



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



ВЛИЯНИЕ НАПРЯЖЕННОСТИ ЗАСУХИ НА ОБРАЗОВАНИЕ БОКОВЫХ КОРНЕЙ И СОДЕРЖАНИЕ ГОРМОНОВ У РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ

Веселов Д.С., Шарипова Г.В., Анохина Н.Л., Кудоярова Г.Р.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Уфимский Институт биологии Российской академии наук, Уфа, e-mail: veselov@anrb.ru

Резюме

Изучали влияние засухи на развитие боковых корней растений ячменя и роль фитогормонов в регуляции этого процесса. Была обнаружена контрастная ростовая реакция корней на умеренный и сильный дефицит воды: умеренный дефицит воды стимулировал, а сильный – подавлял ветвление корней растений. Выявлено, что абсцизовая кислота (АБК) играет двойственную роль в зависимости от уровня ее накопления в ответ на дефицит воды разной напряженности. В результате непосредственного действия этого гормона на активность аквапоринов гидравлическая проводимость увеличивается при умеренном дефиците воды, а его ингибирующее действие на ветвление – опосредованно снижает способность корней поглощать и проводить воду при интенсивной засухе.

Ключевые слова: ячмень, дефицит воды, боковые корни, фитогормоны, иммуноферментный анализ гормонов, иммунолокализация гормонов

Введение

Изменение скорости роста и развития корневой системы – одна из наиболее важных реакций, обеспечивающих адаптацию растений к дефициту воды. Несмотря на значимость этой реакции, ее изучению уделялось недостаточно внимания, о чем свидетельствует поразительная противоречивость информации о том, какие изменения в росте и функционировании корней повышают, а какие – понижают устойчивость растений к засухе. Так некоторые исследователи утверждают, что подавление роста боковых корней является характерной реакцией на засуху, которая повышает засухоустойчивость растений [Xiong et al., 2006], а другие, наоборот, считают, что засухоустойчивость возрастает благодаря усиленному ветвлению корней [Патуринский 2007]. В основе первой точки зрения лежит предположение о том, что подавление ветвления способствует ускоренному росту корней в глубину почвы, где при засухе еще остается влага [Tardieu et al., 2010]. Вместе с тем, по некоторым данным, не было обнаружено связи между ветвлением и удлинением корней [Площинская и др., 2002]. Кроме того, было показано, что ветвление корней позволяет лучше усваивать воду при смачивании редкими дождями

верхних слоев почвы [Hodge, 2010]. Также противоречивы сведения о том, как меняется экспрессия генов и содержание водных каналов аквапоринов в корнях при дефиците воды и как это сказывается на общей проводимости корневой системы. Так, по одним данным, дефицит воды вызывает снижение экспрессии генов аквапоринов и уменьшение содержания кодируемых ими белков [Ruiz-Lozano et al. 2009], а по другим – увеличение [Mahdieh et al., 2008]. Противоречивость данных литературы можно объяснить тем, что не учитывалась интенсивность и продолжительность действия засухи как на показатели роста и развития корней, так и на их функциональную активность. Еще одно проявление противоречивости данных литературы о том, что происходит в корнях, – это информация о гидравлической проводимости корней при засухе. В большинстве работ было обнаружено снижение гидравлической проводимости корней под влиянием дефицита воды [см ссылки в обзоре Agosa et al., 2012]. Считается, что таким образом растение снижает возможность оттока воды из корней в подсыхающую почву [Steudle, 2000]. С другой стороны, очевидно, что снижение гидравлической проводимости корней создает дополнительные проблемы с поглощением воды. Лишь в немногих

работах сравнивали рост корней и их гидравлическую проводимость [Lovisolo et al., 2008], а в условиях засухи такое сравнение не проводилось.

