

## ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВОДНОГО ОБМЕНА У РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ НА ФОНЕ УМЕРЕННОГО ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

Шарипова Г.В.,<sup>1</sup> Веселова С.В.,<sup>2</sup> Веселов Д.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, e-mail: [g.v.sharipova@mail.ru](mailto:g.v.sharipova@mail.ru)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа

### Резюме

В статье описаны результаты изучения динамики показателей водного обмена у растений ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорт Прерия) на фоне умеренного осмотического стресса. Водный дефицит создавали с помощью 6%-ного раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000). Исследования проводились в лабораторных условиях в водной культуре. Для выявления возможного вклада водных каналов аквапоринов в снижение гидравлической проводимости под влиянием ПЭГ, растения ячменя обрабатывали реактивом Фентона. Под влиянием умеренного осмотического стресса сначала наблюдали снижение транспирации и гидравлической проводимости. Затем эти показатели водного обмена возрастали, что совпадало с накоплением осмотически активных веществ в корнях растений. Продолжительное действие осмотического стресса стимулировало удлинение корней, уменьшало их диаметр и ускоряло формирование ксилемных сосудов. Делается вывод о том, что растения активно регулируют водный обмен при умеренном осмотическом стрессе с помощью водных каналов аквапоринов, осмотического приспособления и изменения морфологии корня.

**Ключевые слова:** *Hordeum vulgare* L., дефицит воды, осмотическая регуляция, гидравлическая проводимость, аквапорины, морфология корней

### Введение

Регуляция водного обмена жизненно важна для поддержания роста и урожайности растений в изменяющихся условиях внешней среды. Дефицит воды в почве — один из наиболее важных неблагоприятных факторов, и растения испытывают его чаще, чем другие внешние воздействия. Поэтому изучение адаптивных реакций, обеспечивающих поддержание водного баланса в условиях засухи, привлекает внимание многих исследователей. При этом основные усилия сосредоточены на изучении механизмов ограничения потерь воды путем закрытия устьиц [см. например, обзор Roelfsema, Hedrich, 2005]. Вместе с тем, водный баланс зависит от соотношения скорости потери и поглощения воды, и поэтому механизмы, обеспечивающие поглощение воды, не менее важны, чем те, благодаря которым ограничиваются транспирационные потери при дефиците воды.

Рассуждения о том, что поглощение воды зависит от роста корней, их осмотического потенциала и гидравлической проводимости, можно найти в любом учебнике по физиологии растений. Тем не менее, число экспериментальных работ, посвященных механизмам регуляции поглощения воды при ее дефиците, намного уступает публикациям по регуляции устьичной проводимости и транспирации. Лишь открытие водных каналов аквапоринов повысило интерес к изучению поглощения воды при ее дефиците [см. ссылки обзора Maurel et al., 2008]. Тем не менее, данные о вкладе пропускной способности аквапоринов в гидравлическую проводимость довольно противоречивы [Agosa et al., 2012]. Это может быть связано с тем, что в данных работах по аквапоринам не учитывались влияния морфологии корней, формирования апопластных барьеров и размера ксилемных сосудов на способность корней

проводить воду. В нашей работе мы попытались оценить в одной серии экспериментов одновременно динамику ряда показателей, определяющих водные отношения, у растений ячменя, оказавшихся в условиях дефицита воды.

### 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 сут на дистиллированной воде с добавлением  $10^{-5}$ М CaCl<sub>2</sub>, при температуре 24°С. Трехсуточные проростки пересаживали на 10%-ную среду Хогланда-Арнона-I и выращивали при освещенности 18 клк и 14 часовой продолжительности светового дня.

На седьмые сутки все растения разделили на две группы. Растения первой группы продолжали расти на 10%-ном растворе Хогланда-Арнона-I (контроль), растения второй группы перенесли на раствор 6% полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ) растворенного в 10%-ном растворе Хогланда-Арнона-I.

Сбор образцов для изучения автофлуоресценции лигнина в тканях корня проводили через 3 суток после добавления в среду ПЭГ.

Часть корня ячменя длиной 0,5 см, находящуюся на расстоянии 1,5-2 см от кончика корня, фиксировали в 4%-ном растворе карбодиимида (Sigma, Япония). Дегидратацию образцов проводили в серии разведений этанола (30%, 50%, 70%, 80%, 96%). Затем корень заключали в гидрофильную метакрилатную смолу GB-4 (Electron Microscopy Sciences, США). С помощью ультрамикротомы готовили гистологические срезы толщиной 1,5 микрон.

