

## РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПЕРЕНОСА ВОДЫ В КОРНЕ КУКУРУЗЫ В УСЛОВИЯХ ВОДНОГО СТРЕССА

©2013 И.Ф. Ионенко, Т.А. Сибгатуллин., Г.А. Великанов

Институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, г. Казань

Поступила 09.06.2013

В данной статье представлены результаты исследования влияния водного стресса, ингибиторов канальных белков на водопроницаемость тонопласта методом импульсного ЯМР.

**Ключевые слова:** диффузионный транспорт воды, проницаемость мембран, аквапорины, тонопласт, метод ЯМР.

Все наземные растения в процессе своего развития в той или иной степени подвергаются воздействию водного дефицита, приводящего к дисбалансу между поглощением воды корнями и потерей воды во время транспирации. Не смотря на то, что проблеме регуляции водообмена растений в условиях водного дефицита уделялось и уделяется много внимания, многие вопросы остаются открытыми. Невыясненными до сих пор остаются механизмы, ведущие к изменению гидравлической проводимости корней при водном стрессе, а имеющаяся информация о характере изменения корневой гидравлики весьма разноречива. В последние годы появились данные о том, что в основе быстрых изменений проводимости корней при действии различных стимулов лежит изменение активности аквапоринов [1-3]. Однако функции и роль аквапоринов при стрессах остаются недостаточно понятными. Так, изменения аквапориновой активности не всегда коррелируют с изменением гидравлической проводимости мембран и уровнем устойчивости растений к стрессу. Водный стресс, как оказалось, повышает активность одних аквапоринов, и понижает активность других [4]. Наиболее убедительные доказательства роли аквапоринов при водном стрессе не касаются первичных ответных реакций, а относятся главным образом к процессам восстановления ростовых функций после стресса [5]. При этом имеющиеся в литературе данные касаются в основном изменения проницаемости аквапоринов плазмалеммы и отсутствуют данные о ранних изменениях водопроницаемости тонопласта по мере развития водного стресса.

Одной из основных причин недостаточности информации по вышеуказанным проблемам является отсутствие методов, чувствительных к изменению потока воды через водные каналы, которые позволили бы адекватно оценить вклад разных путей переноса воды в корне. Известные методы определения гидравлической проводимости (камера и

датчик давления, минипотометры) дают величины усредненного потока без учета вклада разных путей. В этом отношении метод импульсного ЯМР зарекомендовал себя в качестве информативного и удобного метода для исследования водно-транспортной активности аквапоринов [6, 7].

Целью данной работы было исследовать ранние изменения водопроницаемости мембран (прежде всего, тонопласта) в корнях целых растений при действии водного (осмотического) стресса и выявить вклад трансмембранного переноса воды через аквапорины в ответной реакции корней на стресс.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили 7-дневные проростки кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Краснодарский, выращенные на гидропонике (раствор Хогланда-Арнона, 1:4) в контролируемых условиях при температуре  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , освещенности  $40 \text{ Вт/м}^2$  и 12-часовом фотопериоде.

Схема эксперимента заключалась в воздействии на кончики корней интактных проростков кукурузы раствора ПЭГ-6000, осмотическое давление которого составляло  $-0,5 \text{ МПа}$ , для создания водного стресса и последующей регистрации методом ЯМР диффузионного переноса воды в выше расположенной зоне корня во временном интервале от нескольких минут до 3 часов. У проростков удаляли зерновки и придаточные корни. Собранные в пучки корни 20-25 проростков помещали в стеклянную ампулу; надземная часть растений находилась вне ампулы. Ампулу с образцом устанавливали в датчике ЯМР-диффузометра перпендикулярно вектору импульсного градиента, что обусловило наблюдение процессов самодиффузии воды в направлении, перпендикулярном продольной оси корня. Через отверстие в нижней части ампулы подавали осмотик (раствор ПЭГ-6000) на высоту 1 см от дна пробирки, а измерения диффузии проводили в выше расположенной зоне корня, удаленной на 5 см от места действия осмотика.

