

На правах рукописи



АБДЕЕВА Анна Рамильевна

**ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ
АКВАПОРИНОВ В РАСТЕНИЯХ *Mesembryanthemum
crystallinum* L. В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА И ПРИ
ДЕЙСТВИИ МЕДИ И ЦИНКА**

03.00.12 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2008

Работа выполнена в лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Холодова Валентина Павловна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Балнокин Юрий Владимирович

кандидат биологических наук, доцент

Косулина Людмила Георгиевна

Ведущая организация: Российский Государственный Аграрный Университет – Московская сельскохозяйственная академия им. К.А.Тимирязева

Защита состоится 20 мая 2008 г. в 13 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (095) 977 8018, e-mail: ifr@ippras.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «17» апреля 2008 г.

Ученый секретарь

совета по защите докторских

и кандидатских диссертаций,

кандидат биологических наук

М.И. Азаркович

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Растения постоянно поглощают и выделяют воду. На уровне клеток и органелл движение воды обычно занимает секунды. Но на тканевом или органном уровне ситуация может быть другой. Перенос воды на дальние расстояния по проводящим тканям в основном не встречает препятствий между клетками. Но транспорт воды на короткие расстояния, который включает апопласт, симпласт и трансклеточный путь, в последних двух случаях определяется транспортом через мембраны клеток. В условиях, когда возможен только «cell-to-cell» транспорт (симпласт, трансклеточный путь), регуляция активности водных каналов оказывает наибольшее влияние на гидравлические свойства ткани. Присутствие аквапоринов в клеточных мембранах дает организму возможность регулировать водный поток внутри и между клетками. Механизмы регуляции аквапоринов в процессе онтогенеза, а также в ответ на действие факторов внешней среды включают транскрипционный, трансляционный и посттрансляционный уровни. Основное внимание в исследованиях уделяется трансляционному и посттрансляционному механизмам. Тем не менее, дифференциальная экспрессия генов аквапоринов также является важным механизмом регуляции в условиях водного дефицита, однако изучена недостаточно.

Факультативный галофит хрустальная травка (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) уже длительное время используется в качестве модели для изучения механизмов адаптации к экстремальным условиям. Как оказалось, соли тяжелых металлов (ТМ), так же как и засоление вызывают нарушения водного статуса растений хрустальной травки. Следует отметить, что лишь очень небольшое число работ посвящено изучению воздействия тяжелых металлов на аквапорины животных (Zelenina et al., 2003; 2004; Tritto et al., 2007), а исследования по воздействию солей меди и цинка на экспрессию генов аквапоринов растений ранее не проводились.

Таким образом, остается открытым вопрос, в какой мере дифференциальная экспрессия генов аквапоринов определяет стабилизацию водного статуса растений хрустальной травки в условиях действия хлорида натрия и солей тяжелых металлов.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось выявление дифференциальной экспрессии генов аквапоринов в растениях хрустальной травки и изучение роли этого процесса при адаптации растений к

хлоридному засолению и к избыточным концентрациям солей меди и цинка. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать воздействие хлорида натрия, повышенных концентраций меди и цинка на основные физиологические параметры, характеризующие водный статус растений, а также выяснить, сопровождаются ли такие изменения стресс-индуцированным формированием важного водосберегающего механизма – фотосинтеза САМ-типа.
2. Выяснить, в какой мере реализуется дифференциальная экспрессия генов аквапоринов в рамках суточных, онтогенетических и органных изменений водного статуса, вызываемых воздействием повышенных концентраций хлорида натрия и солей меди и цинка.
3. Сопоставить изменения основных физиологических параметров водного статуса растений с изменениями экспрессии генов аквапоринов при действии изучаемых стрессоров.
4. Исследовать воздействие повышенных концентраций меди и цинка на изменение экспрессии индивидуальных изоформ аквапоринов на транскрипционном и трансляционном уровнях.
5. Оценить возможную роль аквапоринов в адаптации растений к повышенным концентрациям хлорида натрия и солей меди и цинка.

Научная новизна. Впервые исследована дифференциальная экспрессия шести генов аквапоринов растений *M. crystallinum* в различных органах, в суточной динамике, а также в ответ на действие факторов внешней среды различной природы, силы и продолжительности воздействия. Обнаружено существование корреляций между изменениями основных параметров водного статуса растений и экспрессией генов аквапоринов при воздействии повышенных концентраций хлорида натрия и солей тяжелых металлов. Проведена оценка обогащенности мембран, изолированных из тканей растений хрустальной травки, подвергнутых воздействию тяжелых металлов, изоформами аквапоринов РІР-группы. Впервые была исследована корреляция между накоплением транскриптов и белка РІР-аквапоринов при воздействии повышенных концентраций солей тяжелых металлов.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в работе теоретические данные об особенностях действия хлорида натрия, солей цинка и меди на изменение параметров водного статуса растений, а также о механизмах устойчивости к данным стрессорам имеют существенное значение для

выяснения хода формирования адаптивных процессов у галофитов. Полученные результаты создают основу для дальнейшего углубления исследований молекулярных механизмов регуляции трансклеточного потока воды и адаптивных свойств растительных клеток. Теоретические обобщения и совокупность полученных экспериментальных данных может использоваться в курсах лекций для студентов биологических факультетов ВУЗов страны.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на международной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия» (Вологда, 2005), на I (IX) международной конференции молодых ботаников С.-Петербурге (С.-Петербург, 2006), на годовом собрании Общества физиологов растений России и конференции «Физиология растений – фундаментальная основа современной фитобиотехнологии» (Ростов-на-Дону, 2006), на международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследований, изложения полученных результатов, обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 139 страницах машинописного текста, включая 20 таблиц, 20 рисунков; библиография содержит 184 название, в т.ч. 176 на иностранных языках.

Объект и методы исследования

Объектом исследований служила хрустальная травка (*Mesembryanthemum crystallinum* L.), для ее выращивания в водной культуре использовали модифицированную питательную среду Johnson (Winter, 1973) с железом в нитратной форме. Растения выращивали в камере фитотрона при дневной температуре 23-25°C и ночной 18-20°C. Для проведения опытов использовали растения *M. crystallinum* в возрасте 4-10 недель. Началом опыта являлся момент внесения CuSO_4 , ZnSO_4 и NaCl . Использовали концентрации CuSO_4 – 25 и 50 мкМ, ZnSO_4 – 250 и 500 мкМ; NaCl – 200 и 400 мМ. Продолжительность каждого эксперимента составляла 3, 9, 24, 72, 168 ч. В каждой точке эксперимента фиксировали листья 3-4 ярусов снизу (не считая семядольных) и корни.

Общее содержание воды определяли высушиванием листьев при 70°C до стационарного состояния. Определение интенсивности транспирации листьев

проводили общепринятым гравитационным методом по Иванову (Пустовой и др., 1995). Для определения осмотического потенциала отжимали клеточный сок после замораживания-оттаивания растительных тканей. Измерения проводили на осмометре Osmomat 030 фирмы «Gonotac». Содержание свободного пролина определяли с помощью кислого нингидринового реактива по методу Bates et al. (1973). Определение содержания меди и цинка в тканях растений проводили на атомно-абсорбционном спектрофотометре. Определение содержания ионов хлора проводили с помощью ионселективных электродов на ионализаторе «Orion EA 940» фирмы «Orion» (США). Об индукции и развитии САМ судили по изменению характерной суточной динамики титруемой кислотности клеточного сока.

Выделение тотальной РНК из корней и листьев хрустальной травки проводили с использованием RNeasy Mini Kit фирмы QIAGEN. Реакцию обратной транскрипции проводили, как указано в руководстве фирмы Fermentas. ПЦР-анализ и электрофорез продуктов ПЦР в агарозном геле (1-1,3% в зависимости от размера продукта) проводили в присутствии бромистого этидия. Для проведения полимеразной цепной реакции были подобраны праймеры, приведенные в таблице 1. Для количественной оценки полученных результатов использовали программу 1D-Scan.

