

ВЛИЯНИЕ ЛОКАЛЬНОЙ ИНДУКЦИИ ГЕНА *ipt* В КОРНЯХ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНИНОВ В КЛЕТКАХ ЛИСТЬЕВ ТАБАКА

© Л. Б. Высоцкая,^{1,*} Г. Р. Ахиярова,¹ Г. В. Шарипова,¹ М. А. Дедова,¹
С. Ю. Веселов,² Д. Ю. Зайцев,¹ Г. Р. Кудоярова¹

¹Институт биологии Уфимского научного центра РАН и

²Башкирский государственный университет, Уфа;

* электронный адрес: Vysotskaya@anrb.ru

Выявлению цитокининов в дифференцированных клетках листьев уделялось мало внимания. Мы провели иммунохимическое окрашивание цитокининов в листьях трансгенных растений табака, в которых содержание цитокининов возрастало в результате индукции в корнях экспрессии гена *ipt*, контролирующего синтез цитокининов. Окрашивание на цитокинины, основанное на использовании антител к зэатинрибозиду, было характерно для клеток мезофилла. Метка была локализована в цитоплазме, прилегающей к клеточной стенке, и практически отсутствовала в вакуолях. Хлоропласты были хорошо видны благодаря концентрированию метки в цитоплазме вокруг них. Иммуногистохимическое окрашивание также выявило присутствие цитокининов в устьичных клетках. Индукция синтеза цитокининов усиливала иммунохимическое окрашивание как клеток мезофилла, так и устьичных клеток, что сопровождалось повышением устьичной проводимости. Обсуждаются возможность прямого влияния на устьичную проводимость цитокининов, накапливающихся непосредственно в устьичных клетках, и опосредованное влияние через фотосинтез в клетках мезофилла.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, цитокинины, иммунолокализация, устьичная проводимость.

Известно, что цитокинины участвуют в регуляции жизненно важных процессов у растений. Они были идентифицированы как факторы, стимулирующие деление клеток каллуса *in vitro* (Skoog, Miller, 1957). Поэтому иммуногистохимический анализ цитокининов с помощью специфических антител применялся прежде всего для их выявления в меристематических клетках: в развивающихся зародышах (Rijavec et al., 2011), в апексах побега (Corbesier et al., 2003) и в специализированных выводковых почках в пазухах листьев (Chiappetta et al., 2006). Тканям дифференцированных листьев в этом плане уделялось мало внимания, несмотря на известную способность цитокининов влиять на происходящие в них процессы, например фотосинтез (Чернядьев, 2000) и движение устьиц (Davies et al., 2005). Однако влияние цитокининов на эти функции изучено с помощью биохимических и физиологических, но не цитологических подходов. При этом повышение уровня цитокининов является первым и одним из наиболее важных звеньев в цепи трансдукции цитокининового сигнала. Обнаружение рецепторов к цитокинину на клеточных мембранах и их способности связывать цитокинины, находящиеся в апопласте (Naberger, Keiber, 2002), казалось бы, указывает на то, что накопление цитокининов внутри клеток не представляет интереса. Однако недавние исследования показали присутствие рецепторов цитокининов в эндоплазматическом ретикулуме (Wulfetange et al., 2011), а цитокининсвязывающих белков — в цитоплазме клеток

(Brovko et al., 2007), что указывает на важность накопления этих цитокининов внутри клеток растений.

Цель данной работы состояла в выявлении цитокининов в клетках дифференцированного листа с помощью антител к цитокинину. Представляло интерес проследить изменение интенсивности иммуногистохимического окрашивания клеток с помощью специфических антител при повышении содержания цитокининов в листьях и попытаться выявить их функциональное значение. Для этого мы использовали *HSIPT*-трансгенные растения табака, у которых экспрессия гена изопентенилтрансферазы, контролирующего синтез цитокининов, индуцируется тепловым шоком (Schmulling et al., 1989). Поскольку известно, что цитокинины, синтезируемые в корнях, поступают в побег (Davies et al., 2005), можно было ожидать повышение их уровня в клетках листьев.

