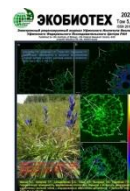




ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>



ЛОКАЛИЗАЦИЯ АКВАПОРИНОВ В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЯСКОВ КАСПАРИ В КОРНЯХ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ

Шарипова Г.В., Ахиярова Г.Р.*, Галин И.Р.,
Кудоярова Г.Р.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

*E-mail: akhayarova@rambler.ru

Движение воды по растению происходит по двум основным каналам. Это транспорт по клеточным стенкам и ксилемным сосудам, называемый апопластным, и от клетки к клетке через мембранные водные каналы аквапорины. Отложение суберина и лигнина в поясках Каспари снижает проводимость апопластного пути. На фоне формирования апопластных барьеров роль транспорта воды через мембраны должна возрасти, о чем упоминается во многих обзорах. Цель данной работы состояла в локализации аквапоринов ячменя семейства HvPIP2 в зонах корня, различающихся по степени дифференциации клеточных стенок и отложению поясков Каспари. Если ближе к кончику корня (на удалении 3-4 см) интенсивность флуоресценции берберина была незначительной, то в базальной его зоне свечение увеличивалось в эндодерме и центральном цилиндре корня, свидетельствуя о высокой лигнификации клеточных стенок и отложении лигнина и суберина в формирующихся поясках Каспари. При локализации аквапоринов с помощью антител к HvPIP2;1, и HvPIP2;5 аквапоринам не было обнаружено различий в их уровне между разными зонами корней. Использование антител против аквапоринов HvPIP2;2 и HvPIP2;3/4 выявило локальное усиление свечения именно в области эндодермы в базальной зоне корня с высоким уровнем лигнификации и суберинизации, что, видимо, должно компенсировать ожидаемое снижение гидравлической проводимости в результате формирования апопластных барьеров. Возможно, роль отдельных представителей аквапоринов в транспорте воды изменяется в зависимости от условий выращивания растений.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare* ♦ Прерия ♦ аквапорины ♦ лигнин ♦ суберин ♦ апопластные барьеры ♦ пояски Каспари

LOCALIZATION OF AQUAPORINS DURING THE FORMATION OF CASPARIAN BANDS IN THE ROOTS OF BARLEY PLANTS

Sharipova G.V., Akhiyarova G.R.*, Galin I.R.,
Kudoyarova G.R.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of
the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

*E-mail: akhayarova@rambler.ru

There are two main pathways for water transport in plants. One of them is water transport along the cell walls and xylem vessels, called apoplastic pathway, and the other is from cell to cell through the membrane water channels aquaporins. Formation of Casparian bands by suberin and lignin deposition reduces conductivity of the apoplastic pathway. So the role of membrane water transport should increase, as mentioned in many reviews. The aim of this research was to localize barley aquaporins of the HvPIP2 family in different root zones depending on the differentiation of cell walls and deposition of Casparian bands. It was shown that the intensity of berberine fluorescence was insignificant in the zone closer to the root tip (at a distance of 3-4 cm), however fluorescence increased in the endodermis and the central cylinder of the root basal zone, indicating high lignification of cell walls and deposition of lignin and suberin in developing Casparian bands. Localization of HvPIP2;1 and HvPIP2;5 aquaporins showed no differences in their level between different root zones. The use of antibodies against aquaporins HvPIP2;2 and HvPIP2;3/4 revealed a local increase in fluorescence in the endodermal region of the basal zone of the roots characterized by high level of lignification and suberinization which apparently should compensate for the expected decrease in hydraulic conductivity as a result of the formation of apoplastic barriers. It is possible that the role of different aquaporins in water transport varies depending on the growing conditions of plants.

Keywords: *Hordeum vulgare* ♦ Preriya ♦ aquaporins ♦ lignin ♦ suberin ♦ apoplastic barriers ♦ Casparian bands

Поступила в редакцию: 30.11.2022

[Цитировать | Cite as](#)

DOI: [10.31163/2618-964X-2022-5-4-168-174](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2022-5-4-168-174)

