

# ЕКОЛОГІЯ

УДК 58.032.3

Ю. А. БОБРОВНИЦЬКИЙ

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України  
вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601, Україна

## **РЕАКЦІЇ ПРОРОСТКІВ *ARABIDOPSIS THALIANA* L. НА ПОМІРНИЙ ВОДНИЙ ДЕФІЦИТ НА КЛІТИННОМУ ТА МОЛЕКУЛЯРНОМУ РІВНЯХ**

---

Наведено дані досліджень реакції проростків арабідопсиса на помірний водний дефіцит на клітинному та молекулярному рівнях. Проростки вивчали за такими показниками: сира маса проростків, швидкість росту головного кореня, наявність та кількість розгалужених кореневих волосків, кількість клітин у стані поділу в апікальній меристемі головного кореня, довжина епідермальних клітин у зоні кореневих волосків, вміст проліну, експресія генів, чутливих до посухи. Дослідження показало, що помірний водний дефіцит рослини реагують зростанням експресії АБК-чутливих генів *RD29A* та *AtP5CS*, ключового фермента синтезу проліну, а також підвищенням вмісту проліну. Зміни викликали пригнічення приросту кореня та зниження маси рослин. Встановлено, що пригнічення приросту кореня відбувалося внаслідок зниження кількості клітин, що діляться, в апікальній меристемі.

*Ключові слова:* *Arabidopsis thaliana*, водний дефіцит, ріст кореня, розгалужені кореневі волоски, експресія генів

Як відомо, на ріст рослин впливають різноманітні несприятливі абіотичні фактори, в першу чергу такі, як посуха, високий рівень засолення ґрунту та низькі температури. Абіотичні стреси істотно обмежують розвиток рослин та формування врожаю [44, 33, 4, 27, 36]. Посуха є найбільш вагомим фактором втрати врожаю внаслідок інгібування процесу фотосинтезу та росту рослин [33]. Відомо, що вода - критичний зовнішній чинник, який визначає розвиток та поширення рослин [4].

Незважаючи на те, що в літературі широко представлені методи, які дозволяють імітувати умови природного водного стресу, відомо лише декілька спроб створити умови тривалого водного стресу для проростків *A. thaliana*, які вирощуються у стерильному агаризованому середовищі [40]. На наш погляд, у переважній більшості робіт створюються занадто жорсткі умови водного дефіциту, які полягають у простому висушуванні рослин арабідопсиса [36]. Вік рослин у цих експериментах складав 3 тижні, а висушування вийнятих з ростового субстрату рослин відбувалося на відкритому повітрі при розсіяному світлі і температурі 22°C. Внаслідок того, що більш-менш тривале перебування рослин з відкритою кореневою системою призводить до їх швидкого висихання та загибелі, тривалість досліду в цих роботах не перевищувала однієї доби [36]. З цієї причини, нами було запропоновано новий метод імітації природного водного дефіциту, при якому відбувається висушування агаризованого середовища в процесі росту рослин на ньому протягом 5 діб. Наш метод дає можливість спостерігати реакції кореневої системи на певних етапах росту проростків. Слід

відмітити також наявність лише незначної кількості робіт, де проводили вимірювання ростових показників *A. thaliana*, який вирощували в умовах водного дефіциту [45, 44].

Механізм реакції вищих рослин на водний стрес на молекулярному рівні аналізують шляхом вивчення на транскрипційному рівні експресії генів, що реагують на водний стрес [10]. На даний момент залишається не до кінця з'ясованим питання, які гени індуються водним дефіцитом в умовах, близьких до природних, оскільки в переважній більшості робіт з вивчення генної експресії імітуються умови гострого водного дефіциту. Ця проблема набуває актуальності у зв'язку із зростанням кількості трансгенних культурних рослин.

Тому метою цієї роботи було з'ясувати на клітинному та молекулярному рівнях вплив фактора зневоднення на проростки *Arabidopsis thaliana* L.