Не вызывает сомнений тот факт, что ростовая реакция корней на дефицит воды должна быть связана с фитогормонами. В литературе есть сведения об участии абсцизовой кислоты (АБК) в адаптации растений к условиям засухи. Роль этого гормона в регуляции структуры и функции корней также обсуждается [De Smet, 2006]. Однако данные литературы неоднозначны. Так по одним данным АБК подавляет ветвление корней [Casimiro et al., 2003], а по другим – стимулирует [Liang et al., 2007]. Также нет единого мнения о влиянии АБК на гидравлическую проводимость и на аквапорины как в условиях засухи, так и без нее [Parent et al., 2009]. Ветвление корней чаще всего связывают с гормонами ауксинами [Иванов, 2011]. Их роль в закладке и регуляции роста боковых корней интенсивно изучается [Teale et al., 2005; Yoon et al., 2010]. Однако сведения о содержании ауксинов в корнях растений при дефиците воды ограничены. Имеющиеся данные о роли гормонов цитокининов в регуляции роста корней при засухе противоречивы. Хотя цитокинины присутствуют в корнях в большом количестве [Brovko et al., 2007], и корни являются основным источником цитокининов для растения [Штратникова, Кулаева, 2008], считается, что избыток цитокининов тормозит рост корней, и именно снижение их содержания в корнях при засухе может способствовать стимуляции их роста и тем самым повышать засухоустойчивость растений [Werner et al., 2010]. Вместе с тем, есть немало данных, свидетельствующих о повышении засухоустойчивости растений под влиянием цитокининов [Rivero et al., 2010]. Так показано, что цитокинины могут способствовать накоплению осмотически активных веществ при засухе [Haung et al., 2011]. Этот эффект был обнаружен в листьях растений, но не исключено аналогичное влияние цитокининов на клетки корней. В литературе также широко обсуждается роль осмотического приспособления клеток побега при дефиците воды [Fan et al., 2008; Fagoog et al., 2009]. При этом накоплению осмотически активных веществ в корнях уделялось гораздо меньше внимания.

Таким образом, наша работа была направлена на углубление знаний об особенностях роста и развития корней при дефиците воды и роли фитогормонов в регуляции этих процессов.

Материалы и методы

Исследования проводились в лабораторных условиях в песчаной и водной культурах на растениях ячменя (*Hordeum vulgare*, L., сорт Прерия).

Умеренный дефицит воды моделировали путем (1) постепенного снижения содержания воды в субстрате до 30% от полной влагоемкости в климатической камере (Sanyo MLR-351H, Япония) при температуре днем/ночью 25/20°C, освещенности 22000 лк и относительной влажности воздуха 65%, а также – (2) добавлением нейтрального непроникающего осмотически активного вещества полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ) до концентрации 6% в питательный раствор в водной культуре. Сильный дефицит воды поддерживался (1) при сочетании дефицита воды в субстрате с низкой влажностью воздуха на светоплощадке при относительной влажности воздуха 25%, или (2) при воздействии 12% ПЭГ. Все операции начинали проводить на растениях 7-суточного возраста. До начала действия засухи растения выращивались на 10% растворе Хогланда-Арнона (Х-А).

Примордии корней ячменя длиной 0,5 см, находящиеся на расстоянии 3,5-4 см от кончика, фиксировали в 4% растворе карбодиимида (Sigma, Япония). Дегидратацию образцов проводили в серии разведенный 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. Иммунолокализацию 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).

Иммуноферментный анализ проводили в лунках полистиролового планшета (Corning, США). Для определения количества сыворотки, прореагировавшей с сорбированными в лунках белковыми конъюгатами гормонов, использовали препарат антикроличьих бараньих антител, меченых пероксидазой. Оптическую плотность измеряли на фотометре Titertek-Uniskan при длине волны 492 нм.

Опыты проводили 3 раза по 3-7 биологических повторов в каждом опыте. На рисунках представлены средние всех значений и их стандартные отклонения. Все статистические расчеты проводили с помощью стандартных программ Excel.

