

УДК 581.1

ОСМОТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ, КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНИНОВ И РОСТ КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ ТАБАКА ПРИ ДЕФИЦИТЕ ВОДЫ, ВЫЗВАННОМ ЛОКАЛЬНЫМ ТЕПЛОВЫМ ШОКОМ

© Л.Б. Высоцкая, Г.Р. Кудоярова

Изучена роль цитокининов в поддержании роста корней за счет накопления в них осмотически активных веществ у растений табака. Накопление цитокининов индуцировали нагреванием корней *ipt* трансгенных растений, которое сопровождалось большей скоростью потери воды листьями. В течение 5 суток после каждого такого воздействия в листьях снижалось относительное содержание воды, рост их замедлялся, а масса корней сохранялась на уровне контрольных растений. Соотношение масс побег/корень также уменьшалось и у нетрансформированных растений (SR) табака. У растений обоих генотипов содержание осмотиков поддерживалось на уровне контроля, в то время как уровень цитокининов достоверно возрастал лишь у трансгенных растений. Следовательно, поддержание притока ассимилятов и накопление осмотиков на уровне контроля при дефиците воды, вызванном нагреванием корней, не связано с накоплением в корнях цитокининов.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, дефицит воды, осмотический потенциал, рост корней, цитокинины.

Поддержание роста корней на фоне снижения скорости роста листьев – одна из наиболее характерных реакций на дефицит воды [1]. Считается, что она обеспечивает оптимизацию водного обмена за счет ограничения транспирации и повышения способности корней поглощать воду. В литературе довольно широко обсуждается приспособительное значение этой реакции и перспективность отбора засухоустойчивых растений по длине и массе их корней [2–3]. Вместе с тем гораздо меньше экспериментальных работ, в которых бы изучались механизмы, способствующие поддержанию роста корней при дефиците воды. Один из таких механизмов заключается в накоплении в клетках осмотически активных веществ, что способствует повышению способности клеток поглощать воду и расти за счет растяжения. Нельзя не отметить, что число работ, в которых обсуждается этот механизм, значительно превосходит количество экспериментальных исследований. Часто цитируется работа Р. Шарпа с коллегами [4], которые показали связь накопления осмотиков в корнях при дефиците воды с по-

вышением уровня фитогормона абсцизовой кислоты (АБК). Также можно встретить данные о стимуляции накопления осмотически активных веществ при дефиците воды под влиянием цитокининов. Так, было показано, что индукция экспрессии *ipt*-гена (*ipt*-ген контролирует синтез фермента изопентенилтрансферазы, катализирующей синтез цитокининов) у трансгенных растений *Agrostis stolonifera* (полевица побегообразующая) повышала накопление осмотически активных веществ в листьях на фоне засухи [5]. Мы использовали этот же подход (индукцию экспрессии *ipt*-гена) для выявления возможной роли цитокининов при дефиците воды в поддержании роста корней за счет накопления осмотически активных веществ.

Материалы и методы исследований.

Семена табака (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR-1) и его трансформированной формы (*ipt*) получены, как было описано ранее [6]. Использовали растения одной трансгенной линии, у которой экспрессия гена IPT запускалась промотормом, чувствительным к теп-

ловому шоку [6]. Семена проращивали в темноте при 27°C на влажной фильтровальной бумаге в течение семи дней. Затем растения табака выращивали в отдельных сосудах с песком при 14-часовом световом дне, освещенности 16-18 клк (используя лампы ДРЛФ-400 и ДНАТ-400) и температуре 26/18°C. Ежедневно осуществляли полив, поддерживая влажность почвы 60–70% от полной влагоемкости. Ежедневно всем растениям давали корневую подкормку в виде равных объемов 100% раствора Хогланда-Арнона. Локальную термообработку корней продолжительностью 1 ч проводили один раз в сутки в одно и то же время в течение 5 дней. Нагрев до 40°C осуществляли, используя водяную баню (отсчет времени инкубации начинался с момента достижения температуры песчаной почвы 40°C). Для предотвращения нагревания водяными парами воздуха и листьев нижних ярусов растений табака открытую поверхность воды в бане изолировали фольгой. В качестве контроля служили растения, которые находились в тех же условиях произрастания, но не подвергались нагреванию. В конце эксперимента определяли сырую массу побегов и корней. Содержание гормонов определяли в корнях контрольных и опытных растений через час после применения теплового шока. Для экстракции гормонов из растительного материала использовали 80%-й этанол [7]. Определение содержания фитогормонов: цитокининов (зеатин, зеатинрибозид, зеатиннуклеотид) проводили с помощью иммуноферментного анализа [8].