EDN: RAJCHK



ВВЕДЕНИЕ

Движение воды по растению происходит по двум основным каналам. Это транспорт по клеточным стенкам, межклетникам и ксилемным сосудам, называемый апопластным, и от клетки к клетке через расположенные в мембранах водные каналы аквапорины [Zarebanadkouki et al., 2019]. Движущей силой апопластного транспорта является генерируемый за счет транспирации гидростатический градиент между листом и питательным раствором [Кудоярова и др., 2013]. Первичные клеточные стенки и ксилемные сосуды отличаются высокой гидравлической проводимостью по сравнению с транспортом через мембраны клеток, который поддерживается за счет осмотического градиента [Javot, Maurel, 2002]. Поэтому у молодых транспирирующих проростков доминирует апопластный транспорт, и они отличаются высокой гидравлической проводимостью. Однако по мере дифференциации клеточных стенок и отложения в них суберина и лигнина проводимость апопластного пути снижается [Li et al., 2020]. Особую роль при этом играют состоящие из лигнина пояски Каспари и присутствующие в них ламеллы суберина. На фоне формирования апопластных барьеров роль транспорта воды через мембраны должна возрастать, о чем упоминается во многих обзорах [например, Javot, Maurel, 2002]. Удивительно то, что нам удалось найти крайне мало работ, в которых это положение нашло бы экспериментальное подтверждение, например, путем сравнения формирования апопластных барьеров и уровня аквапоринов в процессе дифференциации корней. В немногих работах, в которых изучалась локализация аквапоринов в корнях, формирование апопластных барьеров не принималось во внимание [Horie et al., 2011]. Лишь в статье Nachez с соавторами [2012] было проведено сравнение локализации аквапоринов у растений кукурузы, которые выращивали с помощью гидро- и аэропоники. При этом отмечалось, что присутствие апопластных барьеров в экзодерме растений, которые росли в условиях аэропоники, сопровождалось повышением уровня аквапоринов во внешних слоях коры корней, в то время как в условиях гидропоники ни апопластные барьеры в экзодерме, ни аквапорины в наружных слоях коры корня не были обнаружены. Вместе с тем, в этой работе не было изучено изменение локализации аквапоринов в процессе формирования апопластных барьеров по мере удаления от кончика корней. Кроме того, в этой работе не удалось выявить различий в распределении аквапоринов между экзодермой и корой, что могло быть связано с тем, что антитела, которые использовали для иммуногистохимической локализации, не были достаточно специфичны. Принимая во внимание все сказанное, цель данной работы состояла в выявлении локализации ряда аквапоринов ячменя (HvPIP2;1, HvPIP2;2, HvPIP2;3/4 и HvPIP2;5) с помощью специфичных антител, полученных к N-концевой последовательности аминокислот этих белков (HvPIP2;1 [Katsuhara et al., 2002], HvPIP2;2 [Horie et al., 2011], HvPIP2;3/4 [Seldimirova et al., 2019] и HvPIP2;5 [Sharipova et al., 2016]). Сравнили их иммуногистохимическую локализацию в разных зонах корня, различающихся по степени дифференциации тканей и отложению поясков Каспари.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия выращивания растений и проведения экспериментов

Исследования проводили на растениях ячменя сорта Прерия (*Hordeum vulgare L.*). Перед проращиванием семена стерилизовали в 2% растворе гипохлорита натрия в течение 10 мин, тщательно промывали и выдерживали в стакане с водопроводной водой при интенсивной аэрации в течение 2 ч. Двое суток семена проращивали на плотках, покрытых влажной фильтровальной бумагой в темноте при комнатной температуре. На следующем этапе проростки пересаживали в горшки (0,5 л) с песком (0,55 кг). На дно каждого горшка насыпали гравий для дренажа и устанавливали стеклянные трубки для обеспечения газообмена. Предварительно песок прокаливали и пропитывали 50% раствором Хогланда-Арнона до 80% от общей влагоемкости. Влажность субстрата поддерживали на уровне 80 %. Растения в горшках выставляли на светоплощадку с 14-часовым фотопериодом, освещенностью $400 \text{ мкмоль м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ФАР и 25/20 °С (день/ночь).

На 6 сутки выращивания растений в песке отбирали образцы тканей корня на удалении 3-4 см от его кончика и из его базальной части для определения отложения лигнина и суберина и для иммуногистохимической локализации аквапоринов.