### Матеріал і методи досліджень

У роботі використовували проростки *A. thaliana* екотипу Колумбія. Насіння висівали у повне середовище Мурасіге та Скуга (МС), збагачене сахарозою (4.5 %); вміст агару у середовищі складав 1 %. На 6 день після висіву проростки із повністю розкритими сім'ядолями пересаджували на розведене чотирикратно середовище МС і вирощували в стаціонарних умовах (температурі 22°C, 16-годинному світловому дні, та рівні освітлення 80  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) протягом 5 діб. Така тривалість досліду виявилася оптимальною для спостереження за розвитком кореневої системи рослин.

Вирощування проростків проводили у чашках Петрі (12x12 см), заповнених агаризованим середовищем об'ємом 80 мл. Для створення умов пролонгованого дефіциту вологи у субстраті чашки Петрі закривали замість стандартних пластикових кришок спеціальною целофановою плівкою, яка є проникною для водяної пари. Середовище заливали в чашку Петрі під кутом 0,72°, що створювало чіткий градієнт висихання у напрямку зверху вниз. У контролі чашки Петрі, як звичайно, закривали пластиковими кришками, що виключало висихання субстрату. Схема чашки з проростками показана на рис. 1.

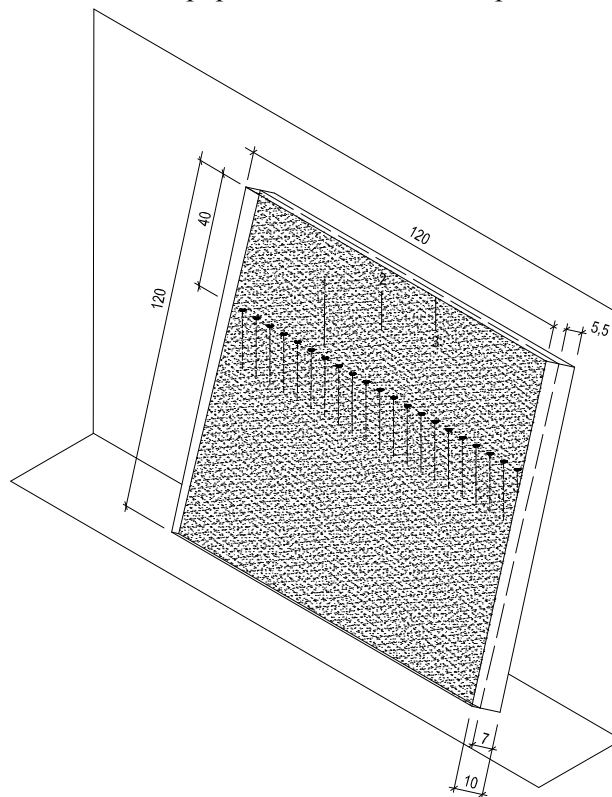


Рис. 1. Чашка Петрі, призначена для імітації водного стресу. 1- проростки *A. thaliana*; 2- агаризоване середовище; 3- чашка Петрі

Вміст вологи в субстраті визначали методом висушування зразків субстрату, відібраних на рівні 10 см від верху чашки Петрі протягом 2 діб у сушильній шафі при + 80°C. Для

розрахунку вмісту вологи зразки субстрату зважували перед висушуванням та після нього. Дослід був виконаний у 3 біологічних та 3 статистичних повторностях.

Визначення водного потенціалу (ВП) листків проводили рефрактометричним методом [2]. Дослід був виконаний у 6 біологічних та 3 статистичних повторностях.

Дослід з визначення добового приросту головного кореня був виконаний в 3 біологічних повторностях, у кожній повторності було виміряно довжину 15 корінців (1 чашка Петрі).

Дослідження мітотичної активності меристеми головного кореня проводили на інтактних проростках маркерної лінії *SusB1;1:CDB:GUS*. Забарвлені клітини меристеми спостерігали за допомогою мікроскопа Zeiss Stemi SV 6 при збільшенні 10x4,8 [7]. Дослід було проведено в 5 біологічних повторностях. Кожна повторність складала 4-6 рослин.