Транспирацию оценивали гравиметрически – по потере веса сосудами с растениями. Стаканчик закрывали алюминиевой фольгой с отверстием для проростков для предотвращения испарения воды с поверхности питательного раствора. Массу стаканчиков определяли каждые 30 мин и по разнице в весе судили об интенсивности транспирации.

Осмотический потенциал сока из корней определяли по точке замерзания с помощью осмометра (Camlab Limited, Cambridge, UK).

Для определения относительного содержания воды сформированные листья взвешивали

и погружали основанием в дистиллированную воду, налитую в стеклянный сосуд, который затем закрывали крышкой для насыщения воздуха влагой и помещали в темноту на ночь. Листья взвешивали для определения тургорной массы, высушивали и рассчитывали относительное содержание воды (ОСВ) по формуле: $ОСВ = (сырая\ масса - сухая\ масса) / (тургорная\ масса - сухая\ масса)$.

Результаты и их обсуждение. Как видно из рис. 1, локальный прогрев корней вызывал повышение транспирации, что, скорее всего, было связано с повышением при данном воздействии притока из корней в листья цитокининов [9], способных поддерживать устьица в открытом состоянии [7]. Повышенный уровень транспирации сохранялся в течение двух часов после воздействия теплового шока (ТШ).

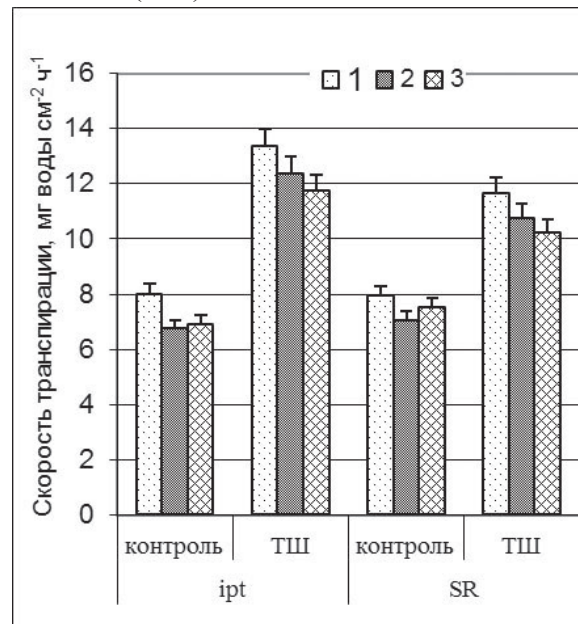


Рис. 1. Транспирация трансгенных (*ipt*) и нетрансформированных (SR) контрольных и подвергнутых локальному тепловому шоку (ТШ) растений через 15 (1), 60 (2) и 120 (3) мин после прекращения воздействия ТШ

Через 3 ч было зарегистрировано снижение относительного содержания воды в листьях растений (рис. 2), что указывало на дефицит воды в листе, вызванный несбалансированностью притока воды из корней и повышенными транспирационными потерями. В результате ежедневного (в течение 5 дней)

воздействия теплового шока, приведившего к снижению ОСВ и дефициту воды, наблюдалось снижение массы побега по сравнению с контрольными растениями. При этом вызванный тепловым шоком дефицит воды в листе не приводил к достоверному изменению массы корней (табл. 1). Ингибирование накопления массы побега и поддержание этого процесса в корнях наблюдалось как у трансгенных, так и нетрансформированных растений. В результате у растений обоих генотипов была зарегистрирована типичная реакция на дефицит воды: снижение соотношения массы побега и корня.