Материал и методика

Исследования проводили на трансгенных растениях табака *Nicotiana tabacum* L. Трансгенная линия *HSIPT* была получена путем трансформации растений сорта Petit Havana *SR-1* бактериальным геном *ipt*, находящимся под контролем промотора белка теплового шока *Hsp70 Drosophila melanogaster* (Schmulling et al., 1989).

Семена трансформированных и нетрансформированных растений табака проращивали в лотках с хорошо

увлажненной почвой в темноте в течение 7 сут. Проростки с одним настоящим листом пересаживали в горшки с песчано-почвенной смесью (1 : 2) и выращивали при 14-часовом фотопериоде, освещенности 400—500 мкмоль м⁻²·с⁻¹ фотосинтетически активной радиации (ФАР) (лампы ZN-500 и DNAT-400) и температурах 24 °С днем и 18 °С ночью. Растения поливали дважды в день. Во время утреннего полива проводили подкормку растений. В горшки вносили 5 мл 50%-ного раствора Хогланда-Арнона и добавляли по весу воду для поддержания влажности почвы 60 % от полной влагоемкости. Температурное воздействие на растения табака начинали с момента появления 9—10-го листа. Для того чтобы исключить прямое влияние повышенной температуры на процессы, которые происходят в листе, индукцию гена *ipt* проводили локально, нагревая только корни, как описано ранее (Vysotskaya et al., 2010). Корни растений прямо в горшках с почвенной смесью нагревали в течение 1 ч при 40 °С, используя водяную баню (отсчет времени инкубации начинали с момента достижения температуры почвы 40 °С). Для предотвращения нагревания водяными парами воздуха и листьев нижних ярусов растений табака открытую поверхность воды в бане изолировали фольгой. Повышение температуры у поверхности листьев нижнего яруса составило не более 2 °С.

Устьичную проводимость листьев измеряли при помощи порометра (Mk3, Delta-T Devices, Великобритания). Осмоляльность экссудата 10-го листа определяли с помощью осмометра Osmomat 030 (Германия) через 1 и 2 ч после индукции теплового шока. Предварительную калибровку прибора проводили по дистиллированной воде и стандартным раствором NaCl в концентрации 300 мосмоль.

Для определения содержания цитокининов в тканях растительный материал гомогенизировали и экстрагировали 80%-ным этанолом. Спиртовой экстракт отделяли центрифугированием и упаривали до водного остатка (Kudoyarova et al., 2007). Цитокинины, содержащиеся в аликвоте водного остатка, концентрировали на картридже C-18 (Bond-Elut, RP-C18). Картридж C-18 уравнивали дистиллированной водой. Водный остаток, предварительно осветленный центрифугированием, наносили на картридж, который затем промывали 10 мл дистиллированной воды. Цитокинины элюировали 80%-ным спиртом, который упаривали досуха и, растворив в 0.02 мл 80%-ного спирта, наносили на силиколовую пластину для тонкослойной хроматографии (Merck 50×200×0.25 мм силикагеля 60 F-254). Разделение цитокининов проводили в системе растворителей бутанол—аммиак—вода (6 : 1 : 2). После детекции в УФ-свете положения метчиков зеатина, дигидрозеатина, изопентениладенина и их рибозидов содержащее зон элюировали 0.1 М фосфатным буфером (ФБ), pH 7.4. После удаления силикагеля путем центрифугирования в надосадочной жидкости определяли содержание цитокининов с помощью твердофазного иммуноферментного анализа, используя антитела к зеатинрибозиду, которые имеют высокую специфичность к производным зеатина (рибозиду и нуклеотиду зеатина) (Веселов и др., 1999; Высоцкая и др., 2011).

Достоверность результатов, полученных с помощью иммуноферментного анализа, подтверждали путем сопоставления с данными хромато-масс-спектрометрии (Веселов и др., 1999; Arkhipova et al., 2007; Kudoyarova et al., 2014). В таблицах представлено содержание суммы зеатина, его рибозидов и нуклеотида.