Определение отложения лигнина и суберина

Оценку отложения лигнина и суберина проводили на поперечных срезах тканей корней. Срезы были получены с помощью вибратора Leica VT1200S («Leica», Дир-Парк, Иллинойс, США) после заливки тканей в 3% раствор агарозы. Лигнин и суберин на гистологических срезах окрашивали водным раствором берберина гемисульфата (0.1% масс./об.) в течение 1 ч. Для усиления флуоресценции срезы докрашивали толуидиновым синим (0.05% масс./об.) 15 мин и промывали дистиллированной водой. Далее на срезы наносили 50% глицерин и накрывали покровным стеклом. Флуоресценцию берберина анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus FluoView FV3000 (Olympus, Токио, Япония) (длины волн возбуждения и эмиссии: 488 нм и 520 нм, соответственно)

Иммуногистохимическая локализация аквапоринов

Ткани корней фиксировали в 4% растворе карбодиимида (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (Merck, Дармштадт, Германия) с последующей дофиксацией в смеси 4% параформальдегида (Riedel de Haen, Зельц, Германия) и 0,1% глютаральдегида (Sigma, Нойштадт, Германия). После этапов обезвоживания в спиртах образцы заключали в смолу JB4 (Electron Microscopy Sciences, Хатфилд, США) и на ротационном ультрамикротоме (HM 325, MICROM Laborgeräte, Вальдорф, Германия) получали гистологические срезы толщиной 1,5 мкм. Перед нанесением специфических антител к аквапоринам срезы обрабатывали в течение 30 мин раствором фосфатно – солевого буфера (ФСБ) (pH7,4) с 0,2% желатина и 0,05% твина-20 (ФЖТ). Поликлональные кроличьи антитела к аквапоринам семейства HvPIP2 (HvPIP2;1, HvPIP2;2, HvPIP2;3/4 и HvPIP2;5) (антитела к аквапоринам были предоставлены Maki Katsuhara (Group of Molecular and Functional Plant Biology, Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, 20-1, Chuo-2-chome, Kurashiki, Okayama, 710-0046 Japan)) разводили в соотношении 1:100 в растворе ФЖТ, наносили на срезы и выдерживали при 4° С в течение ночи. Антитела, полученные к N-концевой области HvPIP2;3 реагировали также с HvPIP2;4 аквапоринами,

поскольку последовательности аминокислот их концевой области были идентичны. Тем не менее, они позволяли специфично выявить эти 2 типа аквапоринов. На следующем этапе срезы многократно промывали в растворе ФСБ с 0,05% твина-20, наносили вторичные антитела против IgG кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 555 (Invitrogen, Рокфорд, США) и инкубировали при 37⁰ С в течение 3 ч. После промывки в ФСБ срезы накрывали покровным стеклом и анализировали на конфокальном микроскопе Olympus FV3000 Fluoview (FV31-HSD) (Olympus, Токио, Япония) (длины волн возбуждения и эмиссии: 561 нм и 568 нм, соответственно).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа изменений отложения лигнина и суберина на поперечных срезах корней на разном удалении от их кончика представлены на рис. 1. Тепловая шкала на рисунке кодирует разную интенсивность флуоресценции берберина (от более слабой – зеленой, до интенсивной – желтой).