Вимірювання довжини епідермальних клітин проводили в зоні кореневих волосків на відстані 2 мм від кінчика. При цьому використовували мікроскоп Zeiss Axiovert 35, обладнаний мікрометричною насадкою [7]. Дослід було проведено в 2 біологічних повторностях. Кожна повторність складала 15 рослин.

Кількість розгалужених кореневих волосків на головному корені проростків підраховували в зоні кореневих волосків на відстані 2 мм від кінчика на п'ятий день досліду. Дослід було проведено в 3 біологічних повторностях. Кожна повторність складала 5-10 рослин.

Концентрацію проліну в проростках визначали за допомогою методу, що базується на нінгідриновій реакції [1]. Дослід було проведено в 5 біологічних повторностях. Кожна повторність складала 15 рослин.

Експресію стрес-індукованих генів визначали методом ПЛР в реальному часі, як описано в роботі [1]. Дослід було проведено в 3 біологічних повторностях. Кожна повторність складала 15 рослин.

### Результати досліджень та їх обговорення

#### *Водний потенціал субстрату та листків під впливом водного стресу*

В якості маркерів водного дефіциту, що створювався у нашому досліді, було обрано два показники: 1) водний потенціал (ВП) субстрату, який характеризує стан ростового субстрату; 2) ВП листків, який характеризує стан рослин.

ВП субстрату в контролі протягом експерименту залишався постійним і складав – 0,034 МПа (табл.1). В експерименті вологість субстрату поступово знижувалась: за 4 перші доби в 3 рази, з – 0,034 МПа до – 0,109 МПа, а від 4-ї доби до 5-ї – у 7 раз, від – 0,109 МПа до – 0,743 МПа.

Перед початком досліду ВП листків становив близько – 0,19 МПа. Надалі в контролі він різко збільшився одразу після пересадки на 1-у добу, на 3-ю добу досяг найвищих значень (близько – 0,07 МПа), а на 5-у добу упав до – 0,13 МПа. В умовах експерименту також спостерігали зростання цього показника після пересадки до – 0,12 МПа на 1-у добу. В подальшому за дії стресу ВП листків знизився до – 0,16 МПа на 3-ю добу та – 0,22 МПа на 5-у добу.

Таблиця 1

Ознаки ростової системи проростків *A. thaliana* в стаціонарних умовах вирощування та при дії помірною водного дефіциту

Доба	Водний потенціал листків, МПа		Водний потенціал середовища, МПа
	К, M+m, N=6	Д M+m, N=6	Д M+m, N=3
0	-0,19±0,01	-0,19±0,01	-0,03
1	-0,09±0,008	-0,12±0,01	-0,063
2	.		-0,078
3	-0,07	-0,16±0,03	-0,078
4			-0,110
5	-0,13±0,008	-0,22±0,02	-0,743

Примітки: К-контроль; Д-дослід (тут і в таблицях 2-4)

Одержані дані показують, що ВП середовища та листків знаходилися в межах значень, що характеризують помірний водний дефіцит, і на 5-у добу вологість субстрату не досягала рівня, характерного для гострого водного дефіциту [44; 22]. Причому слід відмітити, що ВП листків протягом експерименту був нижчим за ВП середовища. Тому можна зробити висновок, що проростки в умовах стресу здатні підтримувати градієнт ВП, який забезпечує рух води у системі субстрат-рослина.

Дані порівняльних досліджень за показниками сирової маси проростків, швидкості росту головного кореня, наявності та кількості розгалужених кореневих волосків, активності апікальної меристеми головного кореня, довжини епідермальних клітин в зоні кореневих волосків, вмісту проліну, експресії генів, чутливих до посухи, наведені в табл. 2-3.

*Вплив водного стресу на інтегральні ростові показники*

Як видно з таблиці 2, приріст сирової маси був приблизно лінійним протягом 5 днів в контролі та експерименті, але, починаючи з 3-ї доби, експериментальні рослини почали значно відставати від контрольних за цим показником. В результаті, на 5-у добу маса рослин в умовах стресу була майже в 1,5 раза менша, ніж у контролі.