Иммуногистохимическое выявление цитокининов на срезах листьев проводили следующим образом. Сегменты апикальной части 10-го листа размером 3×7 мм фиксировали в течение 24 ч в растворе 4%-ного параформальдегида (Riedel de Haen, Германия) и 0.1 %-ного глутарового альдегида (Sigma, Германия), приготовленном на ФБ. На следующем этапе образцы отмывали 1 ч в ФБ. Дегидратацию образцов проводили в серии разведений этанола (20, 30, 50, 60, 70, 80 и 96 %), выдерживая по 30 мин в каждом разведении. Затем образцы заливали в метакрилатную смолу JB4 (Electron Microscopy Sciences, США). Срезы толщиной 1.5 мкм получали с помощью ротационного микротомы (HM 325, MICROM Laborgerate, Германия). Иммуногистохимическое выявление цитокининов проводили, как описано ранее (Веселов и др., 1999; Kudoyarova et al., 2014), с помощью тех же антител против рибозидов зеатина, которые использовали для иммуноферментного анализа. На срезы наносили по 50 мкл раствора 0.1 М ФБ, содержащего 0.2 % желатина и 0.05 % Tween-20 (ФЖТ), и выдерживали в течение 30 мин во влажной камере. Разведения сыворотки кролика и вторичных антител, меченных коллоидным золотом, готовили на ФЖТ. На следующем этапе срезы промывали дистиллированной водой, часть срезов инкубировали с иммунной сывороткой кролика, содержащей антитела к цитокининам (в разведении 1 : 80), и помещали во влажную камеру на 2 ч. В качестве контроля служили образцы тканей, обработанные неиммунной сывороткой кролика (в разведении 1 : 80). Для выявления антител, связавшихся с зеатином, срезы инкубировали с мечеными коллоидным золотом антителами козы против иммуноглобулинов кролика (Aurion, США) (в разведении 1 : 40) в течение 1 ч во влажной камере. После 3-кратной промывки раствором ФБ, содержащим 0.05 % Tween-20 (ФТ), проводили постфиксацию тканей раствором 2%-ного глутарового альдегида (Sigma, Германия), приготовленном на ФБ. На следующем этапе срезы инкубировали с серебряным усилителем (Aurion, США) в течение 20—30 мин, развитие окраски наблюдали с помощью светового микроскопа. Срезы промывали дистиллированной водой. После этого препараты окрашивали рутением красным (Gutierrez-Gonzalvez et al., 1984) и заключали в смолу Eukitt (Sigma, Германия). Сканирование препаратов проводили с помощью лазерного конфокального микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия) при длине волны в режиме отражения 561 нм (канал проходящего света T-PMТ).

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) проводили по данным 3 независимых экспериментов по 5 биологических повторений в каждом, используя Analysis Toolpack (Microsoft Office Excel, Microsoft, США).

Результаты

Для того чтобы выбрать листья с наиболее высоким уровнем поступления цитокининов из корней с транспирационным потоком, была измерена устьичная проводимость листьев разных ярусов. Эти результаты были также важны для проверки предполагаемой связи накопления цитокининов в клетках листа с устьичной проводимостью. Время измерения устьичной проводимости и содержания цитокининов было выбрано с учетом результатов, полученных ранее (Vysotskaya et al., 2010). Поскольку в цитируемой работе показано, что реакция растений была наиболее яркой через 1 ч после термоиндуцирова-

Таблица 1

Устьичная проводимость ($\text{ммоль м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) разных листьев трансгенных растений табака (линии *HSIPT*) через 1 ч после нагревания корней при 40 °С в течение 1 ч

Номер листа от основания побега	Контроль (без нагрева)	Нагревание корней
3	45 ± 5 ^a	62 ± 7 ^a
6	98 ± 7 ^b	112 ± 13 ^b
9	156 ± 12 ^b	321 ± 41 ^г
10	172 ± 11 ^b	385 ± 36 ^г

Примечание. Измерения проводили в разных частях каждого листа (апекс и центральная часть), число листьев каждого яруса (n) составляет 10. Статистически различающиеся значения при $P < 0.05$ обозначены разными буквенными индексами (^{a–г}).