Автофлуоресценцию лигнина исследовали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа (ЛСКМ) LSM-510 на базе инвертированного микроскопа Axiovert 200M («Carl Zeiss», Германия). Для возбуждения автофлуоресценции использовали аргоновый лазер 30 мВт с длиной волны 488 нм, дихроичным

зеркалом 490 нм и пропускающим светофильтром 505 нм.

Часть растений контрольного варианта и варианта испытывающего водный дефицит (растущих на 6% растворе ПЭГ 6000) с целью блокирования аквапоринов оставляли на растворе Фентона (смесь соли двухвалентного железа и перекиси водорода). В результате реакции Фентона образуется очень реакционно активный гидроксид радикал, который, вступая в реакцию с белками, в частности с аквапоринами, нарушает их функционирование.

Водный потенциал листа измеряли через 1,5 часа после добавления в среду раствора Фентона с помощью психрометра "Psypro" (Wescor, USA), осмотический потенциал – с помощью криоосмометра (Osmomat 030, Германия).

Общую гидравлическую проводимость на пути воды из корней в листья (L) – по аналогии с законом Ома рассчитывали по формуле:

$$L = T / (\Psi_s - \Psi_l) m,$$

где T – транспирация, m - вес корней,  $\Psi_s$  и  $\Psi_l$  – водный потенциал питательного раствора и листа соответственно [модифицировано по Bunce, Ziska, 1998].

Транспирацию оценивали гравиметрически по потере веса стаканчиком с семью растениями. Стаканчики прикрывали фольгой для предотвращения испарения воды.

Опыты повторяли 3 раза по 3-5 биологических повторностях в каждом опыте. На рисунках и таблицах представлены средние всех значений и их ошибки.

### Результаты и их обсуждение

На второй день после добавления ПЭГ в питательную среду водный потенциал листьев был на 0,17 МПа ниже, чем у контрольных растений ячменя (таблица 1). Это снижение водного потенциала листа более чем компенсировало уменьшение осмотического потенциала питательного раствора, который упал от -0,02 МПа в контроле до -0,11 МПа в результате добавления осмотика.

Таблица 1

Водный потенциал побегов ( $\Psi$ ) и гидравлическая проводимость (L) растений ячменя (сорт Прерия) через 2 и 3 суток действия ПЭГ 6000

		2 сутки	3 сутки
Водный потенциал, МПа	Контроль	-0,15±0,07	-0,15±0,04
	ПЭГ	-0,32±0,06	-0,24±0,05
Гидравлическая проводимость, растение <sup>-1</sup> *ч <sup>-1</sup> *МПа <sup>-1</sup>	Контроль	766±48	988±122
	ПЭГ	365±47	971±158

Таким образом, осмотический стресс не уменьшал движущую силу потока воды из питательного раствора: градиент между водным потенциалом листа и раствора даже слегка увеличился. Тем не менее, скорость транспирации снижалась под влиянием дефицита воды (рис. 1). Как известно, по аналогии с законом Ома скорость потока воды определяется не только градиентом водного потенциала, но и гидравлической проводимостью.

Снижение транспирации под влиянием осмотического стресса указывало на возможное снижение гидравлической проводимости, а ее расчет подтвердил это предположение (таблица 1). Как видно из таблицы через день после добавления ПЭГ в питательную среду гидравлическая проводимость растений была почти в два раза ниже, чем в контроле.

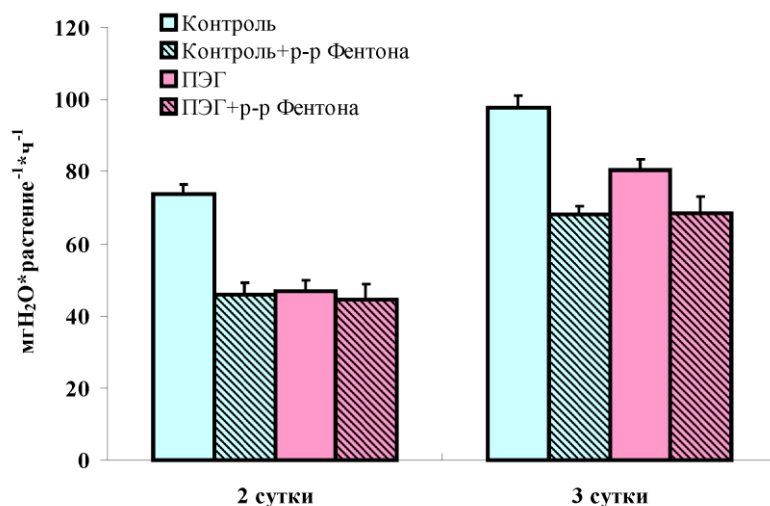


Рис. 1. Транспирация ( $\text{мг H}_2\text{O} \cdot \text{растение}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ ) растений ячменя сорта Прерия через 2 и 3 суток действия полиэтиленгликоля 6000