Результаты и обсуждение

В зависимости от интенсивности, засуха неодинаково влияла на образование боковых корней у ячменя. Когда засушливые условия были более умеренные, и дефицит воды в субстрате развивался

медленнее из-за высокой влажности воздуха, наблюдалась стимуляция образования боковых корней через двое суток после прекращения полива (рис. 1,а). В случае сильного дефицита воды, когда растения не поливали, и когда наряду с быстро развивающейся субстратной засухой, растения

испытывали водный дефицит в воздушной среде, образование боковых корней подавлялось (рис. 1,б). Моделирование этих же условий на водной культуре с использованием двух концентраций ПЭГ 6000 (6% как умеренная засуха, 13% - как сильная), показало сходные результаты (рис. 1,в).

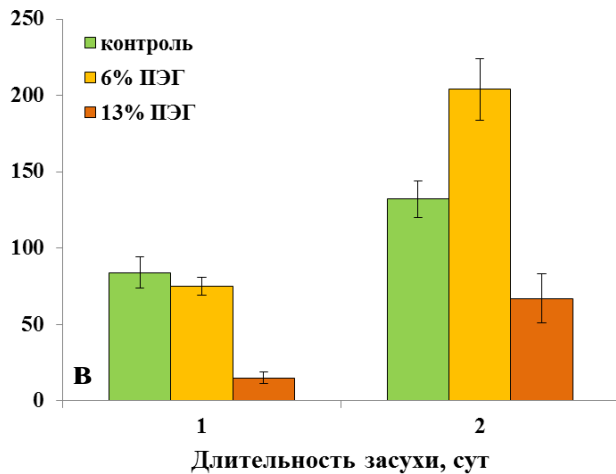
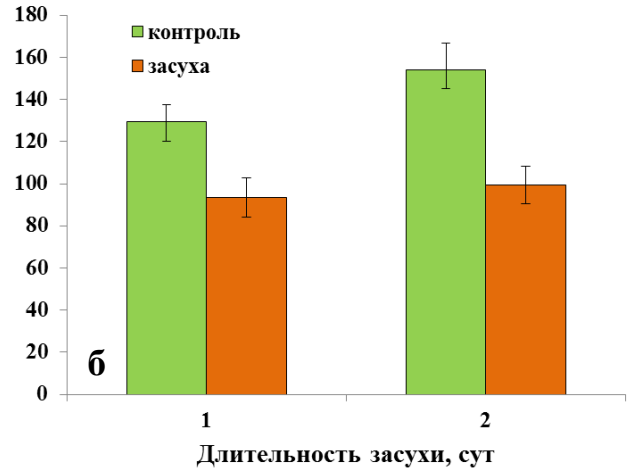
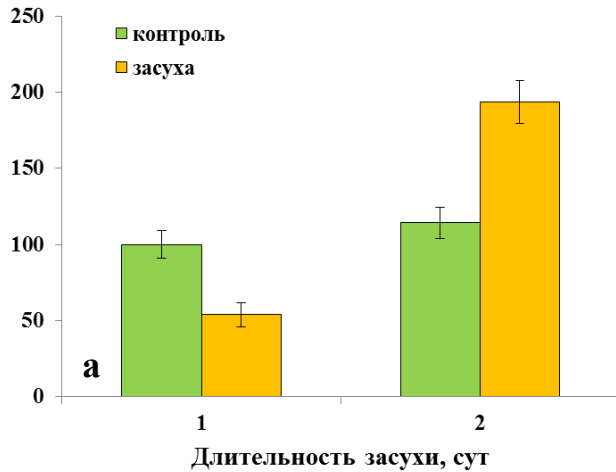