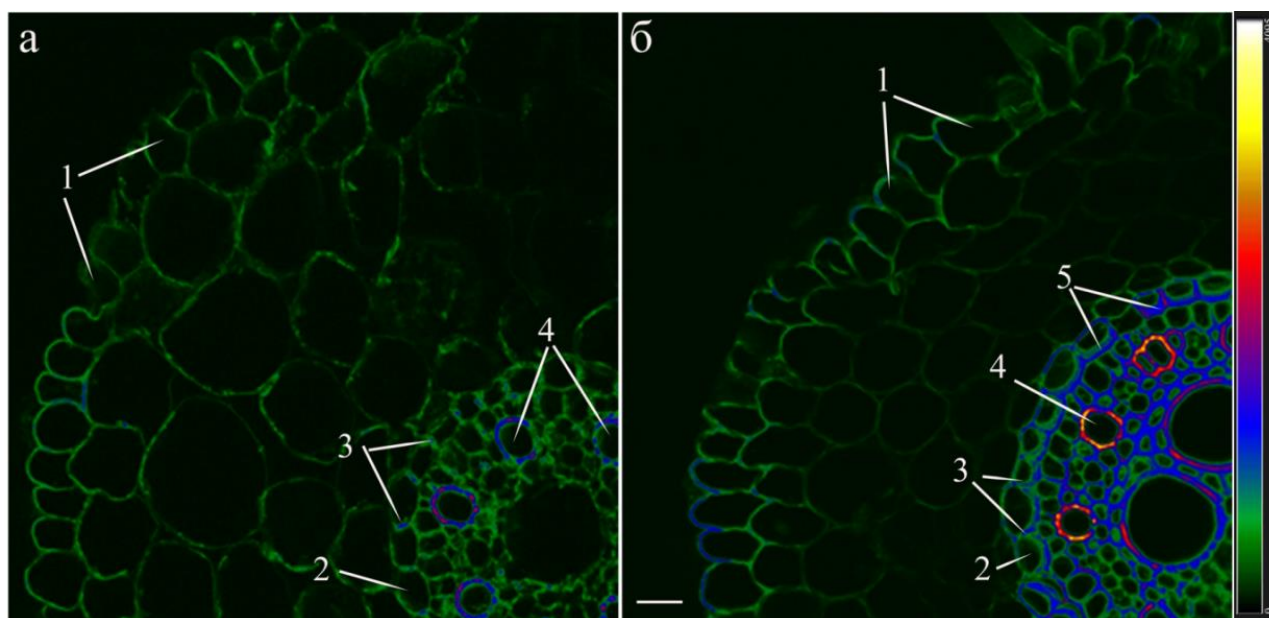


Рис. 1. Локализация лигнина, суберина и выявление поясков Каспари на поперечных срезах корней 8-суточных растений ячменя на удалении 3-4 см от кончика (а) и из базальной части корня (б). Срезы окрашивали 0,1 % берберинем гемисульфатом. Тепловая шкала отображает интенсивность флуоресценции берберина. Линейка соответствует 25 μ m. 1 – экзодерма, 2 – эндодерма, 3 – пояски Каспари, 4 – ксилема, 5 – субериновые ламеллы.

Из рисунка 1а видно, что ближе к кончику корня (на удалении 3-4 см) интенсивность флуоресценции берберина незначительная и представлена в основном в виде зеленого цвета (по шкале интенсивности), что указывает на низкий уровень лигнификации клеточных стенок в данной зоне корня. Флуоресценция стенок ксилемных сосудов была выше, судя по их красному и синему цветовому окрашиванию, отражающему дифференцировку ксилемы с отложившимся в их стенках лигнином. По сравнению с менее дифференцированными тканями кончика корня в базальной его зоне флуоресценция берберина увеличивалась, особенно в эндодерме и центральном цилиндре (рис.1б).

Результаты иммуногистохимической локализации аквапоринов на срезах корней растений ячменя представлены на рисунках 2 и 3. Использование сывороток, содержащих специфические антитела к разным аквапоринам семейства HvPIP2 (HvPIP2;1, HvPIP2;2,

HvPIP2;3/4 и HvPIP2;5) выявило их присутствие в тканях корней растений ячменя на разном удалении от кончика корня. Однако наиболее яркие результаты были получены при сравнении локализации типов HvPIP2;2 (рис.2) и HvPIP2;3/4 (рис.3) аквапоринов.