Хорошо известно, что гидравлическая проводимость зависит от активности аквапоринов. Чтобы выявить возможный вклад водных каналов в снижение гидравлической проводимости под влиянием ПЭГ, мы обработали растения ячменя реактивом Фентона. Известно, что активные формы кислорода, образующиеся под влиянием компонентов этого реактива, инактивируют аквапорины [Heinen et al., 2009]. В результате инактивации аквапоринов под влиянием реактива Фентона транспирация контрольных растений снижалась до уровня растений, росших на среде с ПЭГ (рис. 1). При этом реактив Фентона не влиял на транспирацию последних растений, испытывавших дефицит воды. Эти результаты указывают на исходно низкую активность аквапоринов у растений ячменя на вторые сутки после начала воздействия дефицита воды. Наши результаты соответствуют данным литературы о том, что осмотический стресс может приводить к инактивации аквапоринов [Johansson et al., 1998].

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что снижение транспирации было следствием реакции аквапоринов на появление в питательной среде осмотика. Полученные нами результаты не

позволяют сделать заключения о том, что послужило сигналом для закрытия устьиц. Эту роль могли играть как гидравлический, так и гормональные сигналы. Ответ на этот вопрос могут дать дальнейшие исследования. На данном этапе важны последствия зарегистрированных нами реакций. Так снижение транспирации позволяет растению экономить воду при ее дефиците, что считается важной адаптивной реакцией [Kholova et al., 2010], а снижение гидравлической проводимости корней повышает их водоудерживающую способность [Taleisnik et al., 1999].

Представляло интерес проследить, меняются ли показатели водного обмена растений со временем действия дефицита воды. Из таблицы 1 и рисунка 1 видно, что на третий день после добавления ПЭГ в питательный раствор водный потенциал листа и уровень транспирации возросли по сравнению с предыдущим днем. При этом водный потенциал был все же ниже, чем в контроле, но к этому сроку было зарегистрировано понижение осмотического потенциала листа под влиянием ПЭГ (табл. 2). В результате тургор клеток листа, который рассчитывается как разница между осмотическим и водным потенциалом листа, был одинаковым в контроле и опыте (1,2 МПа). Поддержание тургора

за счет осмотической регуляции – важная адаптивная реакция [Zhang et al., 1999], и судя по нашим данным, она довольно рано реализовалась у

растений ячменя на фоне действия ПЭГ, что соответствует ранее полученным результатам.

Таблица 2

Осмотический потенциал ( $\pi$ ) и тургор (Р) растений ячменя (сорт Прерия) через 2 суток действия ПЭГ 6000

		побег	корень
Осмотический потенциал, МПа	Контроль	-1,35±0,05	-0,63±0,02
	ПЭГ	<b>-1,48±0,04</b>	<b>-1,07±0,02</b>
Тургор, МПа	Контроль	-1,20±0,04	не измеряли
	ПЭГ	-1,16±0,05	не измеряли

Постепенное возрастание транспирации растений ячменя при действии ПЭГ (рис. 1), очевидно, было следствием увеличения гидравлической проводимости, которая возросла со временем до уровня контроля (табл. 1). К этому сроку было зарегистрировано проявление чувствительности транспирации к добавлению в среду реактива Фентона не только у контрольных, но и у опытных растений (рис. 1). Эти результаты свидетельствуют о том, что в процессе адаптации растений к дефициту воды активность аквапоринов возрастала. Важно на наш взгляд то, что на третий день после начала действия дефицита воды, в корнях резко возросло количество осмотически активных веществ, на что указывало снижение осмотического потенциала корней. Это было важно для поддержания водоудерживающей способности корней, погруженных в раствор осмотика: данная реакция компенсировала возрастание гидравлической проводимости. Наши результаты соответствуют данным литературы о том, что повышение активности аквапоринов в корнях происходит на фоне накопления осмотически активных веществ [Zhu et al., 2005].