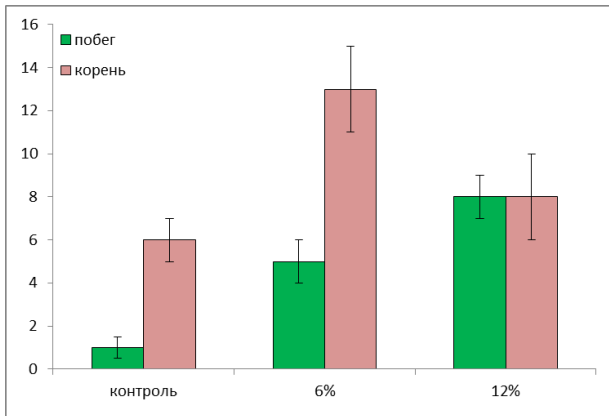
Рис. 1. Влияние дефицита воды на количество боковых корней на одно растение ячменя. а) Умеренная засуха, при выращивании растений в кликокамере. б) Сильная засуха, при выращивании растений на открытой светоплощадке. в) Осмотический стресс разной интенсивности, вызванный добавлением разных концентраций ПЭГ в питательную среду.

Поскольку добавление ПЭГ в разной концентрации вызвало такую же реакцию, как и контрастные режимы поддержания содержания воды в субстрате, осмотический стресс как более легко моделируемый был выбран для дальнейших исследований.

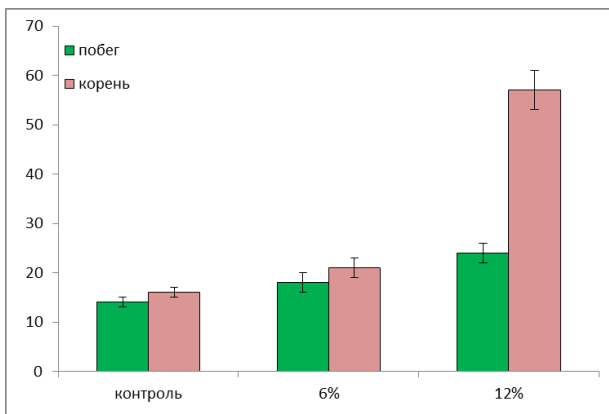
Измерение содержания в листьях и корнях растения ячменя сорта Прерия индолилукусной (ИУК), абсцизовой кислоты (АБК) и цитокининов показало, что через сутки после добавления осмотика наиболее яркой реакцией было многократное возрастание уровня АБК в побеге,

более заметное на фоне 12% ПЭГ (рис. 2,а). На вторые сутки под влиянием ПЭГ происходило накопление ИУК в побегах (полуторакратное по сравнению с контролем на фоне 6% и двукратное – на фоне 12% ПЭГ) и снижение уровня этого гормона в корнях (достоверное - в случае сильного дефицита воды), что косвенно свидетельствовало о возможном ингибировании оттока ИУК из побега в корни (рис. 3,б). При этом осмотический стресс также сопровождался резким снижением уровня цитокининов через 2 суток действия дефицита воды, что более ярко проявлялось в корнях, где содержание

цитокининов упало в три раза на фоне 6% и на порядок – на фоне 12% ПЭГ (рис. 4,б). В отличие от первых суток, на вторые сутки действия осмотика накопление АБК было заметнее в корнях, чем в побегах и наиболее высокий уровень этого гормона был зарегистрирован на фоне 12% ПЭГ (рис. 2,б). Таким образом, обнаруженное нами ингибирование ветвления под влиянием сильного дефицита воды можно объяснить резким возрастанием концентрации АБК, которая, по некоторым данным подавляет удлинение боковых корней [De Smet et al., 2006]. Этому также могло способствовать снижение уровня ИУК и цитокининов в корнях растений при данном воздействии. Вместе с тем, зарегистрированные результаты измерения общего уровня гормонов в корнях не могли объяснить выявленную стимуляцию ветвления при более мягком дефиците воды (содержание гормонов в этих условиях изменялось по сравнению с контролем в том же направлении, что и при сильном дефиците воды, хотя и в меньшей степени).