Таблица 2

Содержание цитокининов (нг на 1 г сырой массы) в разных листьях трансгенных растений табака (*HSIPT*) через 1 ч после нагревания корней при 40 °С в течение 1 ч

Номер листа от основания побега	Контроль	Нагревание корней
3	71 ± 9 ^a	110 ± 9 ^{a, б}
6	92 ± 8 ^a	124 ± 13 ^{a, б}
9	164 ± 15 ^b	356 ± 29 ^b
10	198 ± 22 ^b	411 ± 38 ^b

Примечание. n = 5; остальные объяснения те же, что и к табл. 1.

ния гена *ipt* и нивелировалась позднее из-за снижения оводненности тканей растений, в настоящей работе устьичную проводимость и количественное содержание цитокининов определяли через 1 ч после прекращения прогревания корней. Устьичная проводимость верхних листьев была выше, чем у листьев нижнего яруса, как у контрольных растений, так и у растений, которых подвергали воздействию теплового шока (табл. 1). Нагревание корней приводило к повышению устьичной проводимости, которое было более выражено у листьев верхнего яруса. Концентрация осмотиков в листьях растений после нагревания корней не отличалась от контроля через 1 ч, но была выше через 2 ч после воздействия (рис. 1).

Измерение содержания цитокининов в листьях показало, что индуцированное тепловым шоком накопление цитокининов было выше в верхних листьях (табл. 2). Эти результаты согласуются с полученными ранее данными (Веселов и др., 1999; Vysotskaya et al., 2010). Поскольку термоиндуцированные изменения в содержании цитокининов и устьичной проводимости были наиболее выраженными в листьях верхнего яруса, именно эти листья были выбраны для изучения иммулокализации цитокининов. Для анализа использовали кусочки листа из его апикальной части, которая, по нашим данным, характеризовалась более высокой устьичной проводимостью по сравнению с основанием (197 ± 7 и 149 ± 6 $\text{ммоль м}^{-2} \cdot \text{с}^{-2}$ соответственно).

Листья имели хорошо развитые палисадную и губчатую ткани, клетки которых содержали большое число

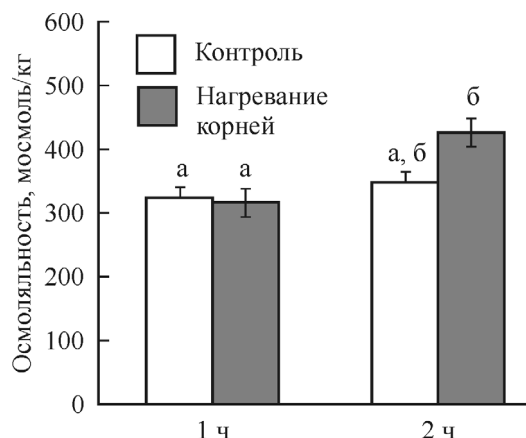


Рис. 1. Осмоляльность клеточного сока 10-го листа *HSIPT*-трансгенных растений табака через 1 и 2 ч после нагревания корней при 40 °С в течение 1 ч.

Контроль — растения без термообработки. Статистически различающиеся значения обозначены разными буквами, n = 6 ($P < 0.05$, ANOVA, LSD-test).

