered the effect of the induction of the *ipt* gene, which increases the concentration of cytokinins in transgenic tobacco plants, on transpiration and hydraulic conductance. The novelty of the work was to study the mechanisms of involvement of cytokinins in the regulation of the hydraulic conductivity of tobacco plants with an increase in transpiration demand due to the accumulation of cytokinins and the opening of stomata. The effect of an increased concentration of cytokinins on the active transport of water through aquaporins was revealed by inhibiting them with mercury chloride. The deposition of lignin and suberin in the apoplast, which determines its conductivity for water, was detected with berberine after repeated daily heat inductions. It was found that cytokinins increase the hydraulic conductivity of tobacco plants by up-regulation the activity of aquaporins and inhibiting the formation of apoplast barriers. The simultaneous effect of cytokinins on both stomatal and hydraulic conductivity allows plants to coordinate the evaporation of water from the leaves and its inflow from the roots, thereby maintaining the water balance and leaf hydration.

Keywords: *Nicotiana tabacum* ♦ cytokinins ♦ water relations ♦ *ipt*-transgenic plants

Поступила в редакцию: 05.12.2022

[Цитировать | Cite as](#)

DOI: [10.31163/2618-964X-2022-5-4-175-186](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2022-5-4-175-186)

EDN: [GVWVPN](https://www.edn.ru/GVWVPN)



ВВЕДЕНИЕ

Цитокинины способствуют росту растений, максимально увеличивая их продуктивность [Gu et al., 2018]. Снижение содержания активных цитокининов

у стрессированных растений сопровождается торможением роста, а оптимальное минеральное питание способствует биосинтезу цитокининов, тем самым активируя рост растений [Krouk, 2016]. Механизмы действия цитокининов активно обсуждаются, что свидетельствует об их влиянии на многочисленные процессы в растениях, одним из которых является способность удерживать устьица в открытом состоянии [Tanaka et al., 2006; Veselova et al., 2006; Vysotskaya et al., 2010; Daszkowska-Golec, Szarejko, 2013]. Это свойство цитокининов очень важно, поскольку высокая устьичная проводимость поддерживает газообмен и коррелирует с уровнем фотосинтеза, в то время как закрытие устьиц, хотя и сохраняет воду за счет снижения транспирации, ограничивает фотосинтез, что приводит к снижению биомассы и урожайности [Yang et al., 2020]. Цитокинины участвуют в индуцированном светом открытии устьиц [Song et al., 2006], а увеличение содержания цитокининов ксилемы усиливает повторное открытие устьиц при устранении водного дефицита [Hansen, Dörffling, 2003]. Хотя механизмы действия цитокининов на устьица менее понятны, чем влияния абсцизовой кислоты, существуют данные о способности цитокининов снижать уровень перекиси водорода, которая, как известно, участвует в закрытии устьиц [Song et al., 2006]. Было показано, что у арабидопсиса цитокинины ингибируют вызванное абсцизовой кислотой закрытие устьиц за счет увеличения продукции этилена [Tanaka et al., 2006]. Двойной мутант арабидопсиса *ahk2-2 ahk3-3* с нарушением чувствительности к цитокининам демонстрировал неспособность открывать устьица на свету в той же степени что и исходный дикий тип (WT) [Marchadier et al., 2014], в то же время мутанты с нарушениями передачи цитокининового сигнала имели более низкую устьичную проводимость [Nguyen et al., 2016]. Напротив, активация экспрессии генов, участвующих в цитокининовом сигналинге, способствовала адаптации растений винограда к более позднему солевому стрессу, поддерживая открытыми устьица и тем самым увеличивая ассимиляцию углерода [Montanaro et al., 2022]. Хотя действие цитокининов на устьица, по-видимому, позитивно влияет на рост растений, поддержание устьиц открытыми может иметь отрицательные последствия, если повышенная транспирация не компенсируется подачей воды к побегам. Увеличение устьичной проводимости и транспирации должно быть уравновешено повышением гидравлической проводимости растений, сводя к минимуму изменения водного потенциала листа. В связи с этим особое значение имеют корни, так как они оказывают большое сопротивление всему движению воды из почвы к побегам [Hao et al., 2018]. Было показано, что более высокая гидравлическая проводимость корня связана с устойчивостью к водному стрессу за счет поддержания менее отрицательного водного потенциала листа (Ψ) и задержки закрытия устьиц [Rodríguez-Gamir et al., 2018]. Роли цитокининов в регуляции гидравлической проводимости корня уделяется мало внимания. В обзоре [Maurel, Nacry, 2020] упоминается только способность цитокининов влиять на рост и развитие корней, при этом рассматривается связь гидравлической проводимости корня с его архитектурой. Однако известно, что цитокинины ингибируют рост и ветвление корней [Ivanov, Filin, 2018], что вряд ли могло компенсировать индуцированное цитокининами увеличение транспирации. В противном случае цитокинины могут участвовать в контроле гидравлической проводимости корней, которая, как известно, зависит от образования апопластных барьеров и активности аквапоринов (межклеточный путь) [Vitali et al., 2015]. Информация о влиянии цитокининов на эти параметры весьма скудна и в основном косвенна. Характеристика цитокинин-чувствительного транскрипта