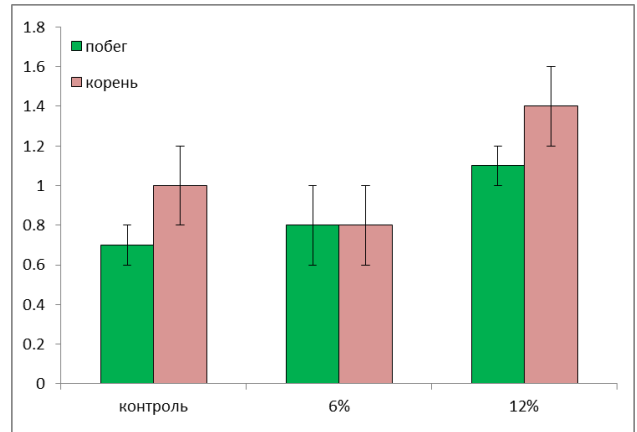


а

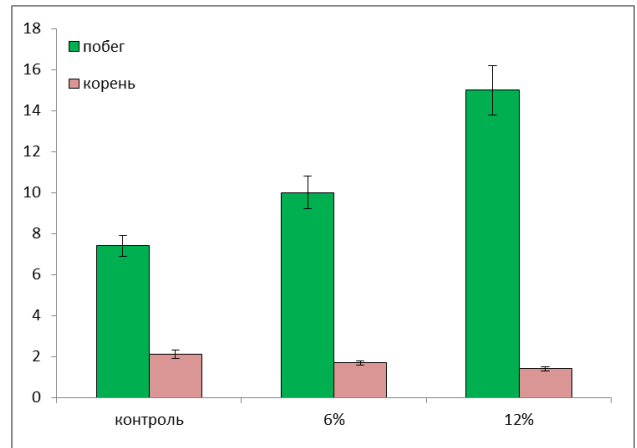


б

Рис. 2. Концентрация АБК (нг/г сырой массы) в растениях ячменя через сутки (а) и двое суток (б) действия дефицита воды.



а



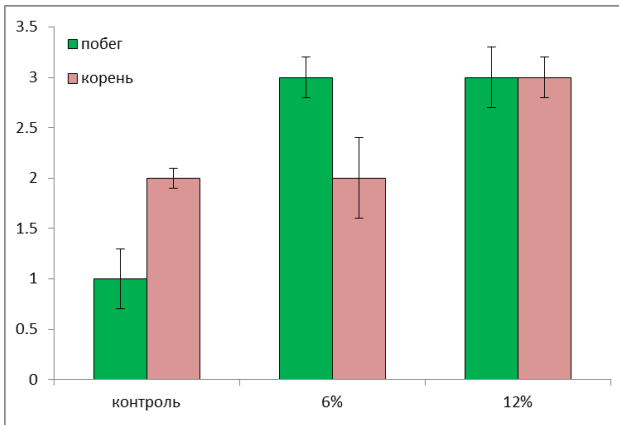
б

Рис. 3. Концентрация ИУК (нг/г сырой массы) в растениях ячменя через сутки (а) и двое суток (б) действия дефицита воды.

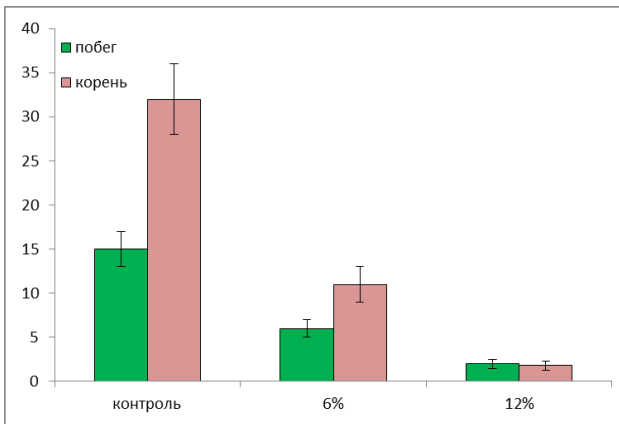
Стимулирование роста боковых корней под влиянием 6 % ПЭГ сопровождалось повышением гидравлической проводимости корней от 365 до 971 растение⁻¹ ч⁻¹ МПа⁻¹ [Шарипова и др., 2013]. Определение площади корней с помощью программы Image J показало ее снижение при данном воздействии, и, следовательно, повышение способности корней поглощать воду нельзя было объяснить увеличением поглотительной поверхности корней.