хлоропластов. Присутствие и распределение цитокининов в листьях трансгенных растений изучали путем иммуногистохимического окрашивания срезов с помощью антител к зеатинрибозиду (рис. 2). Окрашивания структур не выявлено при использовании неиммунной сыворотки (данные не показаны). На срезах листьев без теплового шока иммуноное окрашивание цитокининов было характерно для клеток мезофилла (рис. 2, a). При этом присутствие цитокининов было выявлено в цитоплазме и практически не проявлялось в вакуолях (рис. 2, a). Заметно интенсивное окрашивание клеточных стенок ксилемных сосудов (рис. 2, a). Цитокинин выявлялся также в клетках нижней эпидермы листа и устьичных клетках (рис. 2, a, d). Хлоропласты хорошо видны благодаря концентрированию метки в цитоплазме вокруг них, что наиболее ярко было выражено на срезах после термоиндукции растений (рис. 2, a–e). Нагревание корней приводило к усилению иммуногистохимического окрашивания цитокининов в клетках листа, что было характерно как для клеток мезофилла, так и для устьиц (рис. 2, б–e).

Обсуждение

Повышение суммарного содержания цитокининов в листьях трансгенных растений, обусловленное тепловой индукцией экспрессии гена *ipt* (табл. 2), согласуется с ранее полученными в нашей лаборатории результатами (Vysotskaya et al., 2010). В данной работе важно было выявить особенности накопления цитокининов в клетках дифференцированного листа. Иммуногистохимический анализ показал большой фон метки на цитокинины в клетках термоиндуцированных листьев (рис. 2, a, б), что соответствовало результатам их количественного иммуноанализа (табл. 2). Присутствие цитокининов в клетках мезофилла, обнаруженное в нашей работе с помощью антител против цитокининов (рис. 2), соответствует данным об участии этих гормонов в регуляции фотосинтеза (Чернядьев, 2000). Кроме окрашивания клеток мезофилла представляет интерес выявленное с помощью антител присутствие цитокининов в устьичных клетках (рис. 2, e, d). Важно то, что под влиянием прогревания корней па-