у риса выявила активацию четырех генов аквапоринов [Raines et al., 2016], в то время как ингибирование передачи сигналов цитокинина влияло на фосфорилирование аквапоринов [Lardon et al., 2022]. В обзоре по гормональному контролю образования вторичной стенки клеток отмечается, что роль цитокининов в контроле генов, участвующих в биосинтезе вторичной стенки корня, остается неясной. Тем не менее, авторы, исследовав лигнификацию эндотелия, делают выводы из, что растения, сверхэкспрессирующие АНР4, проявляли сниженную лигнификацию эндотелия, в то время как мутант с дефицитом *ahp4* демонстрировал большую лигнификацию относительно растений дикого типа. Также было показано, что цитокинины контролируют отложение суберина в поясах Каспари [Andersen et al., 2018]. Однако нам не удалось найти информацию о каком-либо влиянии цитокининов на гидравлическую проводимость корня, и настоящее исследование было направлено на восполнение пробела в этих знаниях. Мы выбрали модельные трансгенные растения табака с термоиндуцируемой экспрессией *ipt*-гена, контролирующего синтез цитокининов, чтобы проследить влияние повышенной концентрации цитокининов на гидравлическую проводимость растения. Эта модель ранее использовалась для изучения влияния цитокининов на устьичную проводимость [Vysotskaya et al., 2010]. В настоящем исследовании мы проанализировали участие аквапоринов в индуцированных цитокининами изменениях гидравлической проводимости путем ингибирования их активности с помощью хлорида ртути. Формирование апопластных барьеров контролировали окрашиванием лигнина и суберина берберинном.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на диких (SR) и трансгенных (HSIPT) растениях табака (*Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana SR-1).

Семена дикого (SR) и трансгенного табака (HSIPT) получали, как описано ранее [Schmulling et al., 1989]. Растения трансгенной линии были трансформированы бактериальным геном *ipt*, отвечающим за синтез изопентенилтрансферазы и находящимся под контролем промотора белка теплового шока (ТШ) *Drosophila melanogaster*. В наших экспериментах семена проращивали в темноте в течение 7 дней в почве, рассаду высаживали в отдельные горшки с песком, насыщенным 100% раствором питательной смеси Хогланда-Арнона и выращивали при 16-часовом фотопериоде, освещенности 400 мкмоль/м²с и температуре 26/18°C (день/ночь). Растения снабжали минеральными питательными веществами путем ежедневного полива 5 мл 100% раствора Хогланда-Арнона и добавляли по весу дистиллированную воду до 70% от полной влагоемкости песка. Растения на стадии шести листьев (без учета семядолей) подвергали тотальному нагреванию в термостате в течение часа при температуре 40-42°C. Контрольные растения выдерживали при комнатной температуре в закрытой коробке. После обработок растения переносили на светоплощадку и через 0.5-1 ч измеряли транспирацию, водный потенциал листьев, фиксировали образцы для иммуноанализа (ИФА), готовили срезы базальной части боковых корней для иммуногистохимического определения цитокининов; через 4 дня ежедневного воздействия тепловым шоком анализировали отложения лигнина и суберина.

Для ингибирования аквапоринов в корневую среду перед прогревом растений добавляли HgCl₂ в концентрации 0.5 мМ.

Транспирацию оценивали по потере воды, измеренной путем взвешивания горшков. Поверхность песка была покрыта алюминиевой фольгой, чтобы предотвратить испарение воды непосредственно с поверхности песка.

Гидравлическую проводимость рассчитывали по формуле: $L = T/(\Psi_s - \Psi_l)m$, где T – транспирация, Ψ_s и Ψ_l – водный потенциал питательного раствора и листа соответственно, m – корневая масса (модификация метода [Bunce and Ziska, 1998]). Водный потенциал листа измеряли психрометром (PSYPRO, «Wescor», Logan, США). Водный потенциал питательного раствора измеряли с помощью осмометра (Osmomat 030 «Gonotec GmbH», Берлин, Германия).

Для выделения гормонов из листьев и корней их гомогенизировали в 80%-ном этаноле и инкубировали в течение ночи при 4°C. После фильтрации и выпаривания этанола водный остаток разделяли на две части, одну из которых очищали на колонке C18 (Bond-Elut, RP-C18). Очищенные на колонке цитокинины разделяли с помощью ТСХ и определяли методом ИФА, как описано [Vysotskaya et al., 2010]. Из другой части диметилловым эфиром извлекали ИУК и АБК [Vysotskaya et al., 2016]. Из подкисленного до pH 2.5 водного остатка ИУК и АБК дважды экстрагировали диэтиловым эфиром при соотношении органической и водной фаз 1:3. К объединенной органической фракции добавляли 1%-й раствор NaHCO_3 (соотношение органическая/водная фазы 3:1), встряхивали, эфир отбрасывали. После подкисления содового раствора, содержащего гормоны, проводили реэкстракцию эфиром с уменьшением объема экстрагента (3:1). Уменьшение количества экстрагента на каждой стадии и повторная экстракция повышали селективность извлечения гормонов [Veselov, 1992]. Метилирование гормона проводили добавлением диэтилового эфира, содержащего диазометан. После выпаривания диэтилового эфира гормоны растворяли в 80% этаноле и отбирали аликвоту для количественного определения в ИФА с использованием специфических антител, как описано [Vysotskaya et al., 2016].

Иммунолокализацию цитокининов проводили на срезах базальной части боковых корней растений табака, как описано [Vysotskaya et al., 2020; Vysotskaya et al., 2021]. Кусочки ткани длиной 3 мм собирали и фиксировали в смеси 4%-ного параформальдегида (Riedel de Haen, Seelze, Германия) и 0.1%-ного глутаральдегида (Sigma, Steinheim, Германия) в PBS-буфере (pH 7,4). Для улучшения проникновения фиксатора в ткани растений начальный этап (первые 30 мин) фиксации проводили под вакуумом. После инфильтрации кусочки растений переносили в свежий фиксатор и выдерживали при 4°C в течение ночи. После обезвоживания в серии этанола с возрастающей концентрацией растительные ткани заключали в смолу JB4 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Гистологические срезы толщиной 1.5 мкм получали на микротоме (HM 325, MICROM Laborgerate, Германия) и помещали на предметные стекла. Перед инкубацией (в течение ночи при 4°C) с поликлональными кроличьими антителами против цитокинина (1:100) образцы предварительно обрабатывали PBS, содержащим 0.2% желатина и 0.05% Tween-20 (PGT) в течение 30 мин для уменьшения неспецифического связывания. Этот же раствор использовали для разведения антител. После трехкратной промывки 0.05%-м Tween-20 в PBS в течение 10 мин срезы инкубировали с вторичными антителами против IgG кролика, конъюгированными с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 555 (Invitrogen, Rockford, USA) (1:500 в PGT) в течение 3 ч при 37°C. в темноте. Образцы промывали пять раз по 10 мин PBS и ополаскивали водой MilliQ. Затем на срезы наносили смесь глицерина

и желатина (0.5 г желатина, 3.5 мл глицерина на 3 мл воды) и сразу же закрывали покровными стеклами и просматривали с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа Fluoview FV3000 (FV31-HSD) (Olympus, Токио, Япония), флуоресценцию красителя возбуждали твердотельным лазером с длиной волны 555 нм, испускание флуоресценции регистрировали при 561 нм.

