

Редокс-статус и формирование аэренхимы в корне ячменя при гипоксии

Малыгин М. В.^А, Показаньева М. В.^А, Тугбаева А. С.^А,
Янушкевич М. А.^А, Киселева И. С.^{А*}

^А Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия. *E-mail: i.s.kiseleva@urfu.ru

Дефицит кислорода в почве часто возникает при избытке воды в ней, что создает гипоксичные условия для организмов, в том числе, корней растений. Это приводит к торможению дыхания и нарушению всех энергозатратных процессов [1]. Длительный период гипоксии или аноксии может привести к гибели корней, а затем и всего растения [2], не только из-за изменения энергетического метаболизма, но и редокс-статуса клеток [3]. Изучение действия гипоксии на растения и механизмов приспособления к ней являются актуальными в связи с существенными погодными флуктуациями [4]. Особый интерес может представлять изучение ответных реакций на гипоксию у сельскохозяйственных растений. Среди них есть традиционно растущие в условиях затопления и имеющие эволюционные адаптации, например рис, сахарный тростник, некоторые озимые злаки. Однако важно изучать механизмы приспособления и тех растений, которые не имеют таких эволюционных адаптаций и вынуждены формировать специальные механизмы выживания при гипоксическом стрессе.

Одним из способов преодолеть недостаток кислорода является формирование аэренхимы. Её генезис в условиях гипоксии в общих чертах известен, но многие детали до сих пор остаются неясными. Например, установлено, что этилен индуцирует образование лизигенной аэренхимы у злаков, но механизмы лизиса клеток и его контроля не до конца понятны [5]. В литературе есть немногочисленные данные о возможной роли салициловой кислоты (СК) в этом процессе [6].

Настоящее исследование направлено на изучение редокс-статуса растений ячменя в условиях гипоксии и на выявление возможных механизмов формирования аэренхимы у них в качестве приспособления к этому неблагоприятному явлению. Были изучены изменения корней при гипоксии в гидропонном эксперименте, маркеры стресса, ферменты антиоксидантной защиты, определено участие салициловой кислоты в формировании лизигенной аэренхимы.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлся яровой ячмень (*Hordeum vulgare* L., сорт «Памяти Чепелева»). Эксперимент проводили в гидропонных системах с аэрацией (нормоксия) и без аэрации (гипоксия) питательной среды Хогланда, с добавлением салици-

ловой кислоты (10^{-5} М/л) или без нее. Содержание кислорода в аэрируемой среде составило 8-10 мг/л, в неаэрируемой – 0.5-2.5 мг/л. Растения выращивали до фазы 4 листьев (25–28 день от замачивания семян). Измерения показателей проводили на 8-9 и 25–28 дни [7]. У растений измеряли длину побегов и семенных корней. Поперечные срезы базальной части корня изучали с использованием сканирующего электронного микроскопа EVO LS 10 (Carl Zeiss, Германия). Содержание супероксид анион-радикала [8], пероксида водорода [9] и МДА [10]; активность гваяколовой (ГПО) [11], бензидиновой (БПО) [12] и аскорбат-пероксидазы (АПО) [13] измеряли в базальной зоне семенных корней спектрофотометрически. Статистическая обработка выполнена в программе Statistica 13 с использованием критерия Тьюки для неравных объёмов выборки для $p < 0.05$ (TIBCO Inc., USA).

Результаты и их обсуждение. Гипоксия не влияла на длину и биомассу побега, поскольку он находился в воздушной среде, а рост корней угнетался (рис. 1), что показано и в других работах [14]. СК незначительно снижала рост корней в условиях гипоксии, но не побегов (рис. 1). Подавление роста корней при гипоксии обусловлено снижением интенсивности дыхания в них (рис.2А) и, вероятно, усилением анаэробных путей метаболизма [1, 15].