Образование боковых корней может повышать гидравлическую проводимость благодаря экспрессии в них аквапоринов. Для проверки этого предположения была проведена иммулокализация РІР аквапоринов, локализованных в клеточных мембранах, с помощью соответствующих антител при действии умеренной засухи. Из рисунка 5, видно, что в примордиях, готовых к выходу на

поверхность корня, аквапорины локализованы в плазмолемме и могут обеспечивать транспорт воды от клетки к клетке. Эти данные указывают на способность появляющихся на поверхности материнского корня боковых корней проводить воду по пути от клетки к клетке (cell-to-cell), благодаря присутствию в их клеточных мембранах водных каналов.



а



б

Рис. 4. Концентрация цитокининов (нг/г сырой массы) в растениях ячменя через сутки (а) и двое суток (б) действия дефицита воды.

В другой работе [Шарипова и др., 2014] нами было показано, что абсцизовая кислота повышает количество аквапоринов в клетках корня и гидравлическую проводимость растений ячменя. Обнаруженное отсутствие адекватных изменений гидравлической проводимости у дефицитного по АБК мутанта AZ34 ячменя указывает на необходимость накопления этого гормона для повышения способности корней поглощать воду при умеренном дефиците воды [Кудоярова и др., 2014].

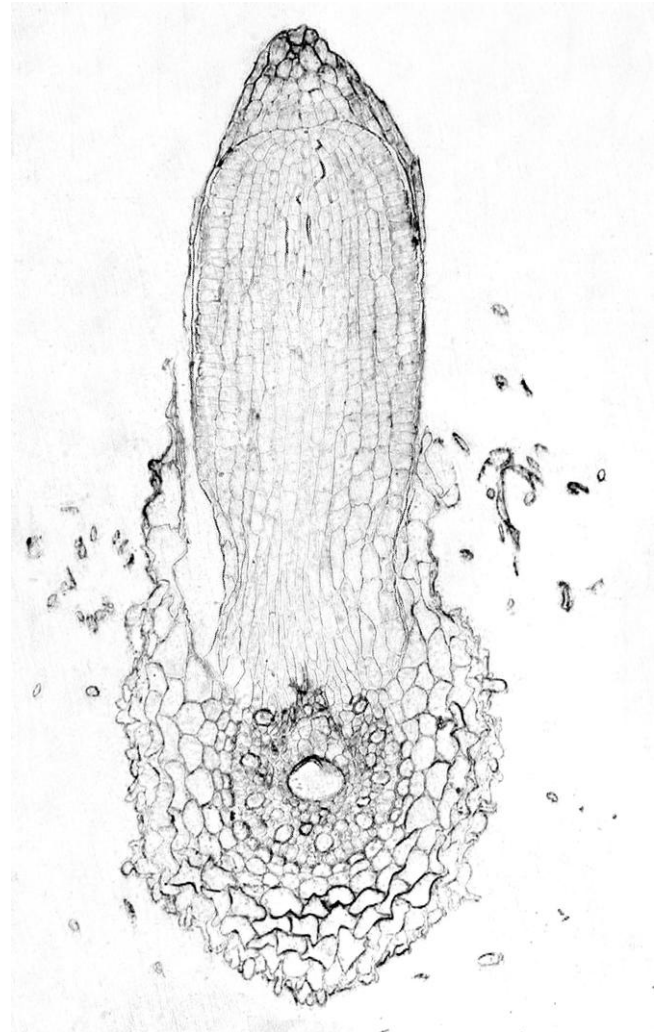


Рис.5. Иммулокализация PIP 2;2 аквапоринов в примордии корней растений ячменя сорта Прерия, выращенных на 10% X-A (контроль).