Для выявления роли аквапоринов в ответной реакции корней на водный стресс были использованы три ингибитора, которые вызывают инактивацию аквапоринов в корнях с помощью различных меха-

Ионенко Ирина Феофановна, к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: ionenko@mail.knc.ru; Сибгатуллин Тимур Анварович, к.б.н., научный сотрудник, e-mail: sibgatullin@mail.knc.ru; Великанов Геннадий Алексеевич, д.б.н., проф., ведущий научный сотрудник, e-mail: velikanov@mail.knc.ru

низмов: хлорид ртути (0,1 мМ), нитрат серебра (0,05 мМ), пропионовая кислота (20 мМ). Механизм ингибирующего действия первых двух блокаторов связан с их способностью взаимодействовать с сульфгидрильными группами белков. Различия в их действии могут быть обусловлены различием размеров ионов  $\text{Ag}^+$  и  $\text{Hg}^{2+}$ , а также специфическим взаимодействием  $\text{Ag}^+$  как с цистеиновыми группами (как в случае  $\text{Hg}^{2+}$ ), так и с гистидиновыми участками в устье транспортного белка [8]. Действие пропионовой кислоты связано с ее проникновением в клетку, подкислением цитозоля и последующим закрытием аквапоринов вследствие протонирования гистидиновых групп [9]. Для того чтобы продемонстрировать роль ионных каналов в трансмембранном переносе воды при осмотическом стрессе был использован блокатор калиевых каналов – тетраэтиламмоний хлорид (5 мМ). Концентрация и время инкубации в растворах блокаторов были выбраны в соответствии с данными исследований [7-9].

Измерение диффузионного переноса воды методом ЯМР. Эксперименты проводили на спин-эхо ЯМР-релаксometре-диффузometре на частоте 16 МГц с импульсным градиентом магнитного поля. Диффузию воды измеряли методом ЯМР-стимулированное эхо [10]. В основе данного метода лежит регистрация диффузионного трансляционного пробега молекул воды по объему образца, помеченного градиентом магнитного поля, за определенное время диффузии. Экспериментально измеряли диффузионные затухания сигналов спин-эхо (ДЗ) путем варьирования амплитуды градиентных импульсов магнитного поля ( $g$ ) при фиксированных параметрах: длительности импульсов ( $\delta$ ) и интервала между ними – времени диффузии ( $t_d$ ). Такой вариант регистрации ДЗ позволяет вы-

брать время наблюдения диффузии в той области временной шкалы, когда сигнал спин-эхо будет формироваться только самой медленно релаксирующей фракцией воды, тогда как сигналы от других фракций уже исчезнут [11]. Так для корней кукурузы при времени диффузии вблизи 700 мсек сигнал эха практически полностью формируется молекулами воды, находящимися в вакуолях клеток корней. Измеряемое ДЗ представляет собой неэкспоненциальную зависимость, в которой медленная компонента со скоростями диффузии порядка  $10^{-11} \text{ м}^2/\text{сек}^2$  относится к воде, ограниченной в своем движении проницаемостью мембран (тонопласта). Для количественной оценки диффузионного транспорта воды определялся эффективный коэффициент самодиффузии воды  $D_{\text{ef}}$ , величина которого вычислялась из наклона касательной к начальному и конечному участкам кривой ДЗ посредством известного соотношения:

$$R = \exp[-\gamma^2 \delta^2 g^2 (t_d - 1/3 \delta) D_{\text{ef}}] \quad (1)$$

где  $R$  – относительная амплитуда эха, равная отношению амплитуд эха при включенном и выключенном градиенте магнитного поля,  $A(g)/A(0)$ ,  $\gamma$  – гиромагнитное отношение (постоянная величина, равная  $2,67 \times 10^8 \text{ Г}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ ).

Все эксперименты были выполнены в трехкратной повторности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Действие ПЭГ-индуцированного водного стресса вызвало быстрое и значительное увеличение диффузионного транспорта воды в корне кукурузы: почти двукратное увеличение  $D_{\text{ef}}$ , вычисленного из начального наклона ДЗ, и 30%-ное увеличение  $D_{\text{ef}}$ , вычисленного из медленной компоненты ДЗ (рис. 1).