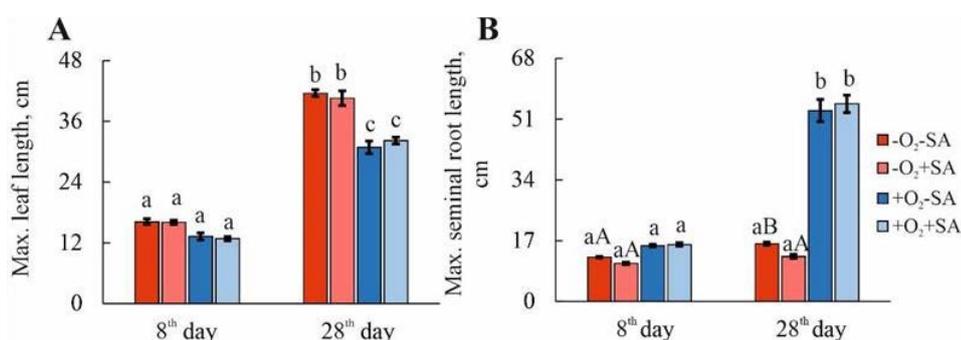


Рис. 1. Длина побегов (А) и корней (В) у ячменя в условиях гипоксии и нормоксии. Разными буквами отмечены достоверные различия ($n=7$; $p < 0.05$).

Ячмень, как и другие злаки, использует стратегию избегания гипоксии с помощью формирования аэренхимы [4], которая выполняет функцию снабжения корней кислородом [5]. В нормальных условиях аэренхима в корнях не образовывалась (рис.2 Е, F, I, J) на протяжении 28 дней, тогда как при гипоксии она формировалась уже на 8 день роста ячменя (рис.2 С, D). СК в молодых корнях усиливала формирование аэренхимы, но затем ее объемы в присутствии СК не росли (рис. 2 В, D, H). Доля проективной поверхности аэренхимы в вариантах без СК с возрастом увеличивалась. Вероятно, салициловая кислота в первые дни роста в условиях гипоксии являлась триггером образования аэренхимы. В последующие

дни СК тормозила формирование воздушных полостей. Подобный эффект наблюдали у пшеницы при обработке салицилатом [6].