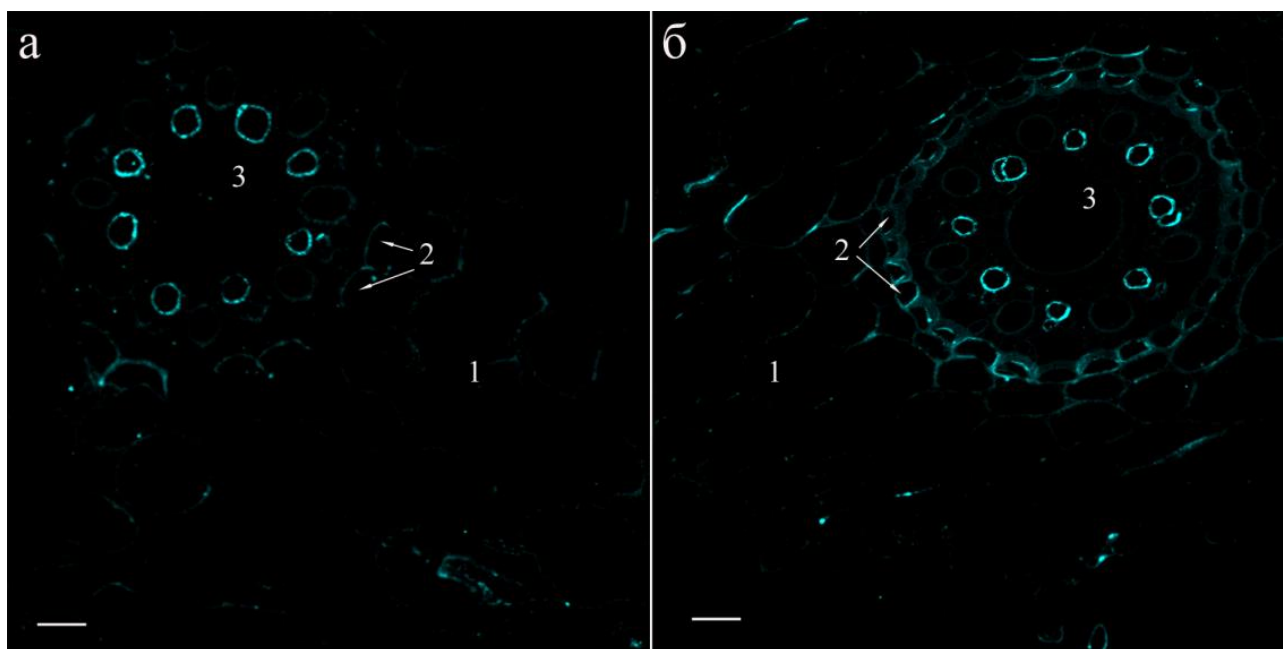


Рис. 2. Иммуногистохимическая локализация HvPIP2;2 аквапоринов на поперечных срезах корней 8 – суточных растений ячменя на удалении 3-4 см от кончика (а) и из базальной части корня (б). Линейка соответствует 25 µm. 1 – кора, 2 – эндодерма, 3 – центральный цилиндр.

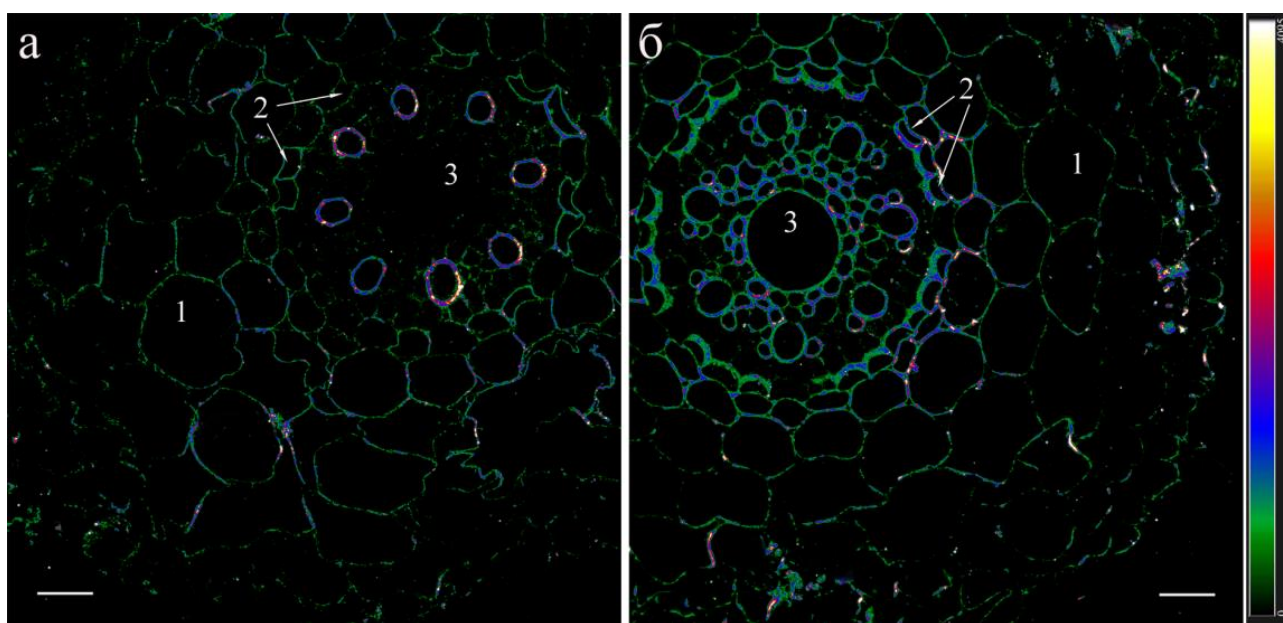


Рис. 3. Иммуногистохимическая локализация HvPIP2;3/4 аквапоринов на поперечных срезах корней 8 – суточных растений ячменя на удалении 3-4 см от кончика (а) и из базальной части корня (б). Тепловая шкала отображает интенсивность флуоресценции. Линейка соответствует 25 µm. 1 – кора, 2 – эндодерма, 3 – центральный цилиндр.