Таблица 1. Праймеры для проведения ОТ-ПЦР

транскрипт	5' - праймер	3' - праймер
McPIP1;4	GTCATGGTCGTTCTACAGAG	GAGAAGACGGTGTAGACAAG
McPIP1;1	ACTGCTGGTATCTCAGGTGG	GATGATAGCAGCACCGAGAC
McPIP2;1	CCAACACGAACGCTGACCAA	GTGAACCATGAACACCGCGA
McPIP2;3	CTGCACTGCCGGTATCTCTG	TTGCTGTAGCCGACGCTTAG
McTIP1;2	TGGCAGAGTTCATCTCCACC	TCCGATGAGTGGGCCGACCC
McTIP2;2	GGCCAGATCACCATCCTCAC	AAGTCACCACTGGCGAGAGC
ACT 3M	GTGATCTCCTTGCTCATAACG	GGnACTGGAATGGTnAAGG
PERc	TGGATCCCATTACTACGCACC	TCCAAGAGAGCTCGCCATTCT

Для получения микросомальных мембран соответствующие органы растений гомогенизировали в среде, содержащей 300 мМ сахарозу, 100 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 10 мМ ЭДТА, 5 мМ метабисульфит калия, 5 мМ дитиоэритритол, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид и 0,6%-ный (в/о) поливинилпирролидон. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при

10000g 10 мин. Из супернатанта осаждали микросомальные мембраны центрифугированием при 100000g 30 мин. Содержание белка определяли по методу Bradford (1976). Электрофоретическое разделение белков проводили в 12.5% ППА геле по методу Laemmli (1970) в камере Mini-Protean 3 Cell ("BioRad", США). На дорожку геля наносили 7-15 мкг белка. Перед электрофорезом препараты мембранных белков смешивали в равных объемах с 2X буфером для образца, содержащим 125 мМ Трис-HCl (pH 6.8), 4% (в/о) SDS, 20% (в/в) глицерин, 200 мМ ДТТ, 0.02% (в/о) бромфеноловый синий. Для выравнивания содержания белка во все препараты добавляли 1X буфер и проводили денатурацию белка при 96⁰C (5 мин). После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Nitrocellulose membrane, 0.45 micron ("Sigma-Aldrich"), используя Trans-Blot SD ("BioRad") по Towbin (1979). После переноса белков нитроцеллюлозную мембрану отмывали в среде PBST и блокировали 1 ч в той же среде с добавлением 3%-го (в/о) сухого обезжиренного молока при комнатной температуре. Затем мембрану инкубировали в течение ночи при 4⁰C с первичными антителами в разведении 1:50. Антитела были получены против синтетической консервативной 20-аминокислотной последовательности аквапоринов PIP-семейства, конъюгированной с БСА. Сыворотка была любезно предоставлена д.б.н. М.С. Трофимовой (лаб.мембран ИФР РАН). После инкубации с первичными антителами мембрану отмывали в PBST и инкубировали со вторичными козьими антикроличьими антителами (1:1000), конъюгированными с щелочной фосфатазой, в течение 1,5 ч. После инкубации со вторичными антителами мембрану отмывали сначала в PBST, затем в растворе ДЭА, содержащем 0.1 М диэтаноламин (pH 9.6) и 1 мМ MgCl₂. Аквапорины визуализировали, используя цветную реакцию на щелочную фосфатазу в растворе, содержащем 1.5 мг BCiP, 3 мг NBT, 30 мл ДЭА.

Результаты и обсуждение

Адаптация растений хрустальной травки к засолению. Известно, что при засолении резко снижается доступность воды для растений. Хрустальная травка характеризуется высокой оводненностью тканей. Закрытие устьиц является одним из главнейших механизмов, позволяющих сохранять в жестких условиях засоления нормальное тургорное давление. При внесении соли в питательный раствор наблюдалось заметное подвядание растений хрустальной травки в течение первых 6 часов опыта, вместе с тем было отмечено значительное (в 3 –

6 раз в сравнении с контролем) снижение интенсивности транспирации уже через 3 часа после начала засоления. Такие быстрые темпы снижения транспирации позволили опытным растениям уже в первые сутки практически полностью восстановить нормальное тургорное давление. Оказалось, что солевой стресс сопровождался снижением основных показателей, характеризующих водный статус растений: оводненности, относительного содержания воды и осмотического потенциала листьев. Падение оводненности наблюдалось уже при 3-часовом воздействии хлорида натрия (табл.2).

Таблица 2. Содержание воды в листьях растений хрустальной травки

Вариант	3 ч	9 ч	24ч	72 ч	3 ч	9 ч	24ч	72 ч
	г H ₂ O/г сухой массы				ОСВ, %			
Контроль	30,3	18,6	28,4	32,3	73,8	79,1	76,4	81,9
NaCl 200 мМ	18,2	17,5	21,2	24,6	67,9	69,3	66,5	79,3
NaCl 400 мМ	17,9	1,2	18,2	24,6	60,4	66,7	64,8	72,8
HCP _{0,05}	0,9	1,2	1,1	1,1	0,6	0,5	0,5	0,4

Содержание воды в тканях листа опускалось до 17,5-18,5 г H₂O/г сухой массы при контрольном значении 30,3 г H₂O/г сухой массы. Через 1-3 суток опыта наблюдалось постепенное восстановление показателей оводненности, которые превысили значения 24 г H₂O/г сухой массы. В первые часы воздействия наблюдалось достоверное снижение относительного содержания воды (ОСВ) на 6% в случае умеренного засоления (200 мМ) и на 14% при солевом шоке более жестком воздействии (400 мМ). Такой уровень ОСВ сохранялся при 9- и 24-часовом стрессе. Через 3 суток солевого стресса наблюдалось восстановление показателей ОСВ при умеренном засолении.

Трехчасовой стресс достоверно не повлиял на изменение осмотического потенциала (рис.1А). Однако уже после 9 часов воздействия NaCl в листьях растений наблюдалось снижение осмотического потенциала с -0,8 МПа до -1,2 МПа (при 200 мМ) до -1,6 МПа (при 400 мМ). Сутки засоления вызывали дальнейшее снижение величины осмотического потенциала до -1,5 МПа (в случае 200 мМ) и до -2,1 МПа (в случае 400 мМ). Снижение осмотического потенциала листьев растений хрустальной травки коррелировало с аккумуляцией ионов хлора и накоплением пролина.

В листьях растений контрольного варианта в течение суток эксперимента концентрация ионов хлора составила в среднем 15-19 мкэкв/г свежей массы (рис. 1Б).

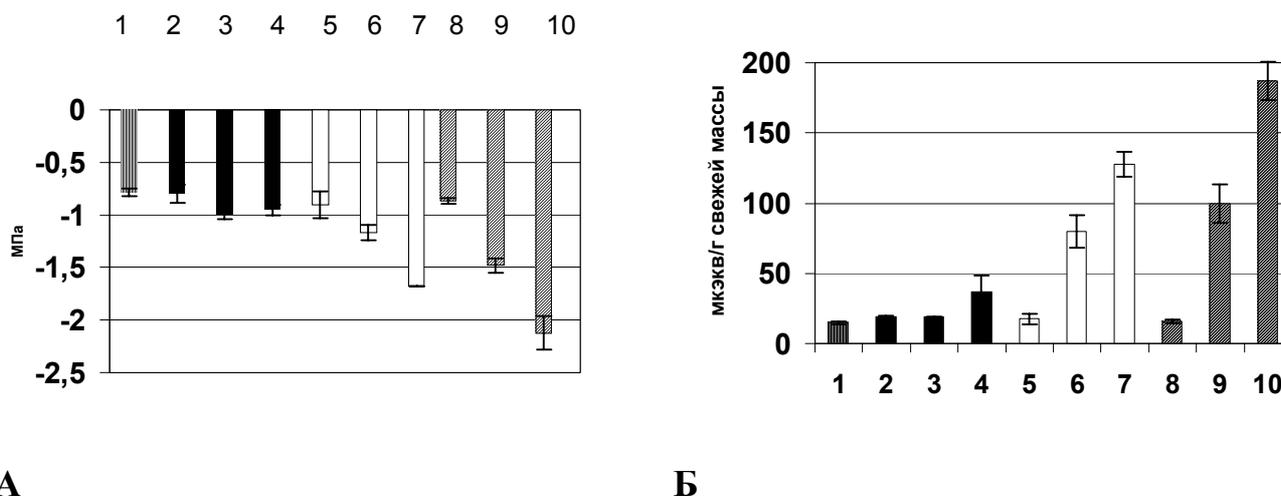


Рис. 1. Осмотический потенциал (А) и накопление ионов хлора (Б) в листьях *M. crystallinum* при действии NaCl в течение 3 ч (№2-4), 9 ч (№5-7) и 24 ч (№8-10)

1,2,5,8 – контроль

3,6,9 – 200 мМ NaCl

4,7,10 - 400 мМ NaCl

Спустя 3 ч после добавления соли в питательный раствор содержание хлорид-ионов достоверно не превышало уровень контроля. Однако 9-часовое засоление вызывало значительное по сравнению с контролем накопление ионов хлора, которое превысило контрольные показатели почти в 4 раза (при 200 мМ NaCl) и в 8,5 (при 400 мМ NaCl) раз. Сутки воздействия сопровождались дальнейшей аккумуляцией хлорида в листьях, при этом значения составили 100 и 187 мкэкв/г свежей массы в варианте с 200 мМ и 400 мМ, соответственно, что превысило контрольные значения в 6 и в 12 раз. Накопление таких высоких концентраций осмотически активных соединений и нормальное развитие растения возможно благодаря индукции в присутствии стрессора синтеза совместимых осмолитов, главным образом пролина. Его аккумуляция за сутки солевого шока составила $13,20 \text{ мкмоль} \cdot \text{г}^{-1} \text{ св.м.}$, что почти в 13 раз выше контрольных показателей. Пролин помогает выровнять возникающую разность осмотических потенциалов между компартментами клетки.