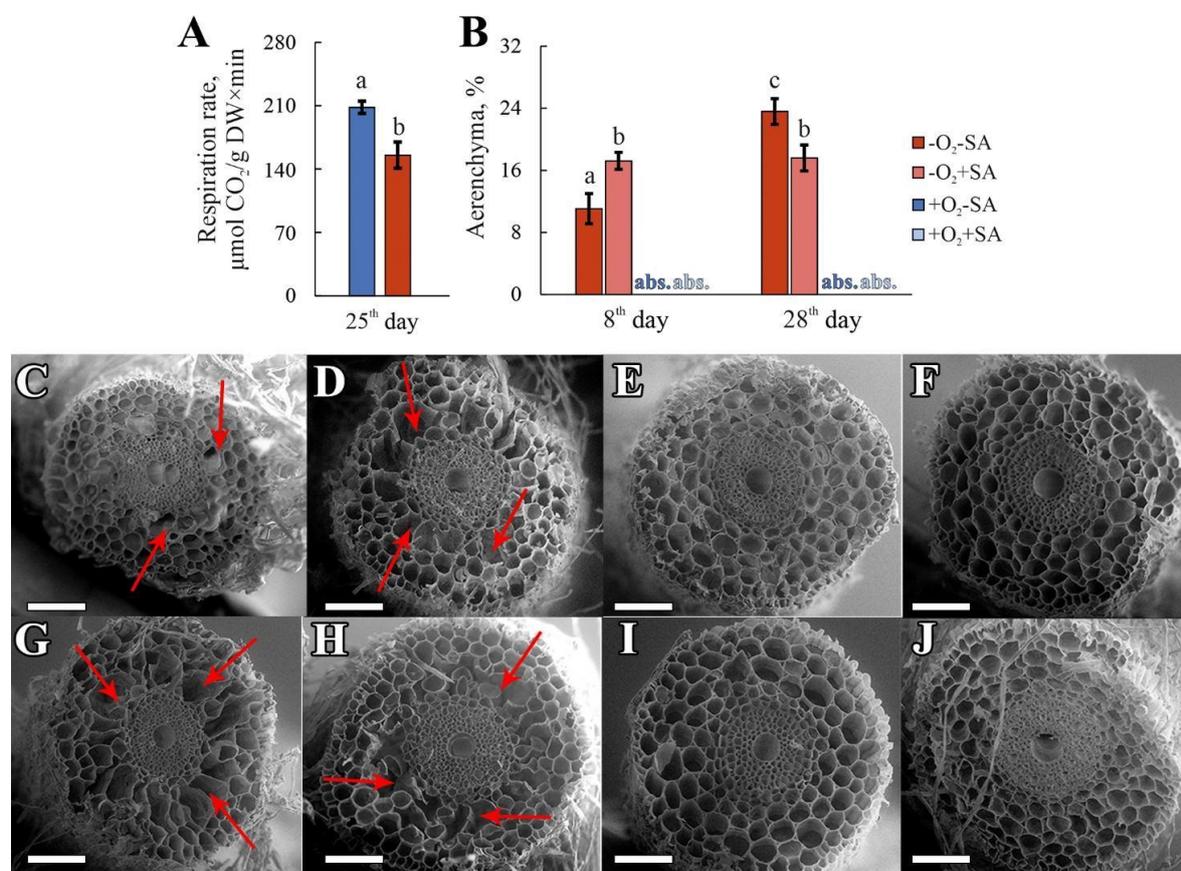


Рис. 2. Интенсивность дыхания корней (А, n=5) и парциальный объем аэренхимы (В, n=10); срезы базальной части семенных корней 8-дневных (С–F) и 28-дневных растений (G–J) в условиях гипоксии без обработки СК (С, G) и с СК (D, H), а также в условиях нормоксии без СК (С, G) с СК (F, J). Разными буквами отмечены достоверные различия (p<0.05). Стрелками отмечены аэренхимные лакуны

Подавление роста корней при гипоксии является следствием стресса. При любом виде стресса у растений происходит окислительный взрыв [15]. В наших экспериментах на 8 день роста у гипоксичных растений содержание таких АФК как супероксид анион-радикал и пероксид водорода было больше (рис. 3 А, В), чем при нормоксии. На 28 день различия у аэрируемых и неаэрируемых растений были выражены слабее, что, вероятно, связано с развитием антиоксидантных реакций [16]. СК при стрессе способствовала росту содержания супероксид анион-радикала в первые 18 дней, а пероксида водорода с 18 по 28 день (рис. 3 А, В). Такой характер изменений, вероятно, обусловлен тем, что пероксид водорода является продуктом разрушения супероксид анион-радикала ферментом супероксиддисмутазой.

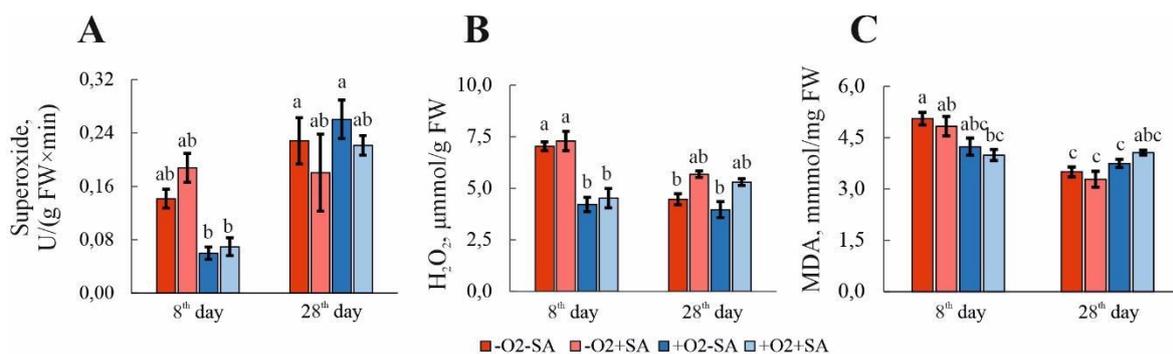


Рис. 3. Содержание супероксид анион-радикала (А; n=3), пероксида водорода (В; n=3-5); и МДА (С; n=3-4) в базальной зоне корней ячменя при нормоксии и гипоксии, в присутствии СК и без СК. Разными буквами отмечены достоверные различия ($p < 0.05$)

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гипоксичных условиях была выше только у молодых корней (рис. 3С). В более зрелых корнях различий между контролем и опытом не было, вероятно, в связи с развитием аэренхимы. СК не влияла на интенсивность ПОЛ.