Таким образом, полученные нами результаты позволяют объяснить противоречие данных литературы о реакции корневой системы растений на дефицит воды тем, что характер этой реакции зависит от напряженности и длительности стрессового воздействия. На фоне умеренного дефицита воды реализуется стратегия, обеспечивающая поглощение воды корнями (повышение гидравлической проводимости и усиление ветвления), а на фоне сильного дефицита воды – стратегия экономии воды (уменьшение транспирационных потерь и, соответственно, снижение ветвления и гидравлической проводимости). Оценка концентрации АБК при умеренном и сильном дефиците воды позволила предположить, что АБК играет двойственную роль в зависимости от уровня ее накопления в ответ на

дефицит воды разной напряженности. В результате непосредственного действия этого гормона на активность аквапоринов гидравлическая проводимость увеличивается при умеренном дефиците воды, а его ингибирующее действие на ветвление опосредованно снижает способность корней поглощать и проводить воду.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ №14-04-97077.

Цитированная литература

1. Веселов С.Ю., Вальке Р.С., Ван Онкелен Х., Кудоярова Г.Р. Содержание и локализация цитокининов в листьях исходных и трансгенных растений табака // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 1. С. 326-335.
2. Иванов И.И. Влияние локального повышения концентрации ионов питательной среды на содержание индолилуксусной, абсцизовой кислот и ветвление корней пшеницы // Физиология и биохимия культурных растений. 2011. Т. 43. № 4. С. 332-338.
3. Кудоярова Г.Р., Веселов Д.С., Шарипова Г.В., Ахиярова Г.Р., Dodd I.C., Веселов С.Ю. Водный обмен и рост исходных и дефицитных по абк мутантных растений ячменя при повышении температуры воздуха // Физиология растений. 2014. Т. 61. № 2. С. 207-2013.
4. Патурицкий А. Комплексный подход к оценке исходного и селекционного материала яровой пшеницы на высокую потенциальную продуктивность и засухоустойчивость // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. 2007. № 4. С. 57-64.
5. Площинская М.Е., Иванов В.Б., Салмин С.А., Быстрова Е.И. Анализ возможных механизмов регуляции ветвления корня // Журнал общей биологии. 2002. Т. 63. № 2. С. 68-74.
6. Шарипова Г.В., Веселова С.В., Веселов Д.С. Динамика показателей водного обмена у растений ячменя на фоне умеренного осмотического стресса // Биомика. 2013. Т. 5. № 3-4. С. 130-135.
7. Шарипова Г.В., Веселов Д.С., Кудоярова Г.Р., Katsuhara M., Furuichi T., Веселов С.Ю. Выявление связи между гидравлической проводимостью и содержанием аквапоринов плазмолеммы с помощью их гистохимической локализации // Биомика. 2014. Т. 6, № 2. С. 64-67.
8. Штратникова В., Кулаева О. Цитокинин-зависимая экспрессия ARR5::GUS-конструкции в ходе роста трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 842-850.
9. Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. P. 43-57.
10. Brovko F, Vasil'eva V., Shepelyakovskaya A., Selivankina S., Kudoyarova G., Nosov A., Moshkov D., Laman A., Boziev K., Kusnetsov V., Kulaeva O. Cytokinin-binding protein (70 kDa): localization in tissues and cells of etiolated maize seedlings and its putative function // J. Exp. Bot. 2007. V. 58. P. 2479-2490.
11. Casimiro I., Beekman T., Graham N., Bhalarao R., Zhang H., Casero P., Sandberg G., Bennett M. Dissecting arabidopsis lateral root development // Trends Plant Sci. 2003. V. 8. P. 165-171.
12. De Smet I., Zhang H., Inzé D., Beeckman T. A novel role for abscisic acid emerges from underground // Trends Plant Sci. 2006. V. 11. P. 434-439.
13. Fan X.; Li F., Xiong Y., An L., Long R. The cooperative relation between non-hydraulic root signals and osmotic adjustment under water stress improves grain formation for spring wheat varieties // Physiol. Plant. 2008. V. 132. P. 283-292.
14. Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S. Plant drought stress: effects, mechanisms and management // Sustain. Agricult. 2009. V. 29. P. 153-188.
15. Hodge A. Roots: the acquisition of water and nutrients from the heterogeneous soil environment // Progress in Botany. 2010. V. 71. P. 307-337.
16. Huang J., Han B., Xu S., Zhou M., Shen W. Heme oxygenase-1 is involved in the cytokinin-induced alleviation of senescence in detached wheat leaves during dark incubation // J. Plant Physiol. 2011. V. 168. P. 768-775
17. Liang Y., Mitchell D., Harris J. Abscisic acid rescues the root meristem defects of the *Medicago truncatula* latd mutant // Develop. Biol. 2007. V. 304. P. 297-307.
18. Lovisolo C., Tramontinia S., Flexasc J., Schuberta A. Mercurial inhibition of root hydraulic conductance in *Vitis* spp. rootstocks under water stress // Environ. Exp. Bot. 2008. V. 63. P. 178-182.
19. Mahdieh M., Mostajeran A., Horie T., Katsuhara M. Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants // Plant Cell. Physiol. 2008. V. 49. P. 801-813.
20. Parent B., Hachez C., Redondo E., Simonneau T., Chaumont F., Tardieu F. Plant physiology drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach // Plant Physiol. 2009. V. 149. P. 2000-2012.
21. Rivero R., Gimeno J., Deynze A., Walia H., Blumwald E. Enhanced cytokinin synthesis in tobacco