Лигнин и суберин идентифицировали, как описано в работе [Zaqout et al., 2020]. Небольшие фрагменты базальной части боковых корней фиксировали в смеси (7:7:100) формалина, уксусной кислоты и 70%-го этанола, обезживали в серии этанола с возрастающей концентрацией, пропитывали смесями этанола и ксилола, затем чистым ксилолом и заключали в парафин. Срезы изготавливали на санном микротоме МС-2 (РусьХимСнаб, Москва, Россия) и после депарафинизации окрашивали 0.1%-м водным раствором гемисульфата берберина (вес/объем) в течение 1 ч, а затем дважды промывали дистиллированной водой. Для увеличения интенсивности флуоресценции срезы дополнительно окрашивали в течение 15 мин толуидиновым синим (0.05% вес/объем) в 0.1 М фосфатном буфере (рН 5.6), дважды промывали дистиллированной водой, заключали в смесь 0.1%-го FeCl₃/50%-го глицерина и закрывали покровными стеклами. Срезы просматривали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Fluoview FV3000 (FV31-HSD) (Olympus, Токио, Япония), флуоресценцию берберина возбуждали твердотельным лазером с длиной волны 488 нм, испускание флуоресценции регистрировали при 520 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гормональный баланс. Сравнение концентрации (содержание в пересчете на г сырой массы) цитокининов и в корнях, и в листьях растений дикого (SR) и трансгенного (IPT) типа табака не выявило существенной разницы между ними при выращивании в контрольных условиях без тепловой индукции (табл. 1). Как и ожидалось, индукция гена *ipt* с помощью нагревания растений в течение часа при 40-42 °С, так называемого теплового шока (ТШ), приводила через 0.5–1 ч после обработки к увеличению концентрации цитокининов как в листьях, так и в корнях трансгенных растений (табл. 1). Содержание этих гормонов у растений дикого типа при данном воздействии достоверно не менялось.

Таблица 1. Содержание цитокининов (сумма зеатина (Z), зеатинрибозида (ZR) и зеатиннуклеотида (ZN)), АБК и ИУК в пересчете на сырую массу (нг/г) в третьем и четвертом листьях и корнях табака дикого (SR) и трансгенного (IPT) типа через 0.5-1 ч после одночасового воздействия теплового шока (ТШ) при 40-42 °С. Достоверно отличающиеся значения обозначены разными буквами (ANOVA с последующим критерием Дункана при $p < 0.05$, $n = 6$)

Гормоны	Листья				Корень			
	SR		IPT		SR		IPT	
	Контр	ТШ	Контр	ТШ	Контр	ТШ	Контр	ТШ
ZN+Z+ZR	22.4 ^a	28.0 ^{ab}	22.8 ^a	37.8 ^b	25.1 ^a	26.9 ^a	24.0 ^a	35.7 ^b
АБК	14 ^{ab}	14 ^{ab}	16 ^{bc}	12 ^a	12 ^a	16 ^{bc}	11 ^a	18 ^c
ИУК	91 ^c	96 ^c	99 ^c	77 ^c	20 ^a	28 ^a	24 ^a	46 ^b

Содержание АБК было сходным в листьях и корнях выращенных без нагревания растений дикого и трансгенного табака (табл. 1). При воздействии ТШ ее концентрация в листьях растений дикого типа не изменялась, но несколько снижалась у трансгенных растений. Концентрация АБК в корнях повышалась при тепловой обработке растений обоих генотипов. В отсутствие нагрева концентрация ИУК как в корнях, так и в листьях растений дикого типа была аналогична таковой у трансгенных растений и не зависела от тепловой обработки, в то время как концентрация ИУК в корнях трансгенных растений повышалась под действием ТШ (табл. 1).

Иммуногистохимическое исследование. Иммуногистохимическое исследование поперечных срезов базальной части боковых корней табака с использованием антител с высокой иммунореактивностью к зеатину показало усиление флуоресценции при ТШ, подтверждающее повышение концентрации цитокининов в корнях (рис. 1).