Антиоксидантные ферменты – важные элементы защиты при стрессах [15]. Активность гваяколовой (ГПО), бензидиновой (БПО) и аскорбат (АПО) пероксидаз была выше в корнях растений в условиях гипоксии в сравнении с аэрируемыми условиями (рис. 4). При добавлении СК у гипоксических растений активность всех трех изученных пероксидаз возрастала. В аэрируемых условиях СК не вызывала достоверного изменения активности, кроме ГПО (рис. 4).

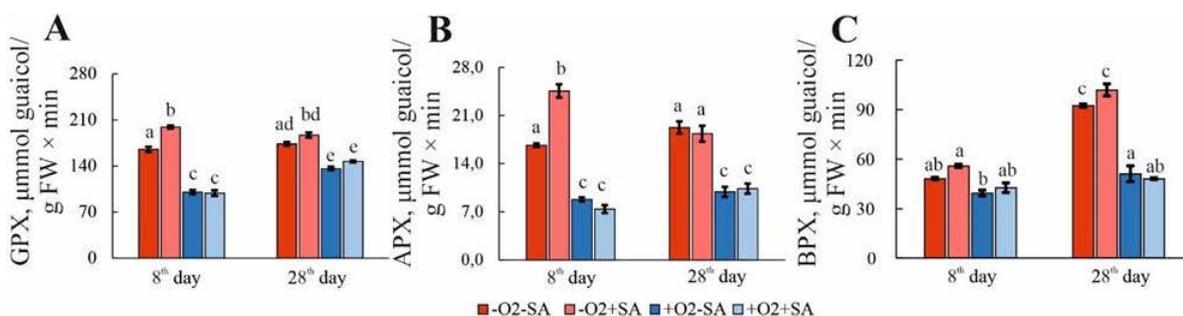


Рис. 4. Активность ферментов антиоксидантной защиты: А) ГПО; В) АПО; С) БПО. Разными буквами отмечены достоверные различия (n=4; $p < 0.05$).

Известно, что аэренхима в корнях ячменя является лизигенной [17]. Ее образование индуцируется гипоксией, которая стимулирует вакуоль-опосредованную гибель клеток. За апоптотическую гибель клеток растений отвечают протеиназы с каспазоподобной активностью. Выдвинуто предположение, что субъединица протеасомы $\beta 2$ (ген *HvPBB*) проявляет

активность, подобную каспазе-3 животных [18]. В наших опытах в условиях гипоксии в сравнении с аэрируемыми экспрессия гена *HvPBB* возрастала в базальной части корня в 8,1 раза, что дает возможность предположить участие этого гена в формировании лакун аэренхимы за счет апоптоза.

Заключение. Гипоксия, моделируемая в гидропонных условиях, вызывала у ячменя угнетение роста корней, скорости дыхания, а также приводила к значительному увеличению содержания АФК в первую неделю эксперимента. В условиях гипоксии у растений формировалась аэренхима, и происходило увеличение активности антиоксидантных ферментов, которые «гасили» активные формы кислорода, генерируемые при стрессе. Эти адаптивные механизмы способствовали уменьшению содержания активных форм кислорода и интенсивности ПОЛ, что обеспечивало выживаемость растений в условиях гипоксии, по крайней мере, до 28 дня культивирования. Аэренхима не формировалась в аэрируемых условиях в корнях ячменя независимо от наличия в среде салициловой кислоты. В гипоксических условиях формирование аэренхимы происходило уже на 8 день выращивания растений, и с возрастом ее доля от проективной поверхности коры возрастала с 12% до 20%. Таким образом, аэрация растворов в условиях гидропонного выращивания растений помогала избегать гипоксического стресса.