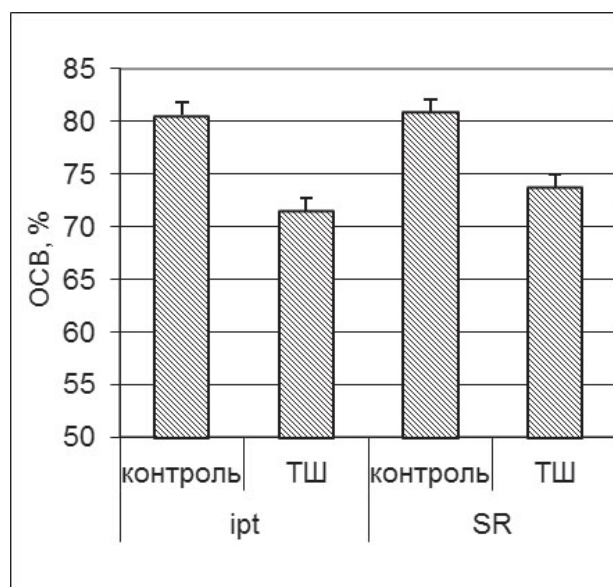


Рис. 2. Относительное содержание воды (ОСВ) трансгенных (*ipt*) и нетрансформированных (SR) контрольных и подвергнутых локальному тепловому шоку (ТШ) растений через 3 ч после прекращения воздействия ТШ

Т а б л и ц а 1

Масса побега и корней (*г*) трансгенных (*ipt*) и нетрансформированных растений (SR) через 5 дней после ежедневного воздействия локального теплового шока (ТШ)

Генотип	Воздействие	Побег	Корень	Побег/Корень
<i>ipt</i>	Контроль	5,4 ^а	1,59 ^а	3,40 ^а
	ТШ	4,7 ^б	1,67 ^а	2,85 ^б
SR	Контроль	5,5 ^а	1,61 ^а	3,40 ^а
	ТШ	4,3 ^б	1,54 ^а	2,77 ^б

Примечание. Статистические различающиеся средние значения в колонках обозначены разными буквами (двухфакторный дисперсионный анализ, $p \leq 0,05$).

Принимая во внимание данные литературы о роли осмотической регуляции в поддержании роста корней при дефиците воды [10–12], важно было оценить влияние теплового шока на содержание осмотически активных веществ. Из рис. 3 видно, что их концентрация была одинаковой у растений обоих генотипов и не менялась под влиянием теплового шока. Из этих результатов очевидно, что поддержание накопления массы корней при действии локального теплового шока не было связано с накоплением осмотиков.

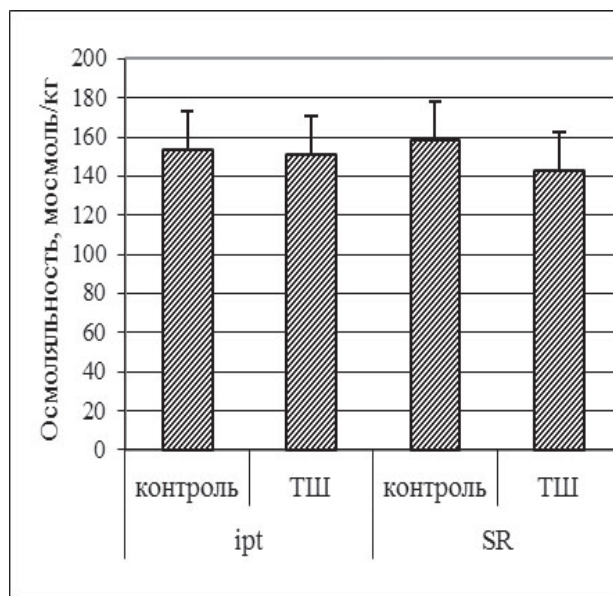


Рис. 3. Осмоляльность клеточного сока корней контрольных и через 2 ч после второго воздействия теплового шока (ТШ) трансгенных (*ipt*) и нетрансформированных (SR) растений табака

