



ВЫЯВЛЕНИЕ СВЯЗИ МЕЖДУ ГИДРАВЛИЧЕСКОЙ ПРОВОДИМОСТЬЮ И СОДЕРЖАНИЕМ АКВАПОРИНОВ ПЛАЗМОЛЕММЫ С ПОМОЩЬЮ ИХ ГИСТОХИМИЧЕСКОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

Шарипова Г.В., Веселов Д.С., Кудоярова Г.Р., Katsuhara M., Furuichi T., Веселов С.Ю.

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, e-mail: g.v.sharipova@mail.ru

²Башкирский государственный университет, Уфа

³Institute of Plant Science and Resource, Okayama University, Kurashiki, Japan

Резюме

С помощью антител к последовательности аминокислот, соответствующей N-концевой области аквапоринов семейства HvPIP2 (анти-HvPIP2), проведено иммуноокрашивание поперечных срезов корней растений ячменя на фоне осмотического стресса. В предварительных опытах показано отсутствие перекреста и специфичность связывания антител, полученных к пептидам HvPIP2;1 и HvPIP2;5 аквапоринов, с белками, выделенными из ооцитов, экспрессирующих кРНК фрагментов соответствующих генов. Выявлен низкий уровень окрашивания на аквапорины в начале действия дефицита воды, вызванного осмотическим стрессом, и повышение окрашивания при более продолжительной инкубации на растворе с ПЭГ (полиэтиленгликолем). Изменение уровня аквапоринов соответствовало колебаниям гидравлической проводимости.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare L.*, дефицит воды, аквапорины плазмолеммы, иммунолокализация

Введение

Изменение гидравлической проводимости тканей растений – один из важных процессов, обеспечивающих приспособление растений к условиям обитания [Кудоярова и др. 2013]. Открытие у растений водных каналов аквапоринов выявило один из механизмов, потенциально способных влиять на гидравлическую проводимость [Maurel et al., 1993]. Поскольку именно плазмолемма отличается более высоким гидравлическим сопротивлением по сравнению с тонопластом, аквапоринам клеточной мембраны (plasma membrane proteins – PIP) в этом плане уделяется основное внимание [Chaumont et al., 2001]. Так было показано, что повышение экспрессии PIP аквапоринов в дневное время способствует возрастанию гидравлической проводимости и транспирационного потока из корней [Lopez et al., 2003]. Вместе с тем, при стрессе не всегда удавалось выявить параллелизм в изменении активности аквапоринов и гидравлической проводимости. Так гидравлическая проводимость чаще всего снижается при дефиците воды и осмотическом стрессе [Aroca et al., 2012], в то время как активность аквапоринов часто возрастает [Nachez et al., 2012]. Это может быть связано с тем, что способность тканей растений

проводить воду зависит не только от проницаемости мембран для воды, но и от формирования барьеров на ее пути в виде поясков Каспари, от особенностей роста и развития корней [Aroca et al., 2012]. Для того, чтобы более явно выявить связь между присутствием аквапоринов и гидравлической проводимостью при стрессе, важно проводить сравнение между этими показателями до того, как формируются морфологические различия между растениями. Ранее нами было показано (Шарипова и др., 2013), что при действии мягкого осмотического стресса на растения ячменя (добавление в среду нейтрального осмотика полиэтиленгликоля до концентрации 6%) гидравлическая проводимость сначала снижается, а затем возрастает. Судя по реакции на добавление реактива Фентона, инактивирующего аквапорины [Gomes et al., 2009], изменение гидравлической проводимости в этих опытах контролировалось на уровне активности водных каналов. В данной работе мы проверили это предположение с помощью иммуногистохимической локализации аквапоринов, используя антитела к HvPIP2;1 и HvPIP2;5 аквапоринов ячменя, полученных нашими японскими коллегами.

Материалы и методы

Исследования проводились в лабораторных условиях в водной культуре с растениями ячменя (*Hordeum vulgare L.*, сорт Прерия). Семена проращивали в темноте в течение 2 - 3 суток на дистиллированной воде с добавлением 10^{-5} М CaCl_2 , при температуре 24°C. Трехсуточные проростки пересаживали на 10%-ную среду Хогланда-Арнона-I и выращивали при освещенности 18 клк и 14 часовой продолжительностью светового дня. На седьмые сутки растения перенесли на раствор 6% полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ) растворенного в 10% растворе Хогланда-Арнона-I.