Дифференциальная экспрессия генов аквапоринов в корнях и листьях в суточной динамике. Нами была изучена экспрессия шести генов аквапоринов: MIP A, MIP B, MIP C, MIP H, MIP F, MIP K. Анализ аминокислотных последовательностей (Kirch et al., 2000) показал, что 4 из них локализованы на плазмалемме (MIP A, B, C, H) и 2 - на тонопласте (MIP F, K). Работ по

классификации и созданию филогенетического древа аквапоринов хрустальной травки нет. Но Vera-Estrella et al. (2004) используют новые названия для трех аквапоринов McPIPA, McPIPB, McPIPC в соответствии с номенклатурой, предложенной Johansson et al. (2001). Анализ последовательностей белков, а также порядок их регистрации позволили привести названия шести изучаемых аквапоринов в соответствие с новой номенклатурой (табл. 3).

Таблица 3. Названия аквапоринов хрустальной травки по новой классификации

Старое название	Новое название	комментарии
McPIPA	McPIP1;4	Vera-Estrella et al., 2004
McPIPB	McPIP1;1	Абдеева А.Р., неопубл.данные
McPIPC	McPIP2;1	Vera-Estrella et al., 2004
McPIPH	McPIP2;3	Абдеева А.Р., неопубл.данные
McMIPF	McTIP1;2	Vera-Estrella et al., 2004
McMIPK	McTIP2;2	Абдеева А.Р., неопубл.данные

Сравнение интенсивности экспрессии изученных генов в разных органах контрольных растений хрустальной травки показало (рис.2А), что значительные различия обнаружены по экспрессии гена McPIP2;1, существенно более высокая активность которого была характерна для корней.

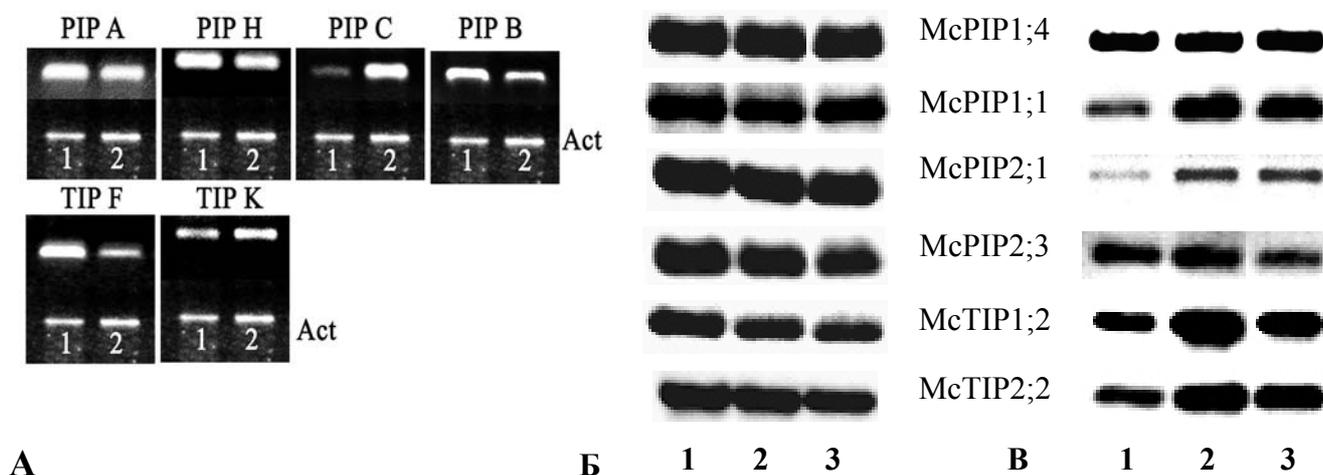


Рис.2. А.Уровень мРНК генов аквапоринов McPIP1;4 (PIP A); McPIP1;1 (PIP B); McPIP2;1 (PIP C); McPIP2;3 (PIP H); McTIP1;2 (TIP F) и McTIP2;2 (TIP K) в листьях (1) и корнях (2) растений *M.crystallinum*. Б,В. Уровень мРНК генов аквапоринов в корнях (Б) и листьях (В) растений *M.crystallinum*. 1, 2, 3 – контрольные варианты, 12.00 ч (1), 15.00 ч (2), 21.00 ч (3).

Аквапорин McPIP2;1 был назван корнеспецифичным (Fukuhara et al., 1999). Среди других изученных генов для McPIP1;1 и McTIP1;2 было отмечено

некоторое, хотя и небольшое превышение содержания мРНК в листьях в сравнении с корнями.

Было обнаружено, что экспрессия генов аквапоринов McPIP1;1; McPIP2;1; McPIP2;3; McTIP1;2 и McTIP2;2 изменялась в течение суток в листьях, в то время как в корнях подобная динамика была характерна для McTIP1;2 (рис.2). К 15.00 ч дня интенсивность экспрессии гена аквапорина McTIP1;2 снижалась почти в 2 раза и оставалась на таком уровне до вечера. Некоторое снижение уровня мРНК к 21.00 ч наблюдалось и для McPIP2;3. Напротив, в листьях обнаруженные суточные изменения содержания транскриптов были направлены в сторону повышения (рис.2В). Так, количество мРНК McPIP1;1 значительно увеличивалось к 15.00 ч по сравнению с 12.00 ч, возрастая и к 21.00 ч, затем оставалось на высоком уровне спустя сутки. Подобная закономерность была обнаружена для аквапоринов McPIP2;1; McPIP2;3; McTIP1;2 и McTIP2;2, содержание мРНК которых возрастало в 15.00 и оставалось выше дневного (12.00 ч) уровня. Только для аквапорина McPIP2;3 к вечеру наблюдалось снижение количества транскриптов.

Было установлено, что **интенсивность и продолжительность засоления** определяла дифференциальную экспрессию генов аквапоринов. При умеренном засолении уровень мРНК PIP1-аквапоринов *в корнях и в листьях* незначительно отличался от контрольного на протяжении всех экспериментов. Однако количество мРНК PIP2-изоформ *в листьях* к 3 часам засоления падало на 70% и ниже от уровня контроля и сохранялось на низком уровне в последующие 7 суток стресса. В то же время количество мРНК аквапоринов тонопласта снижалось в первые часы воздействия *в корнях* и спустя сутки засоления восстанавливалось до уровня контроля у TIP2-изоформы и выше контроля – у TIP1-изоформы. При этом *в листьях* интенсивность экспрессии генов TIP-аквапоринов несущественно отличалась от контроля на протяжении всего опыта.

В случае солевого шока (400 мМ NaCl) дифференциальная экспрессия генов аквапоринов выражалась в том, что уровень мРНК McPIP1;1 *в корнях и листьях* падал через 9 часов воздействия, но восстанавливался *в корнях* к 3-м суткам засоления до контрольного, а *в листьях* продолжал снижаться (рис.3). Напротив, содержание транскриптов PIP2- и обеих TIP-изоформ *в корнях* не только не снижалось при солевом стрессе, но и в 2 раза превышало контроль на 3 сутки воздействия у PIP2- и на 1 сутки у TIP-аквапоринов (рис.4), стабилизируясь в последующие дни на контрольном уровне. При этом *в*

листьях происходило резкое снижение уровня транскриптов мРНК РІР2-изоформ, которое не превышало 30% от контроля в последующие дни эксперимента. Солевой шок вызывал постепенное понижение в содержании мРНК ТІР-изоформ, незначительное – в случае МсТІР1;2.