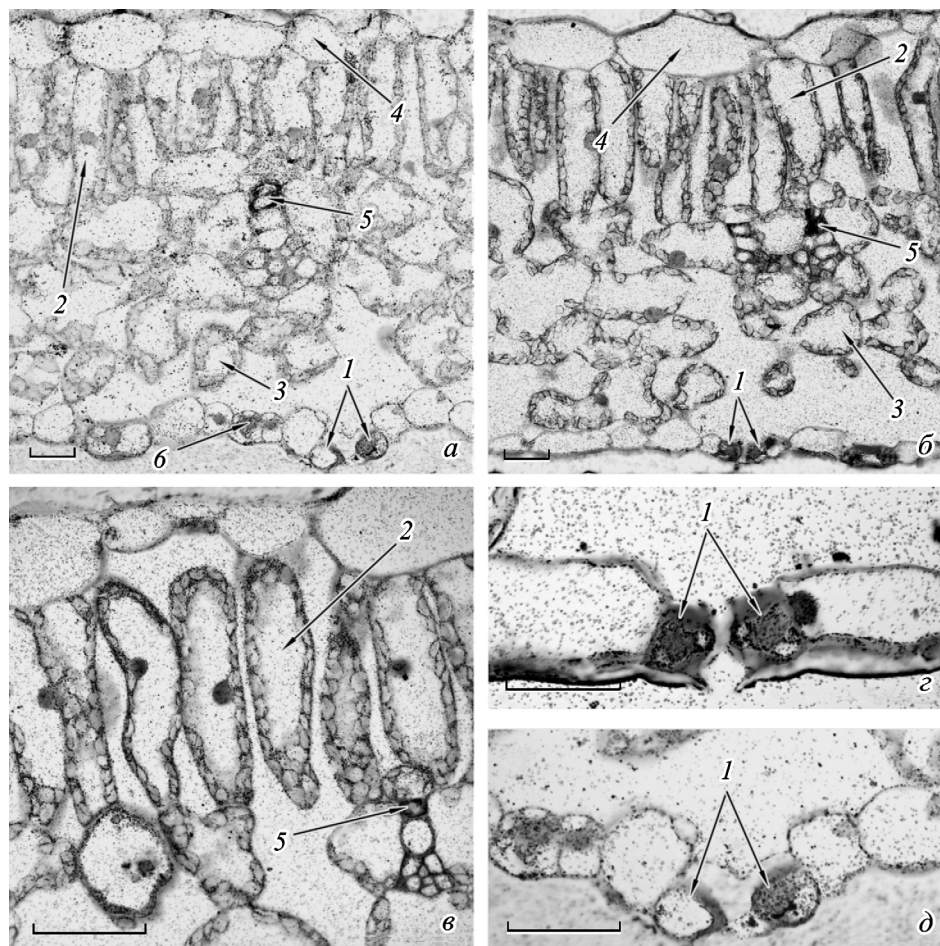


Рис. 2. Иммулокализация цитокининов (1—6) в апикальной части 10-го листа контрольных (а, д) и термоиндуцированных (б, в, з) трансгенных растений табака.

Срезы инкубировали с сывороткой, содержащей антитела к цитокининам. 1 — замыкающие клетки устьиц, 2 — палисадный мезофилл, 3 — губчатый мезофилл, 4 — верхний эпидермис, 5 — ксилема, 6 — нижний эпидермис. Цитокининов не выявлено в клетках верхнего эпидермиса (а, б). Масштабные отрезки — 20 мкм.

раллельно с усилением окрашивания устьиц на цитокинины повышалась устьичная проводимость. Известно, что цитокинины способны влиять на устьичную проводимость, поддерживая устьица в открытом состоянии (Davies et al., 2005). Однако механизму действия цитокининов на устьица уделялось несравненно меньше внимания, чем абсцизовой кислоте (АБК).

Ранее было показано накопление АБК в листьях растений при засолении, что сопровождалось закрытием устьиц (Ахиярова и др., 2006). Эти результаты соответствуют многочисленным данным о прямом влиянии АБК на устьичные клетки. Интенсивное иммунное окрашивание замыкающих клеток (рис. 2, в, з), обусловленное индукцией гена *ipt* в корнях, наблюдали одновременно с повышением устьичной проводимости (табл. 1), что позволяет предположить прямое влияние цитокининов на устьица. Известно, что для работы устьиц необходимо осмотическое приспособление, направленное на поддержание тургора (Zhang et al., 1999). По данным литературы, экспрессия гена *ipt* повышала устойчивость газонной травы к водному стрессу через осмотическое приспособление (Merewitz et al., 2011). Мы также зафиксировали возрастание осмоляльности экссудата тканей листа термоиндуцированных растений (рис. 1). Однако этот эффект на-

блюдался позднее, чем повышение устьичной проводимости, и накопление осмотиков, скорее всего, было следствием повышения уровня фотосинтеза в листьях с более высокой устьичной проводимостью, а не причиной изменения их проводимости.

Поскольку, как указывалось выше, цитокинины могут способствовать повышению интенсивности фотосинтеза (Чернядьев, 2000), его активация под влиянием повышенного уровня цитокининов у термоиндуцированных растений должна была привести к снижению концентрации CO_2 в межклетниках, что способствует, по данным из литературы (Roelfsema et al., 2002), открытию устьиц. Некоторые исследователи подчеркивают важность фотосинтеза в замыкающих клетках для контроля устьичной проводимости (Baroli et al., 2008; Lawson, 2009), в то время как другие предполагают, что приоритет принадлежит фотосинтезу мезофилла (Roelfsema et al., 2002). Все сказанное указывает на важность изучения распределения цитокининов между клетками мезофилла и самими устьицами. Полученные нами данные, свидетельствующие о том, что повышение устьичной проводимости под влиянием цитокининов происходило на фоне их накопления как непосредственно в устьичных клетках, так и клетках мезофилла, указывают на возможность как пря-

мого, так и опосредованного влияния цитокининов на устьичную проводимость.