Возрастание способности корней проводить воду на фоне ее дефицита поддерживало транспирацию и предотвращало закрытие устьиц, что важно для сохранения нормального газообмена. Но почему при одинаковой гидравлической проводимости у опытных и контрольных растений, при дефиците воды транспирация, хотя и возрастала, все же не достигала уровня контроля? Мы попытались получить ответ на этот вопрос, сравнивая морфологию и анатомию корней в норме и при дефиците воды.

Как видно из таблицы 3 дефицит воды снижал вес корней на 20%. При этом их длина возрастала. Стимуляция удлинения корней является адаптивной реакцией, позволяющей растению поглощать воду из глубины почвы при подсыхании ее верхних слоев. Однако в гидропонической

культуре эта реакция не давала растениям преимущества. Как видно на фотографии (рис. 2) поперечного среза корней растений, росших на фоне ПЭГ, диаметр всего корня и, главное, - ксилемных сосудов был меньше, чем в контроле. Известно, что проведение воды зависит от диаметра сосудов и снижается при его уменьшении [Dodd et al., 2008]. В какой-то мере отрицательные последствия могло компенсировать уменьшение радиуса корней. Поскольку считается, что гидравлическое сопротивление на этом отрезке (от поверхности корней до сосудов) велико, уменьшение диаметра корней могло в какой-то мере компенсировать уменьшение диаметра сосудов. Тем не менее, способность корневой системы в целом проводить воду, видимо все же была ниже, чем в контроле. Эта особенность корней дефицитного варианта могла нивелироваться при подсчете гидравлической проводимости на массу корней. Эти результаты позволяют объяснить более низкую транспирацию растений на фоне дефицита воды.

Таблица 3

Масса и суммарная длина корней одного растения ячменя (сорт Прерия) через 3 суток действия ПЭГ 6000

	масса, мг	длина, мм
Контроль	62±4	351±15
ПЭГ	50±4	425±16

Измерение аутофлюоресценции фенольных соединений клеточной стенки не выявило ярких различий в скорости формирования поясков Каспари в области эндодермы, хотя тенденция к ускорению этого процесса на фоне дефицита воды все же прослеживается (рис. 2). Кроме того, наблюдалось более интенсивное свечение в области клеточных стенок ксилемных сосудов в корнях обработанных ПЭГ растений, что указывает на ускорение их дифференциации под влиянием дефицита воды.