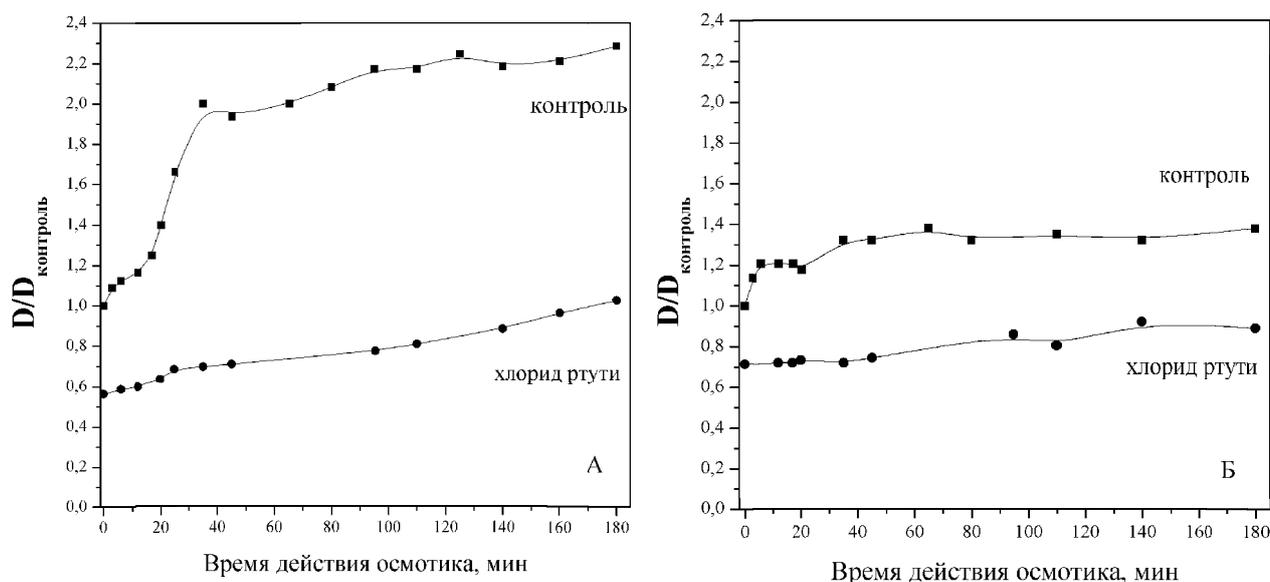
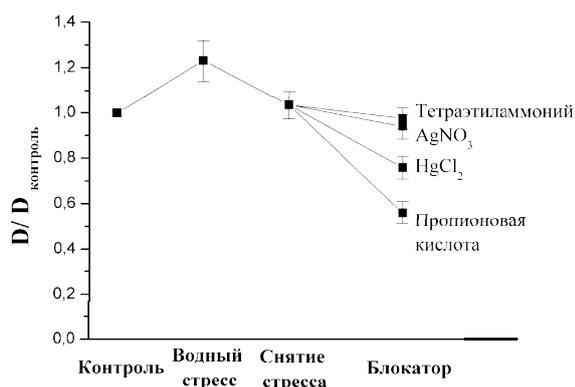


Рис. 1. Влияние водного стресса на диффузионный транспорт воды в корнях интактных проростков кукурузы при  $t_d = 700$  мсек: А – диффузия воды в вакуолярной системе, оцененная из начального участка ДЗ; Б – диффузия воды через тонопласт, оцененная из медленной компоненты ДЗ

Поскольку сигнал намагниченности при времени диффузии 700 мсек формируется от вакуолярной воды, данные зависимости свидетельствуют, скорее всего, об увеличении водопроницаемости тонопласта.

Чтобы проверить, не связаны ли изменения мембранной водопроницаемости при водном стрессе с изменением активности водных и ионных каналов, были проведены опыты с блокаторами различного механизма действия до и после действия осмотика. Показано, что у предварительно обработанных ингибитором аквапоринов ( $\text{HgCl}_2$ ) корней практически отсутствовала реакция на водный стресс (рис. 1). У корней, подвергнутых действию осмотика в течение 1,5 час, сохранялась (а в ряде случаев и повышалась) чувствительность к действию ингибиторов:  $\text{HgCl}_2$  и пропионовой кислоты (рис. 2). Вышесказанное свидетельствует, во-первых, о непосредственном участии в ответной реакции на действие осмотика аквапоринов тонопласта (ТІР) и, во-вторых, о том, что повышение проницаемости тонопласта под действием стресса не связано с нарушением активности ТІР.



**Рис. 2.** Влияние блокаторов водных и ионных каналов на диффузионный транспорт воды в корнях интактных проростков кукурузы, подвергнутых действию водного стресса в течение 1,5 час ( $t_d = 700$  мсек)

Отсутствие ингибирующего эффекта  $\text{AgNO}_3$  на водопроницаемость тонопласта возможно связано с преимущественным эффектом  $\text{Ag}^+$  на уровне плазмалеммы (с внеклеточной стороны) в связи с затрудненным проникновением его в клетку из-за большего по сравнению с  $\text{Hg}^{2+}$  размера. Ртуть, являясь липофильным соединением, легко проникает в клетку через наружную мембрану и блокирует водные каналы тонопласта. Более сильный ингибирующий эффект пропионовой кислоты (рис. 2) обусловлен, по-видимому, быстрым проникновением ее внутрь клетки и протонированием функциональных групп аквапоринов (в т.ч. ТІР). Отсутствие эффекта блокатора ионных (калиевых) каналов — тетраэтиламмония — на  $D_{\text{ef}}$  свидетельствует о незначительной роли калиевых каналов в усилении трансмембранного переноса воды через тонопласт при водном стрессе.