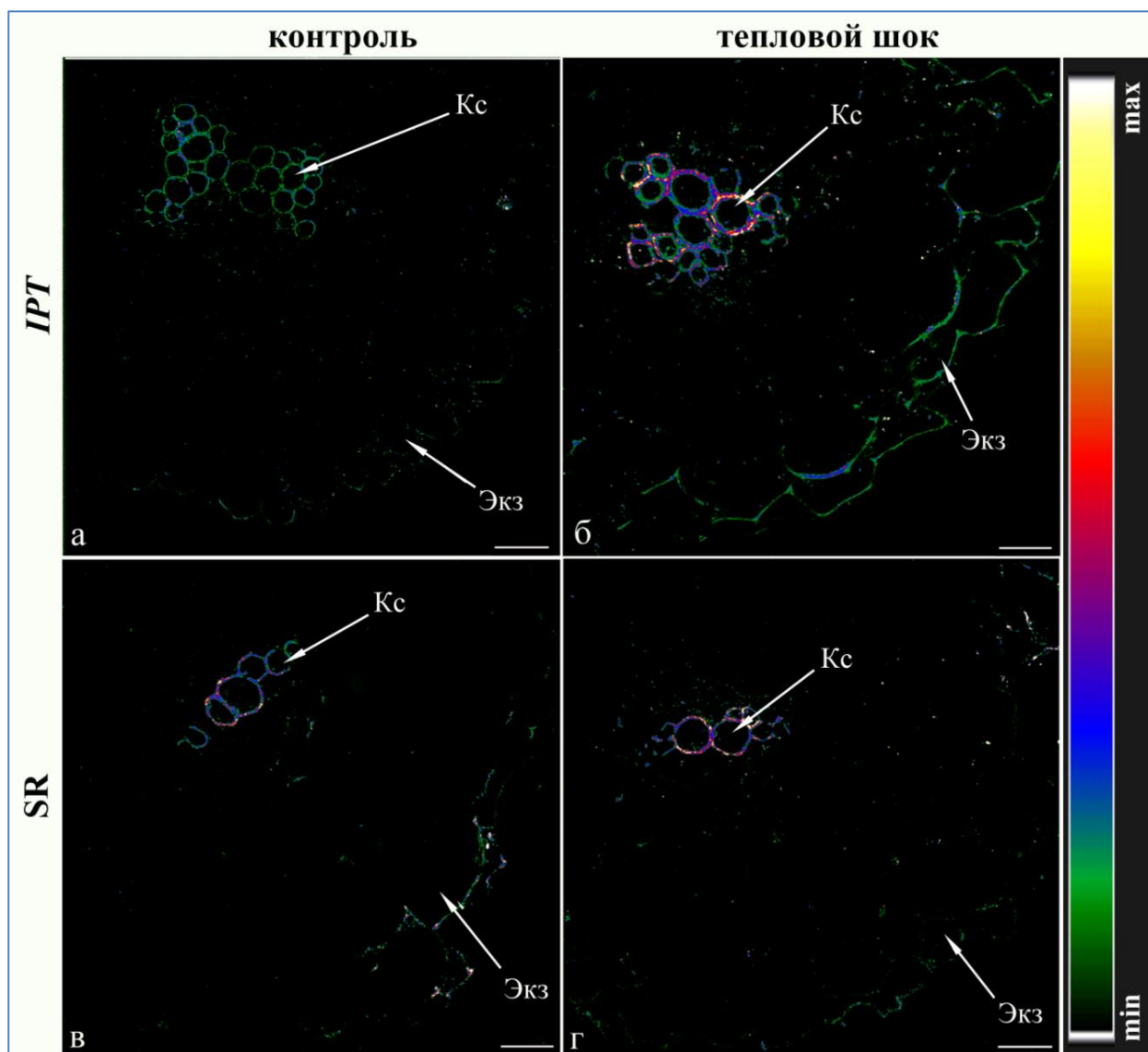


Рис. 1. Иммунолокализация цитокининов в сосудах ксилемы боковых корней у трансгенных (IPT) (а, б) и диких (SR) (в, г) растений табака после часового воздействия ТШ (б, г) и в его отсутствие (контроль) (а, в). Кс – ксилема, Экз – экзодерма. Цветовая шкала отображает интенсивность флуоресценции, соответствующую количеству цитокининов. Масштаб – 100 мкм.

Показатели водного обмена. Транспирация растений табака обоих генотипов увеличивалась вскоре после воздействия ТШ. Обнаруженное увеличение было более

существенным у трансгенных растений по сравнению с дикими (табл. 2). Через час у нетрансформированных растений уровень транспирации снижался до контрольных значений, в то время как у растений *IPT* оставался высоким.

Таблица 2. Транспирация дикого (SR) и трансгенного (*IPT*) растения табака, выраженная в г воды на растение в час, через 0.5 и 1 час после одночасовой обработки ТШ при 40-42 °С и в отсутствие воздействия (контроль). Достоверно отличающиеся значения обозначены разными буквами (ANOVA с последующим критерием Дункана при $p < 0.05$, $n = 9$).

Генотип	0.5 ч		1 ч	
	Контроль	ТШ	Контроль	ТШ
SR	2.2±0.3 ^a	3.5±0.3 ^b	2.9±0.2 ^{ab}	3.0±0.3 ^{ab}
<i>IPT</i>	2.4±0.2 ^a	4.4±0.4 ^c	3.1±0.4 ^{ab}	4.6±0.4 ^c

Водный потенциал полностью сформированных третьего и четвертого листьев (табл. 3) растений табака, измеренный через 1 ч после воздействия ТШ, был выше в листьях растений *IPT* (табл. 3) по сравнению с SR, несмотря на более высокие транспирационные потери трансгенных растений, обнаруженные в этот период времени (табл. 2). Последнее предполагает увеличение у *IPT* растений водного потока через корни для компенсации повышенного испарения воды листьями под воздействием теплового шока.

Расчет гидравлической проводимости подтвердил, что после обработки тепловым шоком она была выше у растений *IPT* по сравнению с растениями SR (табл. 3).

Таблица 3. Водный потенциал третьего и четвертого листьев растений табака и гидравлическая проводимость контрольных и обработанных 0.5 мМ HgCl₂ растений табака дикого (SR) и трансгенного (*IPT*) типа через 1 ч после одночасового воздействия ТШ при 40–42 °С и в отсутствие воздействия (контроль). Достоверно отличающиеся значения внутри каждого показателя обозначены разными буквами (ANOVA с последующим критерием Дункана при $p < 0.05$, $n = 6$).