Таким образом, иммуногистохимический анализ цитокининов позволил выявить следующие важные закономерности их накопления в отдельных клетках листа: 1) присутствие цитокининов в устьичных клетках и мезофилле; 2) увеличение интенсивности окрашивания на цитокинины клеток устьиц и мезофилла при индукции экспрессии гена, контролирующего синтез этих гормонов; 3) совпадение повышенной интенсивности окрашивания цитокининов с увеличением устьичной проводимости (высокая интенсивность окрашивания цитокининов наблюдалась одновременно с увеличением устьичной проводимости).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00666).

Список литературы

- Ахиярова Г. Р., Фрике В., Веселов Д. С., Кудоярова Г. Р., Веселов С. Ю. 2006. Накопление и распределение АБК в тканях листа и устьичная проводимость при водном стрессе, индуцированном засолением. Цитология. 48 (11): 918—923. (Akhiyarova G. R., Fricke W., Veselov D. S., Kudoyarova G. R., Veselov S. Yu. 2006. ABA accumulation and distribution during the leaf tissues shows its role stomatal conductance regulation under short-term salinity. Tsitologiya. 48 (11): 918—923.)
- Веселов С. Ю., Вальке Р. С., Ван Онкелен Х., Кудоярова Г. Р. 1999. Содержание и локализация цитокининов в листьях исходных и трансгенных растений табака. Физиол. раст. 46 (1): 326—335. (Veselov S. Yu., Valcke R. S., Van Onckelen H., Kudoyarova G. R. 1999. Cytokinin content and location in the leaves of the wild-type and transgenic tobacco plants. Russ. J. Plant Physiol. 46 (1): 26—33.)
- Высоцкая Л. Б., Ахиярова Г. Р., Веселов С. Ю., Кудоярова Г. Р. 2011. Содержание цитокининов в клетках разных зон корней пшеницы. Цитология. 53 (11): 884—890. (Vysotskaya L. B., Akhiyarova G. R., Veselov S. Yu., Kudoyarova G. R. 2011. Cytokinin content and immunolocalization in wheat primary root cells. Tsitologiya. 53 (11): 884—890.)
- Чернядьев И. И. 2000. Онтогенетические изменения фотосинтетического аппарата и действие цитокининов. Прикладная биохимия и микробиология. 36: 611—625. (Chernyad'ev I. I. 2000. Developmental changes of the photosynthetic apparatus and the action of cytokinins. Applied Biochemistry and Microbiology. 36: 611—625.)
- Arkipova T. N., Prinsen E., Veselov S. U., Martineko E. V., Melentiev A. I., Kudoyarova G. R. 2007. Cytokinin producing bacteria enhances plant growth in drying soil. Plant Soil. 292: 305—315.
- Baroli I., Price D., Badger M. R., Von Caemmerer S. 2008. The contribution of photosynthesis to the red light response of stomatal conductance. Plant Physiol. 146: 737—747.
- Brovko F. A., Vasil'eva V. S., Shepelyakovskaya A. O., Selivankina S. Yu., Kudoyarova G. R., Nosov A. V., Moshkov D. A., Laman A. G., Boziev K. M., Kusnetsov V. V., Kulaeva O. N. 2007. Cytokinin-binding protein (70 kDa): localization in tissues and cells of etiolated maize seedlings and its putative function. J. Exp. Bot. 58: 2479—2490.
- Chiappetta A., Michelotti V., Fambrini M., Bruno L., Salvini M., Petrarulo M., Azmi A., Van Onckelen H., Pugliesi C., Bitonti M. B. 2006. Zeatin accumulation and misexpression of a class I *knox* gene are intimately linked in the epiphyllous response of the interspecific hybrid EMB-2 (*Helianthus annuus* × *H. tuberosus*). Planta. 223: 917—931.
- Corbesier L., Prinsen E., Jacqumard A., Lejeune P., Van Onckelen H., Perilleux C., Bernier G. 2003. Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. J. Exp. Bot. 54: 2511—2517.
- Davies W. J., Kudoyarova G., Hartung W. 2005. Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. J. Plant Growth Reg. 24: 285—295.
- Gutierrez-Gonzalvez M. G., Stockert J. C., Ferrer J. M., Tato A. 1984. Ruthenium red staining of polyanion containing structures in sections from epoxy-resin embedded tissues. Acta histochem. 74: 115—120.
- Haberer G., Keiber J. J. 2002. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. Plant Physiol. 128: 354—362.
- Kudoyarova G. R., Korobova A. V., Akhiyarova G. R., Arkhipova T. N., Zaytsev D. Yu., Prinsen E., Egutkin N. L., Medvedev S. S., Veselov S. Yu. 2014. Accumulation of cytokinins in roots and their export to the shoots of durum wheat plants treated with the protonophore carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazide (CCCP). J. Exp. Bot. doi:10.1093/jxb/eru113.
- Kudoyarova G. R., Vysotskaya L. B., Cherkozyanova A., Dodd I. C. 2007. Effect of partial rootzone drying on the concentration of zeatin-type cytokinins in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) xylem sap and leaves. J. Exp. Bot. 58: 161—168.
- Lawson T. 2009. Guard cell photosynthesis and stomatal function. New Phytologist. 181: 13—34.
- Merewitz E., Gianfagna T., Huang B. 2011. Photosynthesis, water use, and root viability under water stress as affected by expression of *SAG12-ipt* controlling cytokinin synthesis in *Agrostis stolonifera*. J. Exp. Bot. 62: 383—395.
- Rijavec T., Jain M., Dermastia M., Chourey P. S. 2011. Spatial and temporal profiles of cytokinin biosynthesis and accumulation in developing caryopses of maize. Ann. Bot. 107: 1235—1245.
- Roelfsema M. R. G., Hansterin S., Felle H., Hedrich R. 2002. CO₂ provides an intermediate link in the red light response of guard cells. Plant J. 32: 65—75.
- Schmulling T., Beinsberger S., De Greef J., Schell J., Van Onckelen H., Spena A. 1989. Construction of a heat-inducible chimerical gene to increase the cytokinin content in transgenic plant tissue. FEBS Lett. 249: 401—406.
- Skoog F., Miller C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. Symposium of Soc. Exp. Biol. 11: 118—131.
- Vysotskaya L. B., Veselov S. Y., Kudoyarova G. R. 2010. 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. 61: 3709—3717.
- Wulfetange K., Lomin S. N., Romanov G. A., Stolz A., Heyl A., Schmulling T. 2011. The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. Plant Physiol. 156: 1808—1818.
- Zhang J., Nguyen H. T., Blum A. 1999. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. J. Exp. Bot. 50: 292—302.