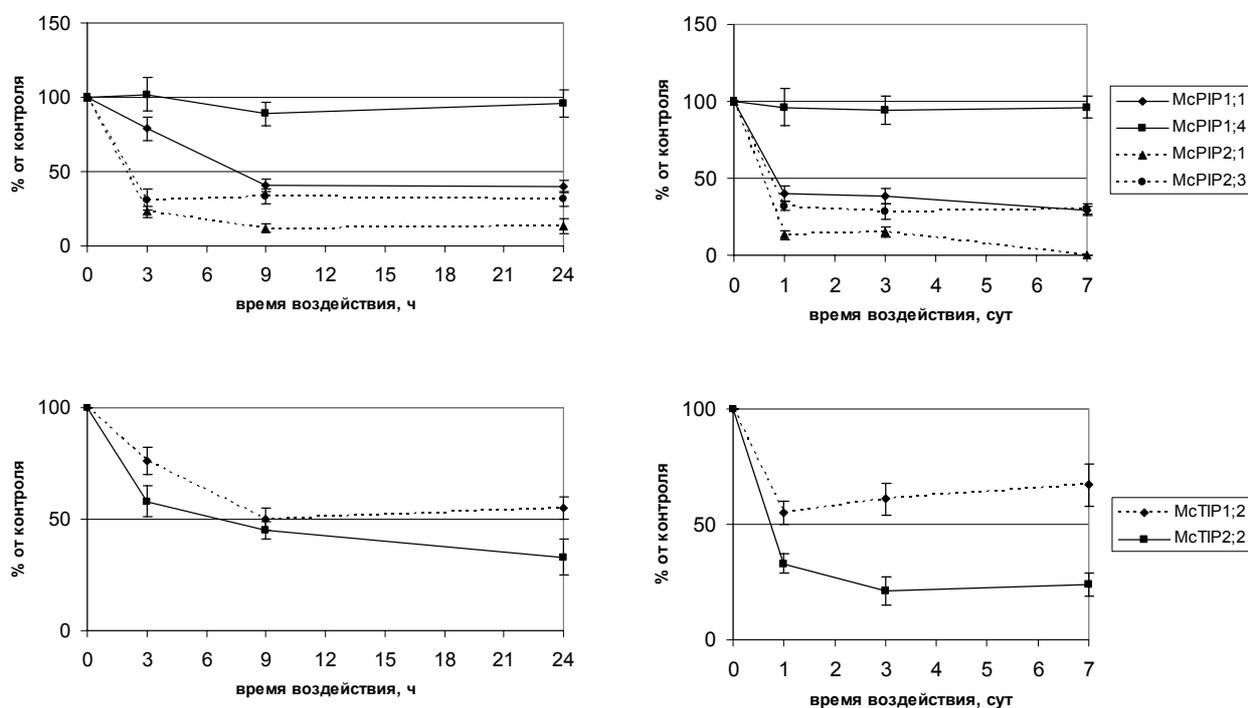


Рис. 3. Уровень мРНК генов аквапоринов МсРІР1;4; МсРІР1;1; МсРІР2;1; МсРІР2;3; МсТІР1;2 и МсТІР2;2 в листьях растений *M. crystallinum* в ответ на солевой шок.

Интересно, что характерный профиль экспрессии аквапоринов в листьях не обнаруживался в корнях, что отмечается в литературе (Yamada et al., 1997; Jang et al., 2004). Эти результаты подразумевают, что вклад отдельной изоформы аквапорина при водном стрессе различается в корнях и в листьях, а регуляция дифференциальной экспрессии аквапоринов включает интеграцию различных сигналов.

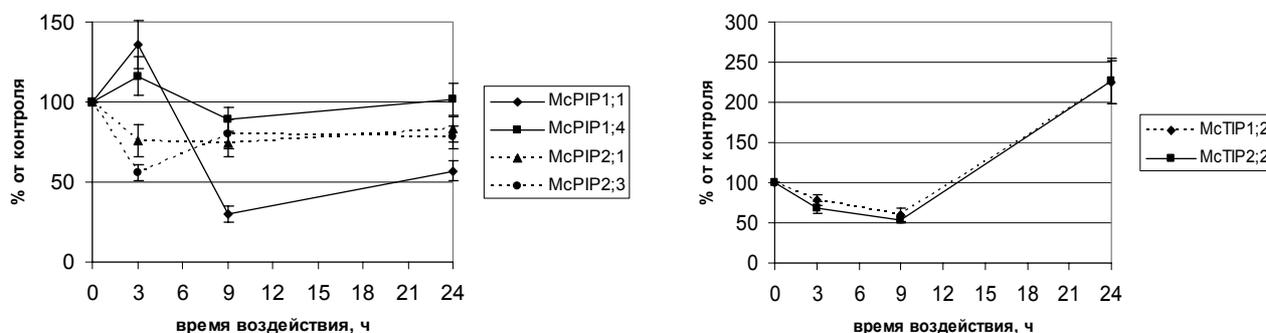


Рис. 4. Уровень мРНК генов аквапоринов МсРІР1;4; МсРІР1;1; МсРІР2;1; МсРІР2;3; МсТІР1;2 и МсТІР2;2 в корнях растений *M. crystallinum* в ответ на солевой шок.

Проведенные исследования показали наличие корреляции между изменениями основных параметров водного статуса растений и экспрессией генов аквапоринов при солевом стрессе. Первые 3 ч солевого стресса характеризовались достоверным снижением транспирации и содержания воды в листьях. Это сопровождалось down-регуляцией в первую очередь генов PIP-аквапоринов, что вызывало снижение межклеточного транспорта воды и, следовательно, устьичной проводимости для поддержания водного статуса растений. На организменном уровне это характеризовалось потерей тургесцентности листьев. Следующие 6 ч воздействия хлорида натрия приводили к достоверному снижению ОСВ и осмотического потенциала на фоне низкой оводненности и низкой транспирации. Именно на этом этапе начинали проявляться концентрационные различия воздействия соли. Так, достоверное снижение уровня экспрессии генов McPIP1;1; McTIP1;2 и McTIP2;2 было показано только при воздействии 400 мМ NaCl. Down-регуляция генов аквапоринов, так же как и в первые часы воздействия, наблюдалась у PIP-изоформ в листьях (преимущественно у PIP2). Таким образом, острый водный дефицит приводил к сокращению межклеточного водообмена в листьях, но не в корнях. Уменьшение водной проводимости плазмалеммы способствовало сохранению воды в клетке в начальный период стресса. Интересно, что солевой шок приводил к постепенному сокращению внутриклеточного водообмена в течение 7 суток в листьях за счет снижения экспрессии TIP-изоформ, что, видимо, способствовало снижению водоотдачи в тканях листа. Напротив, содержание транскриптов PIP2- и обеих TIP-изоформ в корнях не только не снижалось при солевом стрессе, но, напротив, в 2 раза превышало контроль на 1 сутки у TIP- и на 3 сутки воздействия у PIP2-аквапоринов, стабилизируясь в последующие дни на контрольном уровне. Подобное повышение активности аквапоринов связано, по-видимому, с восстановлением массового поступления воды в растения, что отражалось и на показателях оводненности листьев и ОСВ.

Экспрессия генов аквапоринов в растениях хрустальной травки при индукции водосберегающего механизма фотосинтеза САМ-типа в условиях солевого шока. Растения 6-недельного возраста, на которых были проведены основные эксперименты, осуществляли C₃-тип фотосинтеза, о чем однозначно свидетельствуют данные, представленные на рис. 5, в соответствии с которыми во всех контрольных вариантах, независимо от времени фиксации листьев, отсутствовала мРНК ключевого фермента САМ-типа фотосинтеза - ФЕПК

(Рис.5, 1,2,4,6). Однако в ответ на 3-х часовое засоление растения реагировали индукцией экспрессии гена, кодирующего данный фермент (Рис.5, 3), интенсивность которой усиливалась к 9 и, тем более, к 24 часам воздействия NaCl. Подобный подход дал возможность оценить стресс-зависимое изменение интенсивности экспрессии генов аквапоринов в процессе перехода растений на САМ-тип фотосинтеза.

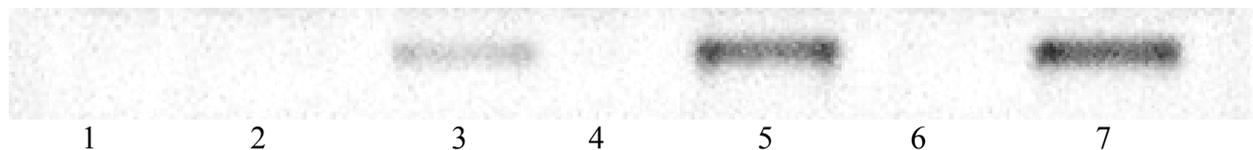


Рис. 5. Влияние 400 мМ NaCl на уровень мРНК гена фосфоенолпируваткарбоксилазы в листьях растений *M. crystallinum*. 1, 2, 4, 6 – контрольные варианты: начало эксперимента - (1), 3 часа (2), 9 часов (4) и 24 часа (6). 3, 5, 7 – продолжительность воздействия NaCl 400 мМ: 3 часа (3), 9 часов (5) и 24 часа (7).