На рисунке 2 показано усиление свечения меченых антител в эндодерме по мере дифференциации тканей корня. Подобно HvPIP2;2, присутствие аквапоринов типа HvPIP2;3/4 заметно увеличивалось в базальной части корня (рис.3). Причем усиление свечения наблюдали не только в области эндодермы, но в клетках центрального цилиндра.

Как видно из анализа полученных нами результатов, по мере формирования апопластных барьеров в эндодерме корней ячменя, в них увеличивался уровень HvPIP2;2 и HvPIP2;3/4 аквапоринов. При локализации аквапоринов с помощью антител к HvPIP2;1, и HvPIP2;5 аквапорином не было обнаружено различий в их уровне между зонами корней с хорошо развитыми поясками Каспари, которые находились в базальной части корней, и менее развитыми – на расстоянии 3-4 см от кончиков корней. При использовании антител против аквапоринов HvPIP2;2 и HvPIP2;3/4 было выявлено локальное усиление свечения именно в области эндодермы, и свечение не было так размыто, как в статье Nachez с соавторами [2012]. Очевидно, четкая локализация аквапоринов в эндодерме дифференцированной части корней была выявлена благодаря использованию в нашей работе специфичных антител к HvPIP2;2 и HvPIP2;3/4 аквапорином. Возможность использования антител против определенных аквапоринов позволила подтвердить, что роль водных каналов аквапоринов возрастает по мере формирования апопластных барьеров. Представляет интерес то, что усиление формирования апопластных барьеров под влиянием инокуляции растений ячменя бактериями штамма *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14 сопровождалось увеличением уровня HvPIP2;5 аквапоринов [Arkhipova et al., 2022], роль которых в транспорте воды через апопластные барьеры не была выявлена в данной работе. При засолении, которое, как известно, стимулирует формирование апопластных барьеров [Martyntenko et al., 2022], наиболее заметно было увеличение уровня HvPIP2;2 в корнях растений ячменя [Sharipova et al., 2022]. Таким образом, роль отдельных представителей аквапоринов в транспорте воды через мембраны изменяется в зависимости от условий выращивания растений.

Наши данные о связи уровня аквапоринов с формированием апопластных барьеров согласуются с данными литературы. Так в работе Wang с соавторами [2019] было показано, что у мутанта с дефектами в структуре апопластных барьеров гидравлическая проводимость ограничивается за счет снижения экспрессии генов, кодирующих аквапорины. В данной работе была продемонстрирована обратная картина: увеличение уровня аквапоринов, которое, наоборот, должно компенсировать снижение гидравлической проводимости в результате формирования апопластных барьеров. Хотя такое предположение высказывалось [Javot, Maurel, 2002], на наш взгляд, до сих пор не было его экспериментального подтверждения.

В работе использована приборная база ЦКП УФИЦ РАН “Агидель”.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 21-14-00070).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудоярова Г.Р., Холодова В.П., Веселов Д.С. Современное состояние проблемы водного баланса растений при дефиците воды // Физиология растений. 2013. Т. 60 (2). С. 1–12. DOI: [10.7868/S0015330313020140](https://doi.org/10.7868/S0015330313020140)
2. Arkhipova T., Sharipova G., Akhiyarova G., Kuzmina L., Galin I., Martyntenko E., Seldimirova O., Nuzhnaya T., Feoktistova A., Timergalin M., Kudoyarova G. The effects of rhizosphere inoculation with *Pseudomonas mandelii* on formation of apoplast barriers, HvPIP2 aquaporins and hydraulic conductance of barley // Microorganisms. 2022. V. 10. P. 935. DOI: [10.3390/microorganisms10050935](https://doi.org/10.3390/microorganisms10050935)