Часть корня ячменя длиной 0,5 см, находящуюся на расстоянии 1,5-2 см от кончика, фиксировали в 4% растворе карбодиимида (Sigma, Япония). Дегидратацию образцов проводили в серии разведений этанола, а затем корень заключали в гидрофильную метакрилатную смолу JB-4 (Electron Microscopy Sciences, США). С помощью ротационного ультрамикротомы готовили гистологические срезы толщиной 1,5 микрона. Иммулокализацию проводили, как описано ранее [Веселов и др., 1999]. Для выявления иммунного окрашивания срезы обрабатывались иммунной сывороткой, содержащей специфические антитела. Для выявления прореагировавшей сыворотки, срезы обрабатывали раствором золотого конъюгата (BBInt., Великобритания), затем наносили серебряный усилитель (BBInt., Великобритания).

Поликлональные антитела против аквапоринов из семейства HvPIP2 получали, используя в качестве иммуногена синтетические полипептиды (Medial & Biological Laboratories Co., Japan) соответствующие аминокислотным последовательностям N-концевой области HvPIP2;1 (Ала-ала-про-глин-гли-гли-глу-фен-сер-сер-лиз-асп-тир-вал) и HvPIP2;5 (Глу-вал-мет-глу-тре-гли-гли-гли-гли-асп-фен-ала-ала-лиз-асп).

Экспрессию HvPIP2;1, HvPIP2;2, HvPIP2;3/4 и HvPIP2;5 аквапоринов в ооцитах *Xenopus* проводили, как описано [Katsuhara et al., 2002]. Кратко, область кДНК соответствующих HvPIP2 аквапоринов субклонировали в рXβG-ev1 векторе, соответствующие комплементарные РНК синтезировали в системе *in vitro* и вводили в ооциты. В качестве контроля использовали ооциты, в которые вместо кДНК делали инъекцию воды. Ооциты, экспрессирующие каждый из HvPIP2 белков, собирали, гомогенизировали в эппендорфовских пробирках на 1,5 мл в буфере [Katsuhara et al. 2002]. Все белки в пробирке использовали как один образец, солибилизовали, проводили SDS-электрофорез и Western анализ как описано [Katsuhara et al., 2002].

Результаты и обсуждение

Антитела, полученные к N-концевому пептиду, характерному для PIP2;1 аквапоринов, были охарактеризованы ранее [Katsuhara et al., 2002], в то время как свойства антител к PIP2;5 аквапоринов еще не были ранее изучены. Поэтому в данной работе мы сравнили с помощью Western анализа способность антител взаимодействовать с белками, которые синтезировались в ооцитах при введении в них кРНК, соответствующей последовательностям генов, кодирующих фрагменты HvPIP2;1, HvPIP2;2, HvPIP2;3/4 и HvPIP2;5 аквапоринов. Как видно из рисунка, окрашивание с помощью вторых антител, меченных пероксидазой, выявило связывание одного из белков, синтезируемых в ооцитах, в которые вводили кРНК фрагмента HvPIP2;5, с антителами, полученными к пептиду с последовательностью аминокислот, характерной для HvPIP2;5 аквапоринов (рис.1). При этом эти же антитела не реагировали с белками из ооцитов, в которых экспрессировали кРНК фрагментов генов HvPIP2;1, PIP2;2 и PIP2;3/4. Напротив, антитела к пептидам HvPIP2;1 реагировали с белками из ооцитов, экспрессирующих кРНК соответствующего фрагмента гена, но не реагировали с белками ооцитов, экспрессирующих кРНК фрагментов генов HvPIP2;2, HvPIP2;3/4 и HvPIP2;5. Эти результаты свидетельствуют о специфичности полученных антител.

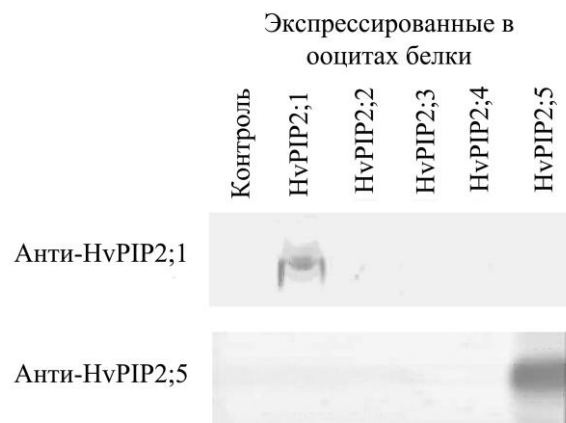


Рис. 1. Характеристика специфичности антител, полученных к синтетическим полипептидам, соответствующих аминокислотным последовательностям N-концевой области HvPIP2;1 и HvPIP2;5. Результаты Western анализа белков, выделенных из ооцитов, экспрессирующих кРНК фрагментов генов HvPIP2;1, HvPIP2;2, HvPIP2;3/4 и HvPIP2;5.