Существенно, что на самом раннем этапе ответа растений на солевой стресс, когда водосберегающий механизм фотосинтеза САМ-типа еще не сформирован, растения реагируют ингибированием интенсивности экспрессии генов аквапоринов, что направлено на понижение водопроницаемости клеточных мембран и, прежде всего, плазмалеммы, и более экономное расходование воды в условиях жесткого водного дефицита. Характерно, что стресс-индуцируемое формирование САМ в меньшей степени отражается на интенсивности внутриклеточного перераспределения воды, о чем свидетельствует слабое влияние засоления на экспрессию генов аквапоринов тонопласта. Полученные в настоящей работе результаты, а также доступные литературные данные позволяют высказать предположение, согласно которому стратегия изменений водного статуса, приводящая к адаптации хрустальной травки к засолению, состоит в снижении интенсивности внутри- и межклеточного водообмена. Ключевая роль в реализации этой стратегии принадлежит, очевидно, белкам водных каналов, новообразование которых ингибируется в условиях солевого шока на уровне снижения интенсивности экспрессии кодирующих их генов.

Адаптация растений хрустальной травки к действию токсических концентраций меди и цинка. В литературе довольно часто отмечается факт нарушения водного статуса при действии ТМ на растения, однако чаще всего исследуются ответы на их долговременное воздействие. Между тем, нарушение водного статуса растений, по-видимому, следует рассматривать как одно из ранних проявлений токсического действия ТМ. На растениях хрустальной

травки такой характерный признак неблагоприятных сдвигов как заметное подвядание листьев проявлялся на вторые-третьи сутки воздействия даже при умеренных концентрациях сернокислых солей меди и цинка.

Оказалось, что рост растений на среде с ТМ приводил к сильному снижению содержания воды в листьях (табл.4).

Таблица 4. Содержание воды в листьях растений хрустальной травки

Вариант	1 день	3 дня	7 дней	1 день	3 дня	7 дней
	% от свежей массы			г H ₂ O/г сухой массы		
Контроль	96.93	96.75	96.78	31.57	29.77	30.06
CuSO ₄ 25 мкМ	96.83	95.63	93.42	30.55	21.88	14.20
CuSO ₄ 50 мкМ	95.73	94.88	91.15	22.42	18.53	10.30
ZnSO ₄ 250 мкМ	96.84	96.27	94.81	30.65	25.81	18.27
ZnSO ₄ 500 мкМ	96.71	95.85	93.85	30.44	23.10	15.20
HCP _{0,05}	0.21	0.33	0.29	0.9	1.2	1.1

Падение оводненности особенно резко происходило при действии меди. В вариантах с умеренной концентрацией меди (25 мкМ) оводненность тканей листа уже к третьим суткам воздействия снизилась почти в 1,5 раза. Еще более резкое падение оводненности отмечалось в вариантах с 50 мкМ сульфата меди. К 7 суткам эксперимента содержание воды в листьях растений этого варианта снижалось в 3 раза. Менее негативно на содержании воды в листьях растений хрустальной травки сказывалось присутствие в среде цинка.

На существенные структурные изменения, возникающие в клетках листьев при росте растений хрустальной травки на среде с ТМ, указывает достоверное снижение относительного содержания воды, наступающее уже на 1 сутки воздействия (рис.6). Так, за 24 часа действия 25 мкМ CuSO₄ ОСВ снизилось на 7% от контроля, а 50 мкМ CuSO₄ - почти на 15%. Через 3 суток максимальное снижение насыщенности, вызванное высокими концентрациями CuSO₄ (50 мкМ), достигло 25%, ZnSO₄ (500 мкМ) - 15%.

Значительное снижение осмотического потенциала клеточного сока (в 2 раза), происходящее в условиях сильного снижения оводненности листьев, могло способствовать нормализации водного статуса растений. Очевидно, что синтез и аккумуляция пролина, концентрация которого к 7 суткам эксперимента составляла 8,1 мкмоль*г⁻¹св.м. (при воздействии 50 мкМ CuSO₄)

по сравнению с $0,82 \text{ мкмоль} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{св. м.}$ в контроле, способствовала снижению осмотического потенциала.

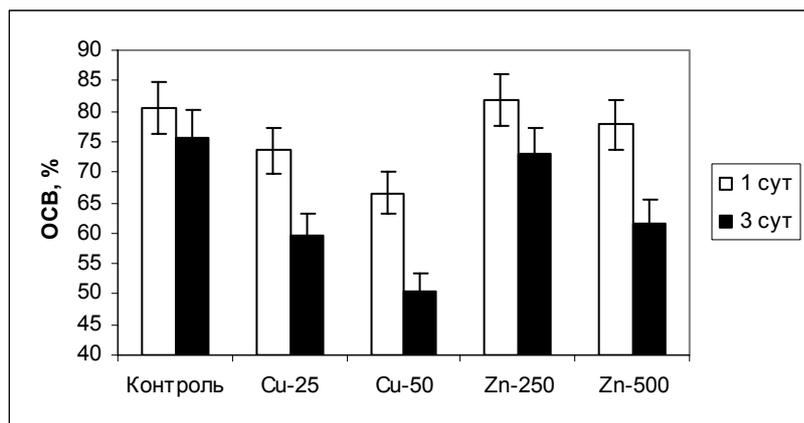
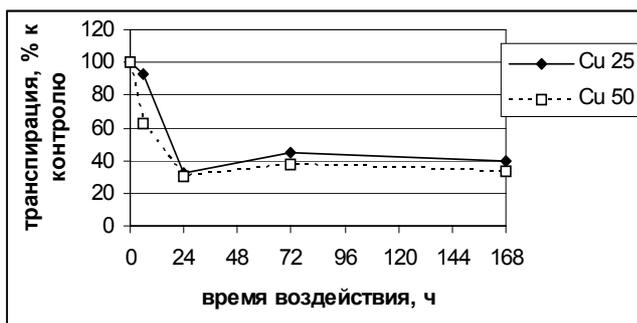


Рис.6. Изменение относительного содержания воды в листьях хрустальной травки при 1- и 3-дневном воздействии солей меди и цинка

Среди ранних ответных реакций хрустальной травки особое внимание привлекает резкое снижение транспирации, наблюдаемое в течение первых суток роста растений при внесении в корнеобитаемую среду солей ТМ, особенно меди (рис.7).

А



Б

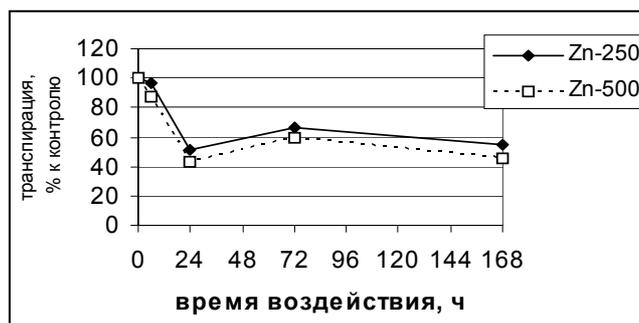


Рис. 7. Транспирация растений *M. crystallinum* при действии меди (А) и цинка (Б).

Уже 6-часовое воздействие CuSO_4 в концентрации 50 мкМ снижало интенсивность транспирации на 37%, а через сутки – еще на 33%. Значительно более умеренным был ингибирующий эффект цинка. После 6 часов воздействия максимальной концентрации сульфата цинка снижение транспирации составило 18%, но спустя сутки воздействия это значение увеличилось до 47%. Более низкие концентрации ТМ оказывали меньший ингибирующий эффект. На третьи сутки воздействия ТМ интенсивность транспирации несколько восстановилась, оставаясь, тем не менее не ниже 66% от контроля в случае низких концентраций цинка. Однако более продолжительное пребывание растений в контакте с ТМ усиливало их ингибирующее действие, снижая транспирацию до уровня около 40% от контроля практически при всех

испытанных вариантах действия ТМ. Столь раннее и сильное снижение интенсивности транспирации несомненно свидетельствует о том, что ее регуляция инициировалась событиями, произошедшими к этому времени на уровне корня, а не непосредственно в листьях, поскольку существенное поступление цинка и меди в листья удавалось обнаружить не ранее 3 суток роста растений на среде с использованными концентрациями этих ТМ (табл.5).