EFFECTS OF LOCAL INDUCTION OF *IPT*-GENE IN ROOTS ON CYTOKININS CONTENT
IN LEAF CELLS TOBACCO PLANTS

L. B. Vysotskaya,¹ G. R. Akhiyarova,¹ G. V. Sharipova,¹ M. V. Dedova,¹ S. Yu. Veselov,²
D. Yu. Zaytsev,¹ G. R. Kudoyarova¹

¹ Institute of Biology, Ufa Scientific Center RAS,
ans ² Department of Biology, Bashkirian State University, Ufa;
e-mail: Vysotskaya@anrb.ru

Identification of cytokinins in differentiated leaf cells has received little attention. We have carried out immunohistochemical localization of cytokinins in leaves of transgenic tobacco plants in which the level of increased due to induced in their roots the expression of *ipt*-gene controlling cytokinin synthesis. Immuno-labeling of cytokinins with the help of antibodies raised against zeatin riboside was characteristic of mesophyll cells. The label was localized in cytoplasm adjacent to cell walls and was absent in vacuoles. Immunohistochemical staining also revealed the presence of cytokinins in guard cells. Induction of cytokinin synthesis enhanced the immunohistochemical staining of both mesophyll cells and guard cells, which was accompanied by elevated stomatal conductance. The possibility of a direct effect of cytokinins on stomatal conductance and their indirect influence through photosynthesis in the mesophyll cells is discussed.

Key words: *Nicotiana tabacum*, cytokinins, immunolocalization, stomatal conductance.