Водный потенциал, МПа				Гидравлическая проводимость, г H ₂ O/ч /МПа/г сырой массы корней			
Третий лист		Четвертый лист		Контроль		HgCl ₂	
SR	<i>IPT</i>	SR	<i>IPT</i>	SR	<i>IPT</i>	SR	<i>IPT</i>
-0.36±0.03 ^c	-0.23±0.02 ^d	-0.68±0.05 ^a	-0.49±0.04 ^b	1.6±0.1 ^c	5.9±0.4 ^d	0.7±0.1 ^a	1.3±0.1 ^b

Для проверки предположения о возможном участии аквапоринов (AQP) в повышении гидравлической проводимости подвергавшихся тепловому шоку трансгенных растений, в корневую среду обоих типов табака непосредственно перед нагреванием добавляли хлорид ртути (ингибитор AQP). Расчет гидравлической проводимости показал, что предобработка приводила к снижению этого показателя в 4 раза у *IPT* и только в 2 раза у растений дикого типа (табл. 3). Эти результаты свидетельствуют о большем вкладе аквапоринов в увеличение гидравлической проводимости у растений *IPT* после тепловой обработки, по сравнению с растениями дикого типа.

Поскольку после нескольких дней обработки растений тепловым шоком можно ожидать влияния этого воздействия на формирование апопластных барьеров, было проанализировано отложение лигнина и суберина на срезах боковых корней, окрашенных берберинном, у растений табака обоих генотипов. На рис. 2 показано, что флуоресценция

этого красителя была ниже как в экзодерме, так и в эндодерме и сосудах боковых корней трансгенных растений, и это позволяет предположить, что индукция *ipt*-гена уменьшала образование апопластных барьеров в корнях.

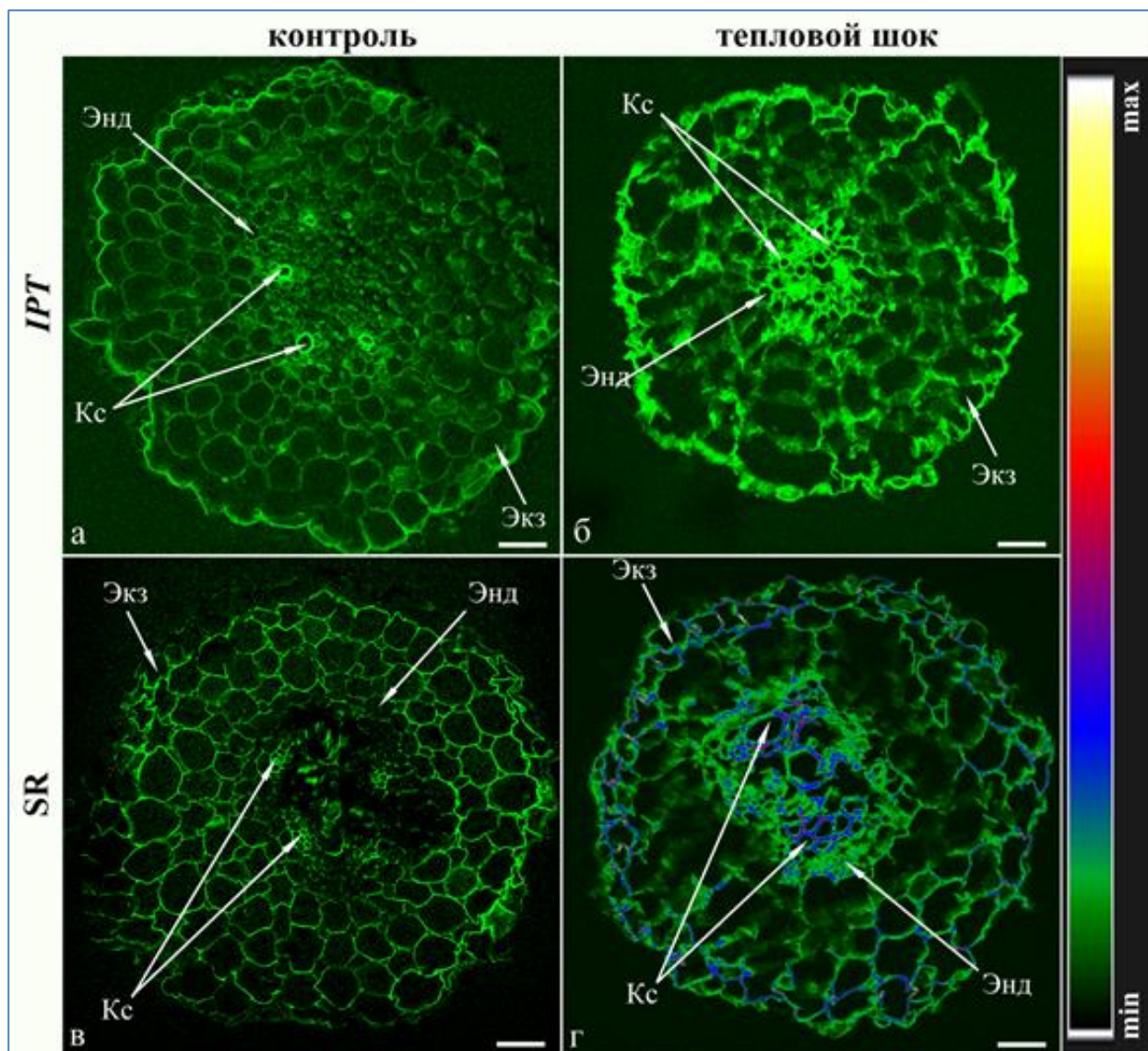


Рис. 2. Локализация лигнина и суберина в окрашенных берберином поперечных срезах корней табака у трансгенных (*IPT*) (а, б) и диких (*SR*) (в, г) растений табака после ежедневного часового воздействия теплового шока в течение 4 суток (б, г) и в отсутствие нагревания (контроль) (а, в). Кс – ксилема, Экз – экзодерма, Энд – эндодерма. Цветовая шкала отражает интенсивность флуоресценции берберина. Масштаб 50 мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ

Выявленное в листьях трансгенных растений табака увеличение содержания цитокининов, вызванное тепловой индукцией (ТИ) *ipt*-гена, сопровождалось увеличением уровня транспирации. Эти результаты согласуются с данными литературы о способности цитокининов удерживать устьица в открытом состоянии [Nguyen et al., 2016; Montanaro et al., 2022]. Ранее нами уже было показано, что индукция *ipt*-гена у используемого в данной работе трансгенного табака (исходный сорт Petit Havana SR-1) приводила к увеличению устьичной проводимости и транспирации [Vysotskaya et al., 2010]. Новизна настоящего исследования заключается в изучении влияния повышенной транспирации трансгенных растений на их водный обмен и связи транспирации с гидравлической проводимостью.