Таблица 5. Накопление меди и цинка листьями растений хрустальной травки, мкг/г сухой массы

Концентрация солей, мкМ		3 дня	7 дней
Контроль *			15.3
CuSO ₄	25	42	101
	50	88	125
Контроль *			30.7
ZnSO ₄	250	178	301
	500	402	1235
HCP _{0.05}		22	29

* Культуральная среда содержала 0.25 мкМ CuSO₄ и 1 мкМ ZnSO₄.

С другой стороны, как показали данные настоящего исследования, значительных изменений водного статуса листьев, которые могли бы инициировать закрывание устьиц, в течение первых суток еще не обнаруживалось. В дальнейшем транспирация растений хрустальной травки, подвергшихся воздействию ТМ, стабилизировалась на заметно более низком уровне, чем у контрольного варианта, что может рассматриваться как один из защитных механизмов на их токсическое действие. С другой стороны, снижение транспирации может иметь у растений хрустальной травки особый эффект в связи с тем, что это – индуцибельное САМ-растение. Являясь эффективной водосберегающей стратегией, САМ-фотосинтез способствует поддержанию водного статуса растений в жестких условиях, тем самым обеспечивая возможность нормального протекания физиологических процессов.

Концентрация протона (рис.8) в листьях контрольных растений на протяжении всего эксперимента лежала в пределах 10 мкэкв/г свежей массы, что характерно для растений хрустальной травки при преимущественном

функционировании C_3 -типа фотосинтеза. Однако, действие меди в самой низкой из использованных концентраций – 25 мкМ уже к третьим суткам эксперимента достоверно повышало содержание протона в тканях листа почти до 30 мкэкв/г свежей массы. Такие значения показателя уже позволяют говорить о начале перехода растений на САМ-тип фиксации углекислоты.

А

Б

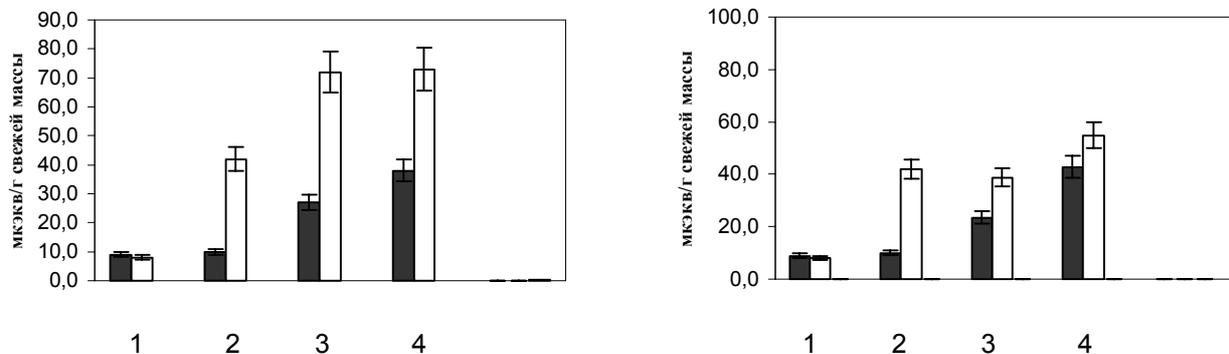


Рис.8. Действие меди (А) и цинка (Б) на интенсивность САМ у растений хрустальной травки на третьи (а) и седьмые (б) сутки эксперимента.

А – 1 – контроль, 2 – NaCl (400 мМ), 3- CuSO₄, 25 мкМ, 4 – 50 мкМ

Б – 1 – контроль, 2 – NaCl (400 мМ), 3- ZnSO₄, 250 мкМ, 4 - 500 мкМ

Сернокислая медь в концентрации 50 мкМ за тот же период вызывала увеличение концентрации протона до 37,5 мкэкв/г свежей массы. Аналогичным образом, хотя и менее интенсивно на растения хрустальной травки действовал и сернокислый цинк (рис. 8Б). В то время как величина титруемой кислотности листьев за семь суток у растений, подвергнутых действию меди достигала 73 мкэкв/г свежей массы при использовании 50 мкМ, в варианте с сернокислым цинком в концентрации 500 мкМ она составляла 55,4 мкэкв/г свежей массы, а в концентрации 250 мкМ – 38,4 мкэкв/г свежей массы. Такое резкое усиление интенсивности САМ медью и цинком может быть, по-видимому, индуцировано не только изменением водного статуса растений, но и быть обусловлено возможным участием малата – первичного акцептора углекислого газа при САМ-пути - в связывании ТМ.

Весьма важными представляются впервые полученные данные о влиянии ТМ на дифференциальную экспрессию генов аквапоринов. Интересно, что при этом природа ТМ оказывала большее влияние на изменение содержания мРНК аквапоринов, чем их (солей ТМ) концентрации (рис. 9,10).

Уровень экспрессии генов MsPIP1;1, MsPIP2;1 и MsPIP2;3 в корнях и листьях растений сильно снижался через 1 сутки воздействия меди, и этот

пониженный уровень содержания мРНК сохранялся или даже еще более снижался вплоть до полного прекращения экспрессии, как это было обнаружено в отношении гена *McPIP2;1* в листьях после 7 суток роста растений хрустальной травки на среде с ТМ (рис.9).

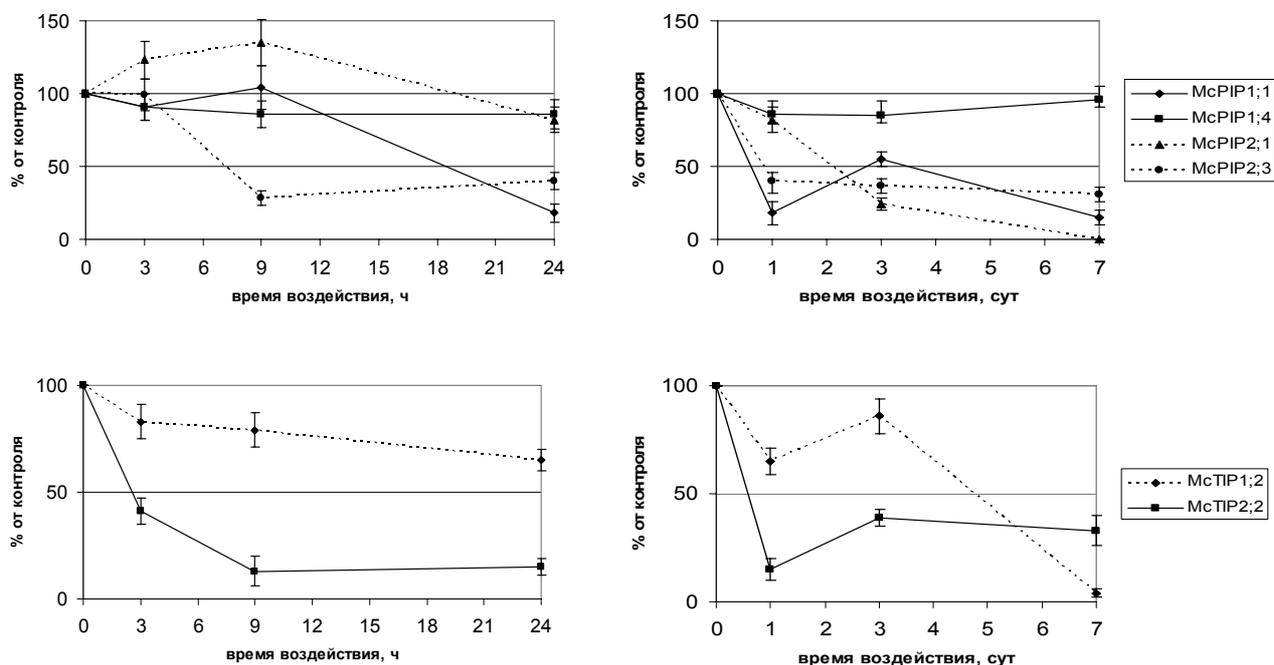


Рис.9. Уровень мРНК генов аквапоринов *McPIP1;4*; *McPIP1;1*; *McPIP2;1*; *McPIP2;3*; *McPIP1;2* и *McPIP2;2* в листьях растений *M. crystallinum* в ответ на действие 50 мкМ CuSO_4 .

При этом, соли *цинка* не вызывали достоверного снижения через сутки эксперимента количества транскриптов *McPIP2;1* в *корнях* и всех изоформ РІР-аквапоринов в *листьях* (рис.10). Однако, в последующие дни эксперимента различия в воздействии меди и цинка исчезали – через 7 суток происходило существенное снижение количества мРНК всех РІР-изоформ под действием ТМ. Down-регуляция генов аквапоринов в данном случае коррелировала со снижением транспирации, показателей ОСВ и оводненности.