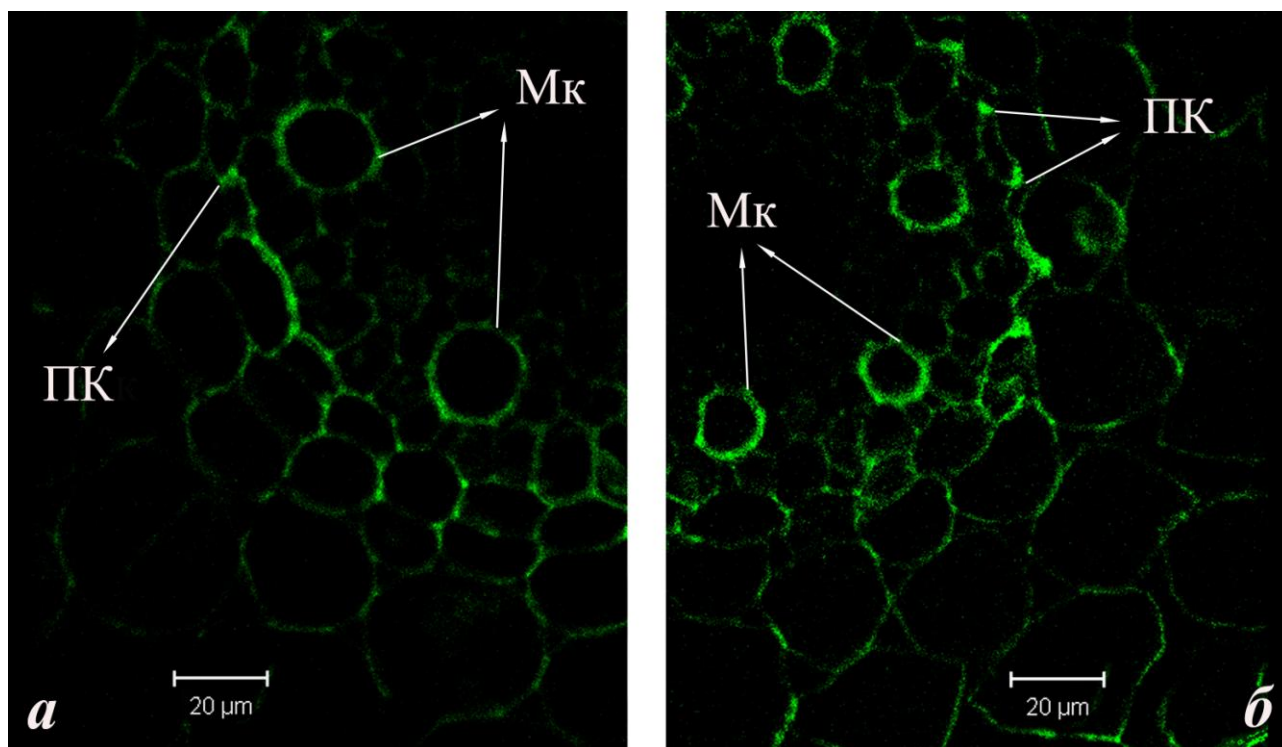


Рис. 2. Автофлуоресценция лигнина на поперечных срезах корня ячменя сорта Прерия (1,5-2 см от кончика корня) через трое суток после добавления в питательную среду ПЭГ 6000 а-контроль; б-обработка ПЭГ 6000; Мк-метаксилема; ПК-поояски Каспари

Таким образом, нами показано, что растение активно реагирует на присутствие осмотически активных веществ в питательной среде, приводящее к снижению доступности воды. Под влиянием дефицита воды активность аквапоринов и гидравлическая проводимость сначала резко снижается, что приводит к уменьшению транспирации и повышению водоудерживающей способности корней. Затем способность растения проводить воду возрастает за счет активации водных каналов, что происходит на фоне осмотической регуляции, обеспечивающей поддержание тургора листьев и водоудерживающей способности корней. При этом происходит изменение морфологии корней, направленное на ускорение их удлинения, что сопровождается уменьшением диаметра самих корней и ксилемных сосудов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 12-04-01111.

#### Литература

1. Roelfsema M.R.G., Hedrich R. In the light of stomatal opening: new insights into

‘theWatergate’ // *New Phytologist*. 2005. V. 167. P. 665–691.

2. Maurel C., Verdoucq L., Luu D.T., Santoni V. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2008. V. 59. P. 595–624.
3. 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.
4. Heinen R.B., Ye Q., Chaumont F. Role of aquaporins in leaf physiology // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 2971–2985.
5. Johansson I., Karlsson M., Shukla V.K., Chrispeels M.J., Larsson C., Kjellbom P. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation // *Plant Cell*. 1998. V. 10. P. 451–459.
6. Kholova J., Hash C.T., Kakkera A., Kocova M., Vadez V. Constitutive water-conserving mechanisms are correlated with the terminal drought tolerance of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. P. 369–377.

7. Taleisnik E., Peyrano G., Cordoba A., Arias C. Water retention capacity in root segments differing in the degree of exodermis development // Ann. Bot. 1999. V. 83. P. 19–27.
8. Zhang J., Nguyen H.T., Blum A. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants // J. Exp. Bot. 1999. V. 50. P. 292–302.
9. Zhu C., Schraut D., Hartung W., Schaffner A.R. Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 2971–2981.
10. Dodd I.C., Ferguson B.J., Beveridge C.A. Apical wilting and petiole xylem vessel diameter of the rms2 branching mutant of pea are shoot controlled and independent of a long-distance signal regulating branching // Plant Cell Physiol. 2008. V. 49. P. 791–800.
11. Steudle E., Jeschke W.D. Water transport in barley roots // Planta. 1983. V. 158. P. 237–248.

#### DYNAMICS OF FEATURES OF A WATER EXCHANGE DURING MODERATE OSMOTIC STRESS

Sharipova G.V.<sup>1</sup>, Veselova S.V.<sup>2</sup>, Veselov D.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biology of Ufa Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia; [g.v.sharipova@mail.ru](mailto:g.v.sharipova@mail.ru)

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

#### Resume

The article addresses influence of moderate osmotic stress on water status in barley plants (*Hordeum vulgare* L., cv. Prairie). Water deficit was created by 6% solution of polyethylene glycol (PEG 6000). To identify the possible contribution of aquaporins in the reduction of hydraulic conductivity under the effect of PEG the barley plants were treated with Fenton's reagent. Active water exchange regulation by plants under moderate osmotic stress via aquaporins, osmotic adaptation and changes in the morphology of the root is discussed.

**Keywords:** *Hordeum vulgare* L., water deficit, osmotic regulation, hydraulic conductance, aquaporins, root morphology