Измерение водного потенциала листьев позволило обнаружить, что у трансгенных растений после воздействия теплового шока он был выше, несмотря на их повышенную транспирацию, а поддержание гидратации листьев растений, очевидно, было связано с повышенной гидравлической проводимостью. Известно, что гидравлическая проводимость увеличивается в соответствии с транспирационным запросом [Simonin et al., 2012]. Однако механизм этого эффекта до сих пор остается неясным.

Наши эксперименты с ингибитором AQP показали участие водных каналов в повышении гидравлической проводимости у термоиндуцированных трансгенных растений (табл. 3), характеризующихся повышенным содержанием цитокининов (табл. 1). Информация о способности цитокининов влиять на активность аквапоринов немногочисленна. Поэтому мы попытались связать изменения гидравлической проводимости, обнаруженные в настоящих экспериментах, с вызванными тепловым шоком изменениями других гормонов (АБК, ИУК).

Хорошо известно, что АБК влияет на активность AQP [Maurel et al., 2015], и обнаруженная после теплового шока повышенная гидравлическая проводимость трансгенных растений может быть связана с накоплением этого гормона в корнях. Однако содержание АБК в корнях увеличивалось при воздействии теплового шока как у трансгенных, так и у диких растений, тогда как повышение гидравлической проводимости было характерно только для трансгенных растений.

В отличие от АБК, ТШ-индуцированное увеличение концентрации ИУК в корнях было обнаружено только у трансгенных растений. Однако связать изменения ауксинов с увеличением гидравлической проводимости растений не удалось, так как известно, что ауксины снижают, а не повышают активность аквапоринов.

Имеющиеся транскриптомные данные свидетельствуют о способности цитокининов увеличивать экспрессию генов, кодирующих AQP [Raines et al., 2016]. Однако вызванные тепловым шоком изменения гидравлической проводимости, обнаруженные в трансгенных растениях, были довольно быстрыми и поэтому вряд ли связаны с изменениями в экспрессии генов. Более вероятно, что изменения гидравлической проводимости были связаны с фосфорилированием AQP, поскольку известно, что цитокинины влияют на этот процесс [Lardon et al., 2022]. Хотя значение цитокининов в контроле потока воды через растения нуждается в дальнейшем изучении, данные, полученные в настоящих экспериментах, подтверждают возможность их участия в контроле гидравлической проводимости через их влияние на активность AQP.

Регулярные тепловые обработки в течение четырех дней повлияли на формирование апопластных барьеров в боковых корнях трансгенных растений, в которых было обнаружено снижение отложения лигнина и суберина (рис. 2). Это могло способствовать увеличению гидравлической проводимости у термоиндуцированных трансгенных растений табака (табл. 3), поскольку, по данным литературы, формирование апопластных барьеров снижает гидравлическую проводимость [Li et al., 2020]. Сведения об участии цитокининов в контроле этого процесса весьма бедны. Данные по АБК более многочисленны, но этот гормон способствует увеличению отложения суберина [Wang et al., 2020; Akhiyarova et al., 2021], в то время как в наших экспериментах накопление этого гормона в корнях термоиндуцированных трансгенных растений сопровождалось снижением интенсивности окрашивания лигнина и суберина берберином. Этот же аргумент исключает возможность участия ауксина в контроле описываемого процесса. Хотя в отдельных случаях необходимость ауксин-опосредованных транскрипционных ответов для модификации

синтеза суберина показана [Ursache et al., 2021], его повышенная концентрация в корнях трансгенных растений, обработанных ТШ, вряд ли будет ответственна за более слабое развитие апопластных барьеров в боковых корнях.

В поисках механизма, ответственного за регуляцию процессов отложения лигнина и суберина в экзодерме боковых корней еще раз обратимся к цитокининам. Хотя роль цитокининов в контроле генов, участвующих в биосинтезе вторичных стенок корня, остается неясной [Didi et al., 2015], некоторые эксперименты показали их участие в уменьшении лигнификации эндотелия пыльника [Jung et al., 2008] и отложении суберина в поясах Каспари [Andersen et al., 2018]. Эти сведения в сочетании с нашими данными о более слабом отложении лигнина и суберина в экзодерме боковых корней термоиндуцированных трансгенных растений позволяют предположить связь повышенного уровня цитокининов с регуляцией формирования клеточной стенки растений.

Данные, полученные в настоящей работе, предполагают участие цитокининов в повышении гидравлической проводимости растений в дополнение к известным эффектам этих гормонов на поведение устьиц. Повышенное содержание цитокининов, вероятно, увеличивает гидравлическую проводимость за счет повышения активности аквапоринов и снижения образования апопластных барьеров. Одновременное влияние цитокининов как на устьичную, так и на гидравлическую проводимость позволяет координировать испарение воды листьями и ее поступление от корней к листьям, поддерживая тем самым водный баланс и гидратацию листа.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда грант № 21-14-00070.