Однако на 3 сутки воздействия происходила up-регуляция генов РІР2-аквапоринов в *корнях*, особенно в случае воздействия *меди* (рис.11). В литературе по этому поводу существуют данные, которые подтверждают up-регуляцию экспрессии генов аквапоринов в ответ на очень сильное стрессовое воздействие (Galmes et al., 2007; Yamada et al., 1997). Видимо в таких жестких условиях, когда устьичная проводимость низкая, вода поступает слабо, повышение экспрессии аквапоринов способствует увеличению водной проницаемости плазмалеммы, что может помочь стабилизации водного статуса растения.

Несколько другой профиль экспрессии наблюдался в отношении аквапоринов тонопласта. Сутки воздействия ТМ не вызывали достоверных изменений экспрессии гена *McPIP1;2*, но значительно снижали количество транскриптов *McPIP2;2* в корнях и листьях растений хрустальной травки.

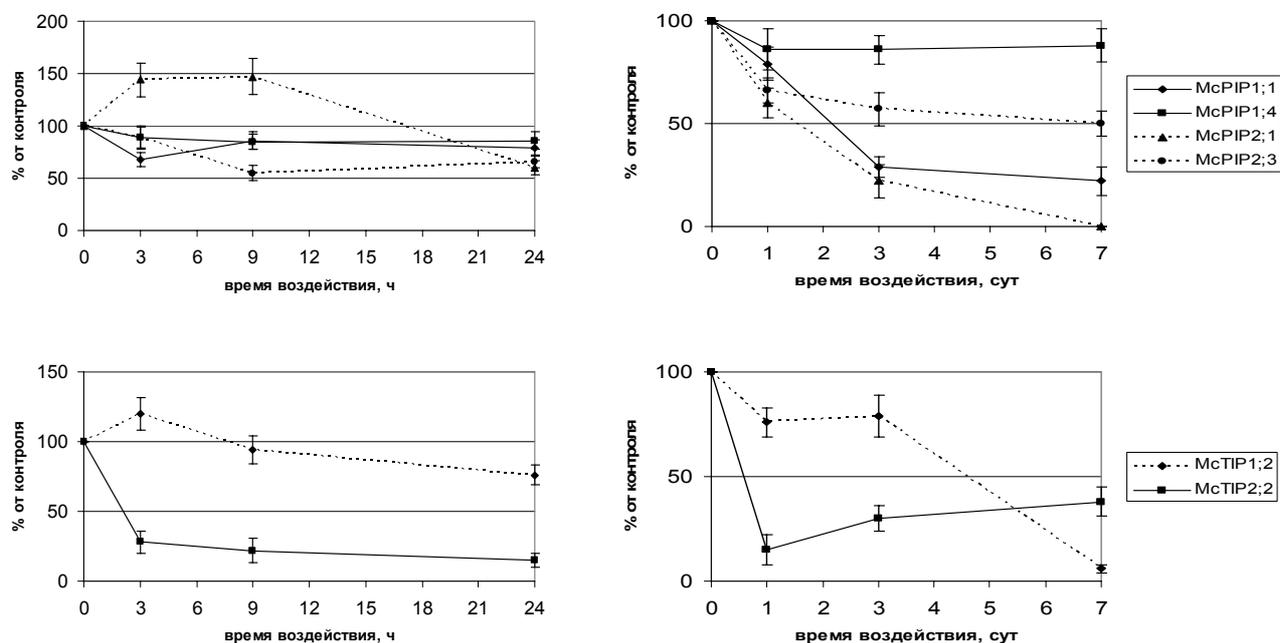


Рис.10. Уровень мРНК генов аквапоринов *McPIP1;4*; *McPIP1;1*; *McPIP2;1*; *McPIP2;3*; *McPIP1;2* и *McPIP2;2* в листьях растений *M. crystallinum* в ответ на действие 500 мкМ $ZnSO_4$.

Существенно, что в процессе адаптации на фоне пониженного межклеточного водообмена происходило урегулирование внутриклеточного движения воды в корнях, о чем свидетельствует стабилизация количества мРНК *McPIP1;2* и *McPIP2;2* на уровне контроля через 7 суток воздействия. Если в корнях через 7 суток эксперимента количество мРНК обеих изоформ находилось на контрольном уровне, то в листьях напротив, происходило снижение количества транскриптов *McPIP1;2* и *McPIP2;2*.

Таким образом, первые существенные изменения уровня транскриптов как в корнях, так и в листьях были зафиксированы только через сутки воздействия ТМ. Несмотря на то, что при стресс-реакции (в первые 24ч воздействия) разные гены аквапоринов реагировали неодинаково, адаптация приводила к сглаживанию различий и формированию единой стратегии выживания, которая заключалась в снижении межклеточного водообмена (т.е. водоотдачи) и «консервированию» воды внутри клетки в корнях и листьях растений при стабилизации внутриклеточный водообмена в корнях.

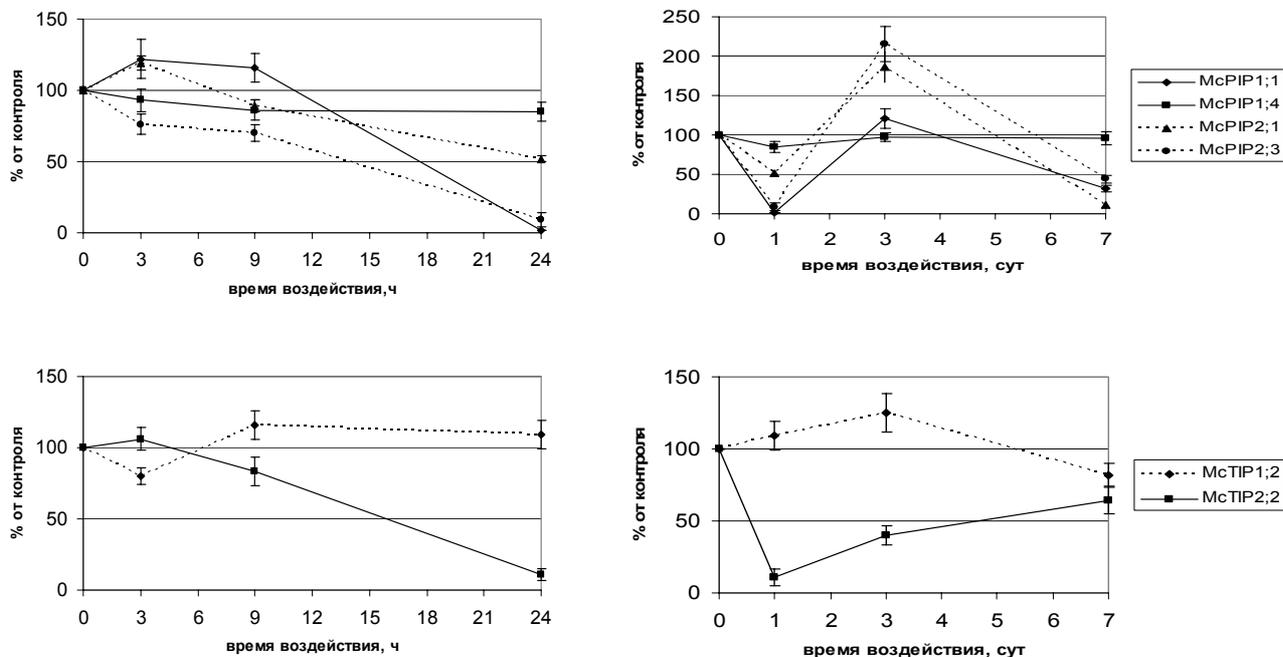


Рис.11. Уровень мРНК генов аквапоринов McPIP1;4; McPIP1;1; McPIP2;1; McPIP2;3; McPIP1;2 и McPIP2;2 в корнях растений *M. crystallinum* в ответ на действие 50 мкМ CuSO₄.

На этом фоне обращает на себя особое внимание факт резкого снижения экспрессии гена аквапорина тонопласта McPIP2;2, зарегистрированный в клетках листьев уже через 3 часа действия ZnSO₄ и CuSO₄ (рис.9,10). Такой большой размер ингибирования – снижение в 4-5 раз в сравнении с контролем – свидетельствует в пользу представления о том, что произошло оно в основной массе клеток листа. Ингибирование экспрессии одного из генов аквапоринов может быть первым шагом на пути торможения водоотдачи листьями при воздействии на растения ТМ, что могло бы в какой-то степени компенсировать вызываемые ими нарушения водообмена. Видимо, торможение водопоглотительной функции корневой системы в условиях подавления транспирации стало причиной ранней реорганизации сложной системы аквапоринов, модификация и адаптация которой особенно важна для условий низкой транспирации, когда апопластное тканевое движение воды сменяется по преимуществу симпластным.