Механизм интенсификации транспорта воды через аквапорины тонопласта при краткосрочном действии осмотика (до 1 час) вероятнее всего связан с повышением активности ТІР, ранее находившихся в неактивном состоянии. В исследованиях, проведенных Li *et al.* [12], сообщалось о значительном увеличении уровня экспрессии аквапоринов тонопласта в корнях риса, вызванным обезвоживанием (15% PEG 6000). У других видов растений также наблюдали повышение активности аквапоринов (прежде всего, плазмалеммы) в ответ на водный стресс [4, 13] и связывали данный ответ с необходимостью усиления потока воды к специфическим органам и клеткам, критическим для выживания растения, а также с необходимостью быстрого восстановления в процессе регидратации.

Полученные результаты дают основание считать, что ранний ответ корней кукурузы на понижение водного потенциала внешней среды заключается в интенсификации диффузионного переноса воды через тонопласт, обусловленной увеличением активности аквапоринов. Такой ответ, запускаемый водным дефицитом за короткий период времени, может иметь адаптивный характер, поскольку обеспечивает поддержание осмотичности (водного потенциала) внутриклеточного матрикса на постоянном уровне.

Работа поддержана грантом РФФИ №13-04-01203.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Javot H., Maurel C. The role of aquaporins in root water uptake // *Ann. Bot.* 2002. V. 90. P. 301-313.
2. Maurel C., Verdoucq L., Luu D.T., Santoni V. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008. V. 59. P. 595-624.
3. Sutka M., Li G., Boudet J., Boursiac Y., Doumas P., Maurel Ch. Natural variation of root hydraulics in Arabidopsis grown in normal and salt-stressed conditions // *Plant Physiol.* 2011. V. 155. P. 1264-1276.
4. Aroca R., Porcel R., Ruiz-Lozano J.M. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. P. 43-57.
5. Martre P., Morillon R., Barrieu F., North G.B., Nobel P.S., Chrispeels M.J. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit // *Plant Physiol.* 2002. V. 130. P. 2101-2110.
6. Ionenko I.F., Anisimov A.V., Dautova N.R. Effect of temperature on water transport through aquaporins // *Biol. Plant.* 2010. V. 54. P. 488-494.
7. Ionenko I.F., Dautova N.R., Anisimov A.V. Early changes of water diffusional transfer in maize roots under the influence of water stress // *Environ. Exp. Bot.* 2012. V. 76. P. 16-23.
8. Sadok W., Sinclair Th.R. Transpiration response of 'slow-wilting' and commercial soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genotypes to three aquaporin inhibitors // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. P. 821-829.
9. Ehlerl Ch., Maurel Ch., Tardieu F., Simonneau Th. Aquaporin-Mediated Reduction in Maize Root Hydraulic Conductivity Impacts Cell Turgor and Leaf Elongation Even without Changing Transpiration // *Plant Physiol.* 2009. V. 150. P. 1093-1104.
10. Tanner J.E. Use of the stimulated echo in NMR diffusion studies // *J. Chem. Physics.* 1970. V. 52. P. 2523-2526.

11. Великанов Г.А. Вакуолярный симпласт и методический подход к контролю самодиффузии воды между вакуолями соседних клеток в корне // Физиол. раст. 2007. Т. 54. С. 770-780.
12. Li G.-W., Peng Y.-H., Yu X., Zhang M.-H., Cai W.-M., Sun W.-N., Su W.-A. Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response to various stresses in rice // J. Plant Physiol. 2008. V. 165. P. 1879-1888.
13. Alexandersson E., Danielson J.A.H., Rade J., Moparthi V.K., Fontes M., Kjellbom P., Johanson U. Transcriptional regulation of aquaporins in accessions of Arabidopsis in response to drought stress // Plant J. 2010. V. 61. P. 650-660.

## **REGULATION OF TRANSMEMBRANE WATER TRANSFER IN MAIZE ROOT UNDER WATER STRESS**

**©2013 I.F. Ionenko, T.A. Sibgatullin, G.A. Velikanov**

Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Sci. Centre of RAS, Kazan

In this article we present the results of study of water stress and channel protein inhibitor effect on tonoplast permeability by pulsed NMR.

**Key words:** *diffusional water transport, membrane permeability, aquaporins, tonoplast, NMR method.*

---

*Ionenko Irina*, Candidate of Biology, senior researcher, e-mail: ionenko@mail.knc.ru; *Sibgatullin Timur*, Candidate of Biology, researcher, e-mail: sibgatullin@mail.knc.ru; *Velikanov Gennady*, Doctor of Biology, professor, leading researcher, e-mail: velikanov@mail.knc.ru.