Использование антител для иммуногистохимической локализации также подтвердило их специфичность. Об этом свидетельствовало преимущественное

окрашивание границ клеток с помощью данных антител (рис.2), что соответствует локализации PIP аквапоринов в клеточной мембране.

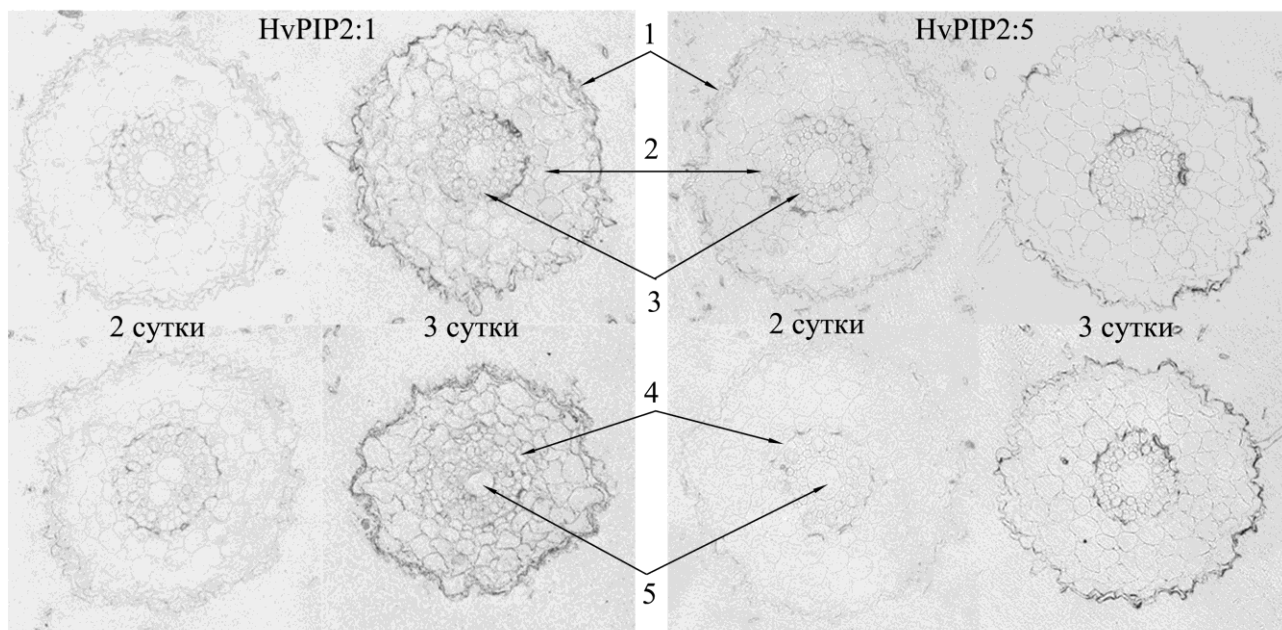


Рис. 2. Иммуногистохимическая локализация аквапоринов с помощью антител к HvPIP2:1 и HvPIP2:5 на поперечных срезах корней ячменя через 2 и 3 суток после добавления ПЭГ в питательную среду (1.5-2 см от кончика корня). 1-экзодерма; 2-кора; 3-метаксилема; 4-перидикл; 5-центральная метаксилема.

Поперечные срезы корней были сделаны в начале зоны дифференциации, которую идентифицировали по появлению корневых волосков. Поскольку в этой зоне происходит наиболее активное поглощение воды, важно было оценить содержание аквапоринов в клетках именно в этой части корней. Сравнение уровня иммунного окрашивания клеток показало низкое содержание как HvPIP2:1, так и HvPIP2:5 аквапоринов в клетках корней через двое суток после добавления ПЭГ в питательную среду и его увеличение - через 3 суток (рис.2). Усиление окраски проявлялось как в области коры, так и центрального цилиндра, но наиболее заметное возрастание иммунного окрашивания было в области экзодермы корней.