Известно, что количество транскриптов и белков аквапоринов не обязательно коррелирует между собой. Поэтому казалось необходимым оценить воздействуют ли ТМ на уровень белков аквапоринов. Обогащенность микросомальных мембран аквапоринами оценивали на основе интенсивности окраски при иммунологической идентификации изоформ, принадлежащих к PIP1- и PIP2-подсемействам. Согласно полученным данным, количество белка

PIP-аквапоринов хрустальной травки в корнях после 3 суток воздействия ТМ увеличилось, то есть наблюдалась положительная корреляция между накоплением транскриптов и белка PIP-аквапоринов (рис.12). При этом, 7 суток воздействия ТМ приводили к снижению количества белка PIP-изоформ как в листьях, так и в корнях. Причем в листьях наблюдалось более значительное снижение количества аквапоринов на фоне более низкого, чем в корнях контрольного уровня аквапоринов. Эти результаты также не противоречили данным по содержанию мРНК PIP-аквапоринов, согласно которым ТМ вызывали снижение количества мРНК всех исследованных PIP-изоформ (за исключением McPIP1;4), причем в листьях такое снижение было более драматичным и, в случае McPIP2;1 приводило к полному ингибированию экспрессии гена этого аквапорина.

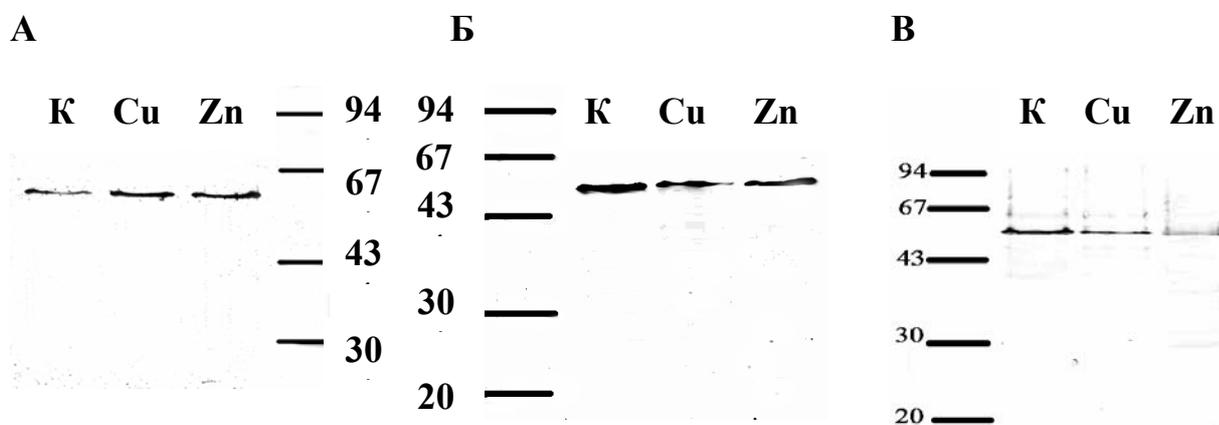


Рис.12. Иммунологическая идентификация PIP-аквапоринов в препаратах мембранного белка. **А.** в корнях растений *M. crystallinum* при 3-суточном воздействии ТМ. **Б, В.** в корнях (Б) и листьях (В) растений *M. crystallinum* при 7-суточном воздействии 50 мкМ CuSO₄ (Cu) и 500 мкМ ZnSO₄ (Zn). На каждую дорожку нанесено по 7 мкг мембранного белка.

ВЫВОДЫ

1. Проведенные на растениях *Mesembryanthemum crystallinum* исследования позволили установить дифференциальную экспрессию генов аквапоринов McPIP1;1; McPIP2;1; McPIP2;3; McTIP1;2 и McTIP2;2 в различных органах, в суточной динамике, а также в ответ на действие стрессоров различной природы, интенсивности и продолжительности их воздействия.
2. Исключением являлся ген аквапорина плазмалеммы McPIP1;4, конститутивная экспрессия которого не зависела от органной локализации, времени суток и характера стрессорного воздействия.

3. Зафиксированы корреляции между изменениями основных физиологических параметров водного статуса растений и экспрессией генов аквапоринов в условиях стресса. Водный дефицит, вызванный засолением и действием меди и цинка, сопровождался снижением оводненности листьев, интенсивности транспирации, ОСВ, осмотического потенциала и приводил к down-регуляции генов РІР-аквапоринов в листьях (преимущественно РІР2-изоформ).
4. Стресс-индуцируемое формирование САМ-типа фотосинтеза уже на начальных этапах вызывало снижение трансклеточного переноса воды в суккулентных органах за счет ингибирования экспрессии генов аквапоринов плазмалеммы, но в меньшей степени отражалось на интенсивности внутриклеточного перераспределения воды, о чем свидетельствовало слабое влияние стрессоров на экспрессию генов аквапоринов тонопласта.
5. Изменения в содержании белка РІР-аквапоринов в условиях действия ТМ соответствовали изменениям уровней их транскриптов. Вероятно, регуляция водного статуса при его нарушении, вызванном воздействием солей меди и цинка, происходила на уровне транскрипции генов аквапоринов.
6. Стратегия изменений водного статуса, приводящая к адаптации хрустальной травки к повышенным концентрациям хлорида натрия и солей ТМ, состоит в снижении интенсивности водообмена в листьях и стабилизации внутриклеточного водообмена в корнях. Ключевая роль в реализации этой стратегии принадлежит белкам водных каналов, новообразование которых ингибируется или стабилизируется в условиях стресса на уровне изменения интенсивности экспрессии кодирующих их генов.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Trofimova M., Kholodova V., Bozhko K., Meshcheryakov A., Zhestkova I., Kuznetsov V., Abdeeva A., Kuznetsov V.I. Developmental and stress-regulated transition of *Mesembryanthemum crystallinum* from C3 to CAM photosynthesis: aquaporin content and cell membrane water permability // Abstracts of the ASPB, 2005.
2. Холодова В.П., Абдеева А.Р., Волков К.С., Кузнецов Вас.В., Кузнецов Вл.В. Экспрессия генов аквапоринов при адаптации растений к хлоридному засолению и солям тяжелых металлов // Тезисы докладов, Международная конференция «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия». Вологда, 2005. С. 175.

3. Abdeeva A., Kholodova V. The role of aquaporins in *Mesembryanthemum crystallinum* under salinity // Abstracts of the I (IX) International Conference of Young Botanists in Saint-Petersburg. St.Petersburg, 2006. P.223.

4. Абдеева А.Р., Волков К.С., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В.. Возможные механизмы стабилизации водного статуса при кросс-адаптации растений к засолению и тяжелым металлам // Тезисы докладов, Годичное собрание Общества физиологов растений России и конференция «Физиология растений – фундаментальная основа современной фитобиотехнологии». Ростов-на-Дону, 2006. С.49

5. Абдеева А.Р., Волков К.С., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В.. Изменение экспрессии генов аквапоринов при адаптации растений хрустальной травки к высоким концентрациям меди и цинка // Тезисы докладов, Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем». Сыктывкар, 2007. Ч.2. С.8.

6. Волков К.С., Абдеева А.Р., Холодова В.П., Юдин А.В., Кузнецов Вл.В. Протекторный эффект NaCl при адаптации растений хрустальной травки к действию высоких концентраций меди // Тезисы докладов, Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем». Сыктывкар, 2007. Ч.2. С.73.

7. Кузнецов Вл.В., Холодова В.П., Волков К.С., Абдеева А.Р. Стратегии и механизмы устойчивости растений к высоким концентрациям тяжелых металлов // Тезисы докладов, Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем». Сыктывкар, 2007. Ч.2. С.218.

8. Абдеева А.Р., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. Экспрессия генов аквапоринов в растениях хрустальной травки при индукции вобосберегающего механизма фотосинтеза САМ-типа в условиях солевого шока // Доклады Академии наук, 2008. Т.418. Ч.2.С.270-273.

9. Холодова В.П., Абдеева А.Р., Кузнецов Вл.В. Дифференциальная регуляция экспрессии генов аквапоринов как основа гомеостатирования водного режима растений в стрессовых условиях // Тезисы докладов, VI Съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Новосибирск, 2008.