3. 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. DOI: [10.1111/j.1365-3040.2011.02429.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02429.x)
4. Horie T., Kaneko T., Sugimoto G., Sasano S., Panda S.K., Shibasaka M., Katsuhara M. Mechanisms of water transport mediated by pip aquaporins and their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots // *Plant Cell Physiol*. 2011. V. 52 (4). P. 663–675. DOI: [10.1093/pcp/pcr027](https://doi.org/10.1093/pcp/pcr027)
5. Javot H. and Maurel C. The role of aquaporins in root water uptake // *Ann. Bot.* 2002. V. 90. P. 301–313. DOI: [10.1093/aob/mcf199](https://doi.org/10.1093/aob/mcf199)
6. Katsuhara M., Akiyama Y., Koshio K., Shibasaka M., Kasamo K. Functional analysis of water channels in barley roots // *Plant Cell Physiology*. 2002. V. 43. P. 885–893. DOI: [10.1093/pcp/pcf102](https://doi.org/10.1093/pcp/pcf102)
7. Li L., Pan S., Melzer R., Fricke W. Apoplastic barriers, aquaporin gene expression and root and cell hydraulic conductivity in phosphate-limited sheepgrass plants // *Physiol. Plant*. 2020. V. 168. P. 118-132. DOI: [10.1111/ppl.12981](https://doi.org/10.1111/ppl.12981)
8. Martynenko E., Arkhipova T., Safronova V., Seldimirova O., Galin I., Akhtyamova Z., Veselov D., Ivanov R., Kudoyarova G. Effects of phytohormone-producing rhizobacteria on Casparian band formation, ion homeostasis and salt tolerance of durum wheat // *Biomolecules*. 2022. V. 12. P. 230. DOI: [10.3390/biom12020230](https://doi.org/10.3390/biom12020230)
9. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Katsuhara M., Galin I.R., Zaitsev D.Yu., Kruglova N.N., Veselov D.S., Veselov S.Yu. Dynamics of the contents and distribution of ABA, auxins and aquaporins in developing caryopses of an ABA-deficient barley mutant and its parental cultivar // *Seed Science Research*. 2019. V. 29. P. 261–269. DOI: [10.1017/S0960258519000229](https://doi.org/10.1017/S0960258519000229)
10. Sharipova G., Ivanov R., Veselov D., Akhiyarova G., Seldimirova O., Galin I., Fricke W., Vysotskaya L., Kudoyarova G. Effect of salinity on stomatal conductance, leaf hydraulic conductance, HvPip2 aquaporin, and abscisic acid abundance in barley leaf cells // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. V. 23(22). P. 14282. DOI: [10.3390/ijms232214282](https://doi.org/10.3390/ijms232214282)
11. Sharipova G., Veselov D., Kudoyarova G., Fricke W., Dodd I., Katsuhara M., Furuichi T., Ivanov I., Veselov S. Exogenous application of abscisic acid (ABA) increases root and cell hydraulic conductivity and abundance of some aquaporin isoforms in the ABA deficient barley mutant Az34 // *Ann. Bot.* 2016. V. 118 (4). P. 777-785. DOI: [10.1093/aob/mcw117](https://doi.org/10.1093/aob/mcw117)
12. Wang P., Calvo-Polanco M., Reyt G., Barberon M., Champeyroux C., Santoni V., Maurel C., Franke R., Ljung K., Novak O., Geldner N., Boursiac Y., Salt D. Surveillance of cell wall diffusion barrier integrity modulates water and solute transport in plants // *Sci. Rep*. 2019. V. 9. P. 4227. DOI: [10.1038/s41598-019-40588-5](https://doi.org/10.1038/s41598-019-40588-5)
13. Zarebanadkouki M., Trtik P., Hayat F., et al. Root water uptake and its pathways across the root: Quantification at the cellular scale // *Scientific Reports*. 2019. V. 9. P. 12979. DOI: [10.1038/s41598-019-49528-9](https://doi.org/10.1038/s41598-019-49528-9)

Цитировать как

Шарипова Г.В., Ахиярова Г.Р., Галин И.Р., Кудоярова Г.Р. Локализация аквапоринов в процессе формирования поясков каспари в корнях растений ячменя // *Экобиотех*, 2022, Т. 5 (4). С. 168-174. DOI: [10.31163/2618-964X-2022-5-4-168-174](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2022-5-4-168-174), EDN: RAJCHK

Cited as

Sharipova G.V., Akhiyarova G.R., Galin I.R., Kudoyarova G.R. Localization of aquaporins during the formation of casparian bands in the roots of barley plants. *Èkobioteh*. V. 5 (4). P. 168-174. DOI: [10.31163/2618-964X-2022-5-4-168-174](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2022-5-4-168-174), EDN: RAJCHK (In Rus.)