Авторы выражают благодарность за предоставление возможности использования оборудования ЦКП «Агидель».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Akhiyarova G.R., Ivanov R.S., Ivanov I. I., Finkina E.I., Melnikova D.N., Bogdanov I.V., Nuzhnaya T., Ovchinnikova T.V., Veselov D.S., Kudoyarova G.R. Effects of salinity and abscisic acid on lipid transfer protein accumulation, suberin deposition and hydraulic conductance in pea roots // *Membranes*. 2021. V.11. P.762. DOI: <https://doi.org/10.3390/membranes11100762>
2. Andersen T.G., Naseer S., Ursache R., Wybouw B., Smet W., De Rybel B., Vermeer J. E. M., Geldner N. Diffusible repression of cytokinin signalling produces endodermal symmetry and passage cells // *Nature*. 2018. V. 555. P. 529–533. DOI: [10.1038/nature25976](https://doi.org/10.1038/nature25976)
3. Bunce J.A., Ziska L.H. Decreased hydraulic conductance in plants at elevated carbon dioxide // *Plant Cell Environ.* 1998. V. 21. P. 121–126. DOI: [10.1046/j.1365-3040.1998.00256.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00256.x)
4. Daszkowska-Golec A., Szarejko I. Open or close the gate – stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions // *Front. Plant Sci.* 2013. V. 4. P. 138. DOI: [10.3389/fpls.2013.00138](https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00138)
5. Didi V., Jackson P., Hejatko, J. Hormonal regulation of secondary cell wall formation // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 5015–27. DOI: [10.1093/jxb/erv222](https://doi.org/10.1093/jxb/erv222)
6. Hansen H., Dörffling K. Root-derived trans-zeatin riboside and abscisic acid in drought-stressed and rewatered sunflower plants: interaction in the control of leaf diffusive resistance? // *Funct. Plant Biol.* 2003. V. 30. P. 365–375. DOI: [10.1071/FP02223](https://doi.org/10.1071/FP02223)

7. Hao G.-Y., Holbrook N.M., Zwieniecki M.A., Gutschick V.P., BassiriRad H. Coordinated responses of plant hydraulic architecture with the reduction of stomatal conductance under elevated CO₂ concentration // *Tree Physiol.* 2018. V. 38. P. 1041-1052. DOI: [10.1093/treephys/tpy001](https://doi.org/10.1093/treephys/tpy001)
8. Gu J., Li Z., Mao Y., Struik P.C., Zhang H., Liu L., Wang Z., Yang J. Roles of nitrogen and cytokinin signals in root and shoot communications in maximizing of plant productivity and their agronomic applications // *Plant Sci.* 2018. V. 274. P. 320-331. DOI: [10.1016/j.plantsci.2018.06.010](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.06.010)
9. Ivanov V.B., Filin A.N. Cytokinins regulate root growth through its action on meristematic cell proliferation but not on the transition to differentiation // *Functional Plant Biology.* 2018. V. 45. P. 215–221. DOI: <https://doi.org/10.1071/FP16340>
10. Jung K.W., Oh S.I., Kim Y.Y., Yoo K.S., Cui M.H., Shin J.S. *Arabidopsis* histidine-containing phosphotransfer factor 4 (AHP4) negatively regulates secondary wall thickening of the anther endothecium during flowering // *Mol. Cells.* 2008. V. 25. P. 294—300.
11. Krouk, G. Hormones and nitrate: a two-way connection // *Plant Mol. Biol.* 2016. V. 91. P. 599-606. DOI: [10.1007/s11103-016-0463-x](https://doi.org/10.1007/s11103-016-0463-x)
12. Lardon R., Trinh H.K., Xu X., Vu L.D., Van De Cotte B., Pernisová M., Vanneste S., De Smet I., Geelen D. Histidine kinase inhibitors impair shoot regeneration in *Arabidopsis thaliana* via cytokinin signaling and SAM patterning determinants // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. P. 894208. DOI: [10.3389/fpls.2022.894208](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.894208)
13. Marchadier E., Hetherington A.M. Involvement of two-component signaling systems in the regulation of stomatal aperture by light in *Arabidopsis thaliana* // *New Phytol.* 2014. V. 203. P. 462-468. DOI: [10.1111/nph.12813](https://doi.org/10.1111/nph.12813)
14. Maurel C., Nacry P. Root architecture and hydraulics converge for acclimation to changing water availability // *Nat. Plants.* 2020. V. 6. P. 744-749. DOI: [10.1038/s41477-020-0684-5](https://doi.org/10.1038/s41477-020-0684-5)
15. Montanaro G., Briglia N., Lopez L., Amato D., Panara F., Petrozzac A., Cellini F., Nuzzo V. A synthetic cytokinin primes photosynthetic and growth response in grapevine under ion-independent salinity stress // *J. Plant Interact.* 2022. V. 17. P. 789–800. DOI: [10.1080/17429145.2022.2102259](https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2102259)
16. Li L., Pan S., Melzer R., Fricke W. Apoplastic barriers, aquaporin gene expression and root and cell hydraulic conductivity in phosphate-limited sheepgrass plants // *Physiol. Plant.* 2020. V. 168. P. 118-132. DOI: [10.1111/ppl.12981](https://doi.org/10.1111/ppl.12981)
17. Nguyen K.N., Ha C.V., Nishiyama R., Watanabe Y., Leyva-González M.A., Fujita Y., Tran U.T., Li W., Tanaka M., Seki M., Schaller G.E., Herrera-Estrella L., Tran L.S.P. *Arabidopsis* type B cytokinin response regulators ARR1, ARR10, and ARR12 negatively regulate plant responses to drought // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016. V. 113. P. 3090-5. DOI: [10.1073/pnas.1600399113](https://doi.org/10.1073/pnas.1600399113)
18. Raines T., Blakley I.C., Tsai Y.C., Worthen J.M., Franco-Zorrilla J.M., Solano R., Schaller G.E., Loraine A.E., Kieber J.J. Characterization of the cytokinin-responsive transcriptome in rice // *BMC Plant Biol.* 2016. V. 16. P. 260. DOI: [10.1186/s12870-016-0932-z](https://doi.org/10.1186/s12870-016-0932-z)
19. Rodríguez-Gamir J., Xue J., Clearwater M.J., Meason D.F., Clinton P.W., Domec J.C. Aquaporin regulation in roots controls plant hydraulic conductance, stomatal conductance, and leaf water potential in *Pinus radiata* under water stress // *Plant Cell Environ.* 2019. V. 42. P. 717-729. DOI: [10.1111/pce.13460](https://doi.org/10.1111/pce.13460)
20. Schmulling T., Beinsberger S., De Greef J., Schell J., Van Onkelen H., Spena A.I. Construction of a heat-inducible chimaeric gene to increase the cytokinin content in transgenic plant tissue // *FEBS Lett.* 1989. V. 249. P. 401-406. DOI: [10.1016/0014-5793\(89\)80667-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80667-2)
21. Simonin K.A., Limm E.B., Dawson T.E. Hydraulic conductance of leaves correlate with leaf lifespan: implications for lifetime carbon gain. // *New Phytol.* 2012. V. 193. P. 939–947. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2011.04014.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04014.x)