Эти результаты не соответствуют данным Sharp R. с соавторами [12], которые показали роль осмотической регуляции в поддержании роста корней при дефиците воды в питательной среде. В наших опытах дефицита воды в среде корнеобитания не было. Хотя повышение транспирационного запроса должно было снизить доступность воды для поддержания роста корней, вероятно, в этих условиях не требовалось повышения концентрации осмотиков в корнях для поддержания их роста, и достаточно было сохранения их уровня неизменным по сравнению с контролем. Вместе с тем в условиях, когда тепловой

шок снижал общий уровень накопления массы растений (на 10% – у трансгенных и на 20% – у нетрансформированных растений), необходимо было перераспределение ассимилятов из побега в корни для поддержания неизменного уровня осмотиков и роста корней. Такую функцию могли бы выполнять цитокинины. Так было показано усиление притока ассимилятов в обработанную цитокинами часть листа [13]. При локальном воздействии теплового шока нами ранее было зареестрировано повышение содержания цитокининов в листьях как трансгенных, так и нетрансформированных растений табака (выраженное в большей степени у трансгенных растений) [9]. Представляло интерес выявить изменение содержания цитокининов в корнях растений. Из рис. 4 видно, что при локальном тепловом шоке возрастало содержание цитокининов в корнях трансгенных растений и достоверно не менялось их содержание у нетрансформированных.

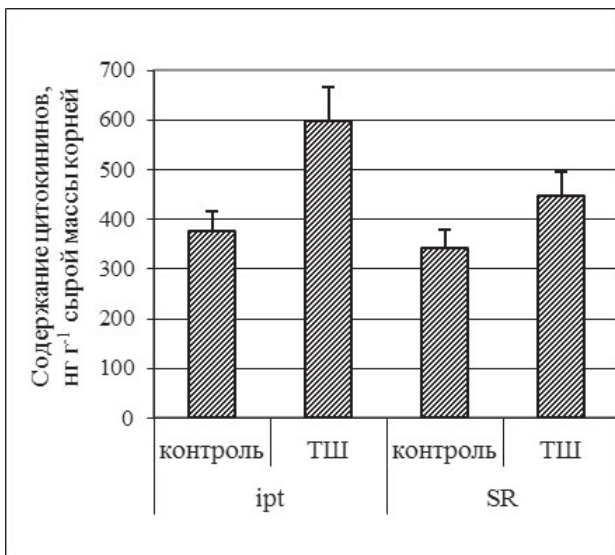


Рис. 4. Содержание цитокининов (Z+ZR+ZN) в корнях контрольных и через 1ч после воздействия теплового шока (ТШ) трансгенных (*ipt*) и нетрансформированных (SR) растений табака

Таким образом, измерение уровня цитокининов в корнях не подтвердило предположения об участии этих гормонов в поддержании притока ассимилятов и поддержания осмотиков на уровне контроля при дефиците воды, вызванном локальным тепловым шо-

ком. Содержание осмотиков поддерживалось на уровне контроля у растений обоих генотипов, в то время как уровень цитокининов достоверно возрастал лишь у трансгенных растений.