Более низкий уровень содержания аквапоринов, зарегистрированный через 2 дня после начала действия осмотического стресса соответствовал полученным ранее данным о первоначальном снижении гидравлической проводимости под влиянием осмотического стресса [Шарипова и др., 2013]. Считается, что снижение проницаемости мембран для воды уменьшает

скорость ее потери корнями, когда их водный потенциал в условиях дефицита воды оказывается выше, чем в окружающей среде [Agosa et al., 2012]. В результате накопления осмотически активных веществ восстанавливается градиент водного потенциала между клетками корней и окружающей среды, что защищает клетки от потери воды в условиях осмотического стресса. В наших опытах при действии ПЭГ осмотическое приспособление в корнях растений ячменя происходило на третий день [Шарипова и др., 2013]. В экспериментах с воздействием солевого стресса на корни растений кукурузы было показано, что снижение осмотического потенциала сопровождается повышением экспрессии аквапоринов [Zhu et al., 2005]. В нашем случае также накопление осмотически активных веществ сопровождалось повышением гидравлической проводимости [Шарипова и др., 2013] и уровня аквапоринов в клетках (рис.2).

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о роли изменений гидравлической проводимости в адаптации

растений к дефициту воды при осмотическом стрессе и участии аквапоринов в этом процессе.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №12-04-01111, при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ госзадание №01201456413, гранта РФФИ №14-04-97077.

Литература

1. Веселов С.Ю., Вальке Р., Ван Онкелен Х., Кудоярова Г.Р. Содержание и локализация цитокининов в листьях исходных и трансгенных растений табака // Физиология растений. 1999. Т. 46. С. 326–335.
2. Кудоярова Г.Р., Холодова В.П., Веселов Д.С. Современное состояние проблемы водного баланса растений при дефиците воды // Физиология растений. 2013. Т. 60. С. 165–175.
3. Шарипова Г.В., Веселова С.В., Веселов Д.С. Динамика показателей водного обмена у растений ячменя на фоне умеренного осмотического стресса // Биомика/BIOMICS. 2013. Т. 5. С. 130–135.
4. Aroca R., Porcel R., Ruiz-Lozano J.M. 2012. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions // Journal of Experimental Botany. V. 63. P. 43–57.
5. Chaumont F., Barrieu F., Wojcik E., Chrispeels M.J., Jung R. Aquaporins constitutes a large and highly divergent protein family in maize // Plant Physiology. 2001. V. 125. P. 1206–1215.

6. Gomes, D., Agasse A., Thiebaud P., Delrot S., Gerós H., Chaumont F. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms // Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes. 2009. V. 1788. P. 1213–1228.
7. Hachez C., Veselov D., Ye Q., Reinhardt H., Knipfer T., Fricke W., Chamout F. Short-term control of maize cell and root water permeability through plasma membrane aquaporin isoforms // Plant, Cell and Environment. 2012. V. 35. P. 185–198.
8. Katsuhara M., Akiyama Y., Koshio K., Shibasaki M., Kasamo K. Functional analysis of water channels in barley roots // Plant Cell Physiology. 2002. V. 43. P. 885–893.
9. Lopez F., Bousser A., Sissoeff I., Gaspar M., Lachaise B., et al. Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of PIP2 proteins // Plant Cell Physiology. 2003. V. 44. P. 1384–1395.
10. Maurel C., Reizer J., Schroeder J.I., Chrispeels M.J. The vacuolar membrane protein a-TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes // EMBO Journal. 1993. V. 12. P. 2241–2247.
11. Zhu C., Schraut D., Hartung W., Schaffner A.R. Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA // Journal of Experimental Botany. 2005. V. 56. P. 2971–2981.

REVEALING LINKAGE BETWEEN HYDRAULIC CONDUCTANCE AND AQUAPORIN ABUNDANCE IN PLASMALEMMA WITH THE HELP OF HISTOCHEMICAL LOCALIZATION

Sharipova G.V., Veselov D.S., Kudoyarova G.R., Katsuhara M., Furuichi T., Veselov S.Yu.

¹Ufa Institute of Biology of Russian Academy of Sciences, Ufa, e-mail: g.v.sharipova@mail.ru

²Bashkirian State University, Ufa

³Institute of Plant Science and Resource, Okayama University, Kurashiki, Japan

Resume

Immunochemical staining of root cross sections of barley plants experiencing osmotic stress was carried out with the help of antibodies against peptides with the sequence of amino acids corresponding to N-region of aquaporins from the family of HvPIP2 (anti-HvPIP2). Preliminary experiments have shown the absence of cross-reactivity and specificity of binding of antibodies against peptides of HvPIP2;1 and HvPIP2;5 aquaporins towards proteins recovered from oocytes expressing cRNA of corresponding gene fragments. There was revealed a low level of staining of aquaporins at the beginning of the action of water deficit caused by osmotic stress and increased immunostaining after prolonged incubation on PEG (polyethylene glycol). Changes in aquaporin abundance were related to modulation of hydraulic conductance.

Keywords: *Hordeum vulgare* L, water deficit, plasmalemma aquaporins, immunolocalization