22. Song X.-G., She X.P., He J.-M., Huang C., Song T. Cytokinin- and auxin-induced stomatal opening involves a decrease in levels of hydrogen peroxide in guard cells of *Vicia faba* // *Funct. Plant Biol.* 2006. V. 33. P. 573–583. DOI: [10.1071/FP05232](https://doi.org/10.1071/FP05232)
23. Tanaka Y., Sano T., Tamaoki M., Nakajima N., Kondo N., Hasezawa S. Cytokinin and auxin inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by enhancing ethylene production in *Arabidopsis* // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. P. 2259-66. DOI: [10.1093/jxb/erj193](https://doi.org/10.1093/jxb/erj193)
24. Ursache R., De Jesus Vieira Teixeira C., Dénervaud Tendon V. et al. GDSL-domain proteins have key roles in suberin polymerization and degradation // *Nat. Plants.* 2021. V. 7. P. 353–364. DOI: [10.1038/s41477-021-00862-9](https://doi.org/10.1038/s41477-021-00862-9)
25. 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. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1992.tb01316.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb01316.x)
26. Veselova S.V., Farkhutdinov R.G., Veselov D.S., Kudoyarova G.R. Role of cytokinins in the regulation of stomatal conductance of wheat seedlings under conditions of rapidly changing local temperature // *Rus. J. Plant Physiol.* 2006. V. 53. P. 756-761. DOI: [10.1134/S1021443706060057](https://doi.org/10.1134/S1021443706060057)
27. Vitali V., Bellati J., Soto G., Ayub N.D., Amodeo G. Root hydraulic conductivity and adjustments in stomatal conductance: hydraulic strategy in response to salt stress in a halotolerant species // *AoB PLANTS.* 2015. V. 7. plv136. DOI: [10.1093/aobpla/plv136](https://doi.org/10.1093/aobpla/plv136)
28. 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.V. 9. P. 1722. DOI: [10.3390/plants9121722](https://doi.org/10.3390/plants9121722)
29. Vysotskaya L., Timergalina L., Akhiyarova G., Korobova A., Fedyaev V., Ivanov I., Kudoyarova G., Veselov D. Association of barley root elongation with ABA-dependent transport of cytokinins from roots and shoots under supra-optimal concentrations of nitrates and phosphates // *Cells.* 2021. V. 10. P. 11. DOI: [10.3390/cells10113110](https://doi.org/10.3390/cells10113110)
30. Vysotskaya L.B., Trekozova A.W., Kudoyarova G.R. Effect of phosphorus starvation on hormone content and growth of barley plants // *Acta Physiol. Plantarum.* 2016. V. 38. P. 108. DOI: [10.1007/s11738-016-2127-5](https://doi.org/10.1007/s11738-016-2127-5)
31. Vysotskaya L.B., Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R. Effect on shoot water relations, and cytokinin and abscisic acid levels of inducing expression of a gene coding for isopentenyltransferase in roots of transgenic tobacco plants // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. P. 3709-3717. DOI: [10.1093/jxb/erq182](https://doi.org/10.1093/jxb/erq182)
32. Wang C., Wang H., Li P., Li H., Xu C., Cohen H., Aharoni A., Wu S. Developmental programs interact with abscisic acid to coordinate root suberization in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2020. V. 104. P. 241-251. DOI: [10.1111/tpj.14920](https://doi.org/10.1111/tpj.14920)
33. Yang J., Li C., Kong D., Guo F., Wei H. Light-mediated signaling and metabolic changes coordinate stomatal opening and closure // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 601478. DOI: [10.3389/fpls.2020.601478](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.601478)
34. Zaqout S., Becker L.L., Kaindl A.M. Immunofluorescence staining of paraffin sections step by step // *Front. Neuroanat.* 2020. V. 14. P. 582218. DOI: [10.3389/fnana.2020.582218](https://doi.org/10.3389/fnana.2020.582218)

Цитировать как

Иванов Р.С., Ахиярова Г.Р., Сельдимирова О.А., Галин И.Р., Высоцкая Л.Б., Кудоярова Г.Р. Гидравлическая проводимость, формирование апопластных барьеров и активность аквапоринов у трансгенных растений табака с индуцированным накоплением цитокининов // *Экобиотех*, 2022, Т. 5 (4). С. 175-186. DOI: [10.31163/2618-964X-2022-5-4-175-186](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2022-5-4-175-186), EDN: GVVVPN

Cited as

Ivanov R.S., Akhiyarova G.R., Seldimirova O.A., Galin I.R., Vysotskaya L.B., Kudoyarova G.R. Hydraulic conductivity, apoplast barriers formation, and aquaporin activity in transgenic tobacco plants with induced cytokinin accumulation. *Ekobiotech.* V. 5 (4). P. 175-186. DOI: [10.31163/2618-964X-2022-5-4-175-186](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2022-5-4-175-186), EDN: GVVVPN (In Rus.)