plants expressing PSARK::IPT prevents the degradation of photosynthetic protein complexes during drought // *Plant Cell. Physiol.* 2010. V. 51. P. 1929-1941.

22. Ruiz-Lozano J., Alguacil M., Bárzana G., Vernieri P., Aroca R. Exogenous ABA accentuates the differences in root hydraulic properties between mycorrhizal and non mycorrhizal maize plants through regulation of PIP aquaporins // *Plant Mol. Biol.* 2009. V. 70. P. 565-579.

23. Steudle E. Water uptake by roots: effects of water deficits // *J Exp Bot.* 2000. V.51. P. 1531–1542.

24. Tardieu F., Parent B., Simonneau T. Control of leaf growth by abscisic acid: hydraulic or non-hydraulic processes? // *Plant Cell. Environ.* 2010. V. 33. P. 636–647.

25. Teale W.D., Paponov I.A., Ditungou F., Palme K Auxin and the developing root of *Arabidopsis thaliana* // *Physiol. Plant.* 2005. V. 123. P. 130–138.

26. Werner T., Nehnevajova E., Köllmer I., Novák O., Strnad M., Krämer U., Schmölling T. Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in arabidopsis and tobacco // *Plant Cell.* 2010. V. 22. P. 3905-3920.

27. Xiong L., Wang R-G., Mao G., Koczan J.M. Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid // *Plant Physiol.* 2006. V. 142. P. 1065-1074.

28. Yoon E., Yang J., Lee W. Auxin and abscisic acid responses of auxin response factor 3 in arabidopsis lateral root development // *J. Plant Biol.* 2010. V. 53. P. 150-154.

THE INFLUENCE OF INTENSITY OF DROUGHT ON FORMATION OF LATERAL ROOTS OF BARLEY AND CONTENT OF PLANT HORMONES

Veselov D.S., Sharipova G.V., Kudoyarova G.R., Anokhina N.L.

Ufa Institute of Biology of Russian Academy of Sciences, Ufa, e-mail: veselov@anrb.ru

Resume

Influence of drought on lateral roots development of barley and role of plant hormones in this process were investigated. The growth reaction of roots to strong and weak water deficit was different. Slight deficit enhanced roots branching but effect of severe stress was inhibitory. ABA increased of activity of aquaporines and hydraulic conductivity at weak water deficit. On the other hand, abscisic acid inhibited roots branching at strong drought.

Keywords: barley, water deficit, lateral roots, phytohormones, immunolocalization