Полученные нами результаты также не соответствуют данным о том, что индукция экспрессии *ipt*-гена приводила к повышению уровня осмотически активных веществ в листе при дефиците воды и тем самым повышала засухоустойчивость растений [5]. В наших опытах повышенный уровень цитокининов в корнях трансгенных растений не приводил к повышению уровня осмотически активных веществ. Не исключено, что этот эффект тканеспецифичен и связан со способностью цитокининов влиять на уровень фотосинтеза в листьях [14].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 120401111.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кудоярова Г.Р., Холодова В.П., Веселов Д.С. Современное состояние проблемы водного баланса растений при дефиците воды // Физиология растений. 2013. Т. 60. С. 155–165.
2. Collins N.C., Tardieu F., Tuberosa R. Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: Where do we stand? // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 469–486.
3. Fischer R.A.T., Edmeades G.O. Breeding and cereal yield progress // Crop Science. 2010. V. 50. P. 85–98.
4. Saab I.N., Sharp R.E., Pritchard J., Voetberg G.S. Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials // Plant Physiol. 1990. V. 93. P. 1329–1336.
5. Merewitz E.B., Du.H., Yu.W., Liu Y., Gianfagna T., Huang B. Elevated cytokinin content in *ipt* transgenic creeping bentgrass promotes drought tolerance through regulating metabolite accumulation // J. Exp. Bot. 2012. 63. № 3. С. 1315–1328.
6. Schmulling T., Beinsberger S., De Greef J., Shell J., Van Onckelen H., Spena A. Construction of a

heat-inducible chimaeric gene to increase the cytokinin content in transgenic plant tissue // FEBS Lett. 1989. V. 249. P. 401–406.

7. Vysotskaya L.B., Kudoyarova G.R., Veselov S., Jones H.G. Unusual Stomatal Behaviour on Partial Root Excision in Wheat Seedlings // Plant Cell Environ. 2004. V. 27. P. 69–77.

8. Веселов С.Ю. Использование антител для количественного определения, очистки и локализации регуляторов роста растений. Уфа: Изд-во Башкирского ун-та, 1998. 138 с.

9. 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, № 13. P. 3709–3717.

10. Richards R.A., Rebetzke G.J., Condon A.G., van Herwaarden A.F. Breeding opportunities for

increasing the efficiency of water use and crop yield in temperate cereals. Crop Sci. 2002. V. 42. P. 111–121.

11. Sinclair, T.R., Purcell L. C. Is a physiological perspective relevant in a genocentric age? // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 2777–2782.

12. Sharp R.E., Poroyko V., Hejlek L.G., Spollen W.G., Springer G.K., Bohnert H.J., Nguyen H.T. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics // J. Exp. Bot. V. 55. P. 2343–2351.

13. Роньжина Е.С. Структурные и функциональные перестройки мезофилла как возможная причина цитокинин-зависимого транспорта веществ в изолированных листьях // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 373–382.

14. Cerny M., Dycka F., Bobál'ová J., Brzobohaty B. Early cytokinin response proteins and phosphoproteins of *Arabidopsis thaliana* identified by proteome and phosphoproteome profiling // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. P. 921–937.

OSMOTIC POTENTIAL, CYTOKININ CONCENTRATION AND ROOT GROWTH OF TOBACCO PLANTS UNDER WATER DEFICIENCY PROVOKED BY LOCAL HEAT SHOCK

© L.B. Vysotskaya, G.R. Kudoyarova

Institute of Biology, Ufa Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

Our study reveals the role of cytokinins in maintaining root growth through accumulation of osmotically active substances. The accumulation of cytokinins was induced by heating of roots of *ipt* transgenic plants accompanied by greater loss of water through leaves. Within 5 days after each such treatment, the relative water content in leaves decreased, their growth was slowed down, and the mass of roots remained similar to control plants. The shoot/root ratio of non-transformed SR tobacco plants decreased as well. In the plants of both genotypes, the osmotic substances content did not differ from that in the control group, whereas the cytokinin level increased reliably only in the transgenic plants. Therefore, maintenance of assimilate flow and accumulation of osmotic substances at the control level under water deficiency provoked by root heating is not due to the accumulation of cytokinins.

Key words: *Nicotiana tabacum*, water deficiency, root growth, osmotic potential, cytokinins.