Салициловая кислота только в первые дни роста усиливала образование аэренхимы, и, возможно, являлась триггером этого процесса. Добавление СК в гипоксических условиях вызывало рост содержания АФК, особенно заметный на 18 день культивирования растений. В присутствии салициловой кислоты активность пероксидаз возрастала, что приводило к снижению содержания АФК и акклимации растений к условиям дефицита кислорода. Результаты, полученные в нашем исследовании, позволяют также подтвердить роль салициловой кислоты как возможного вторичного мессенджера в НАДФН-оксидазной системе, активируемой при гипоксии.

Таким образом, в условиях гипоксии в корнях ячменя меняется редокс-статус, формируется комплекс анатомо-морфологических и физиолого-биохимических механизмов, что позволяет растению акклиматизироваться в условиях стресса.

Библиографические ссылки

1. Aeration in higher plants / W. Armstrong // *Advances in Botanical Research*. – 1979. – № 7. – P. 225-332.
2. The Many Facets of Hypoxia in Plants / E. Loreti, P. Perata // *Plants*. – 2020. - V. 9, № 6. – P. 745.

3. Making sense of low oxygen sensing / J. Bailey-Serres [et al.] // *Trends in Plant Science*. – 2012. – Vol. 17, № 3. – P. 129-138.
4. Flood adaptive traits and processes: an overview / L. A. C. J. Voesenek, J. Bailey-Serres // *New Phytologist*. – 2015. – Vol. 206, № 1. – P. 57-73.
5. Aerenchyma Formation in Plants / H. Takahashi [et al.] // in *Low-Oxygen Stress in Plants: Oxygen Sensing and Adaptive Responses to Hypoxia*, eds. J. T. van Dongen, F. Licausi – Vienna: Springer Vienna, 2014. – pp. 247-265.
6. Salicylic Acid Enhances Adventitious Root and Aerenchyma Formation in Wheat under Waterlogged Conditions / M. K. Koramutla, P. A. Tuan, B. T. Ayele // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. - Vol. 23, № 3. – P. 1243.
8. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn.f / K. S. K. Chaitanya, S. C. Naithani // *New Phytologist*. – 1994. – Vol. 126, № 4. – P. 623-627.
9. Extracellular H₂O₂ Induced by Oligogalacturonides Is Not Involved in the Inhibition of the Auxin-Regulated rolB Gene Expression in Tobacco Leaf Explants1 / D. Bellincampi [et al.] // *Plant Physiology*. – 2000. – V. 122, № 4. – P. 1379-1386.
10. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Uchiyama, M. Mihara // *Analytical Biochemistry*. – 1978. – V. 86, № 1. – P. 271-278.
11. The Assay of Catalases and Peroxidases / A. C. Maehly // in *Methods of Biochemical Analysis*, ed. D. Glick. – 1954. – pp. 357-424.
12. Further observations on the peroxidatic activities of microbodies (peroxisomes) / S. Goldfischer, E. Essner // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 1969. – V. 17, № 10. – P. 681-685.
13. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts / Y. Nakano, K. Asada // *Plant and Cell Physiology*. – 1981. – V. 22, № 5. – P. 867-880.
14. Opportunities for Improving Waterlogging Tolerance in Cereal Crops-Physiological Traits and Genetic Mechanisms / C. Tong [et al.] // *Plants (Basel, Switzerland)*. – 2021. – V. 10, № 8. – P. 1560.
15. Физиологические основы устойчивости растений / Чиркова Т. В. – Санкт-Петербург: Изд-во С.-Петер. Ун-та, 2002. – pp. 244.
16. Mechanisms of lysigenous aerenchyma formation under abiotic stress / T. Yamauchi, M. Nakazono // *Trends in Plant Science*. – 2022. – V. 27, № 1. – P. 13-15.
17. Aerenchyma formation: Tansley review / D. E. Evans // *New Phytologist*. – 2004 – V. 161 – № 1 – P. 35-49
18. The proteasome is responsible for caspase-3-like activity during xylem development / J. J. Han [et al.] // *The Plant Journal*. – 2012 – V. 72 – № 1 – P. 129-141.