Таблиця 2

Морфологічні ознаки проростків *A. thaliana* в стаціонарних умовах вирощування та при дії помірного водного дефіциту

Доба	Приріст кореня, мм		Маса рослин, мг		Кількість клітин меристеми головного кореня в стані поділу, шт.		Довжина епідермальних клітин зони кореневих волосків, мкм		Відсоток розгалуж. кор. волосків, %	
	К, M±m, N=45	Д, M±m, N=45	К, M±m, N=3	Д, M±m, N=3	К, M±m, N=20	Д, M±m, N=21	К, M±m, N=28	Д, M±m, N=26	К, M±m, N=15	Д, M±m, N=30
0			1,16±0,162	1,16±0,162	14,3±0,34	14,3±0,34				
1	1,86±0,39	1,03±0,26	1,53±0,15	1,43±0,13	23,5±1,08	13,1±0,96	81,24±27,55	62,13±17,7	0,0	10,0
2	3,07±0,34	2,85±0,05	1,74±0,37	1,66±0,33	26,4±0,53	14,7±0,39	93,76±28,33	70,91±25,3	0,7	12,9
3	4,25±0,45	3,79±0,81	2,28±0,47	1,79±0,42	31,4±0,66	8,1±0,39	92,55±28,22	72,23±20,16	0,1	1,9
4	4,4±0,88	3,39±0,74	2,33±0,13	1,84±0,33	22,3±0,82	4,2±0,27	96,4±30,72	73,89±18,84		
5	4,12±0,56	1,5±0,71	3,08±0,75	2,08±0,43	25,2±0,49	2,8±0,15				

Після пересадки на розведене середовище МС в контролі відбувалася поступова активація росту головного кореня: приріст кореня досягав постійних значень на 3-у добу й істотно не змінювався до кінця експерименту. В експерименті також відмічено активацію росту кореня у перші 3 дні після пересадки, проте приріст був нижчим порівняно з контролем. На 4-у та 5-у доби ріст кореня пригнічувався, внаслідок чого довжина головного кореня в умовах стресу була приблизно в 1,5 раза меншою за таку в контролі.

У наших дослідженнях показано паралельне зниження маси рослин та приросту головного кореня одночасно з посиленням водного стресу. В більшості досліджень, проведених на однодольних і дводольних рослинах, встановлено, що водний дефіцит інгібує ріст головного кореня, причому ця дія зростала з посиленням стресорного чинника [16; 25; 24; 41; 44; 48]. Водночас, в окремих випадках помірні значення водного дефіциту не мали дії на приріст кореня або навіть спостерігалася незначна стимуляція росту, зокрема, у рослин *Pinus pinaster* [26, 42], *Glycine max* [13], та *A. thaliana* [44].

Найбільшу та водночас статистично достовірну різницю у прирості відмічено лише на 1-у добу, а також на 5-у добу. В інші дні різниця в прирості не була статистично достовірною, а найменшою була на 2-у добу та 3-у добу, коли прирости в контролі та стресі незначно відрізнялися між собою (стрес складав 93% та 89% від контролю на 2-у та 3-у добу, відповідно). Ці дані можна пояснити відмінностями рослини та середовища, яку встановлено в нашому експерименті. На початку дослідження ВП середовища був ще достатньо високим і значно вищим за ВП рослин (-0,06/-0,12 МПа на 1-у добу, -0,08/-0,16 МПа на 3-у добу), тому останні реагували приростом кореня та збільшенням поверхні поглинання. В протилежність цьому, на 5-у добу ВП середовища значно знизився (до -0,743 МПа), а ВП листків на цю добу склав -0,22 МПа. Отже, в умовах, коли ВП листків був вищим за ВП середовища, відбувалося пригнічення росту рослин, зокрема, головного кореня.

Дослідження трансгенних рослин за цикліном В1 лінії *Cus BI: GUS* показало, що в контролі кількість клітин апікальної меристеми головного кореня, що діляться, зростало у перші 3 дні після пересадки; надалі відбувалося деяке уповільнення поділу клітин. На відміну від контролю, в умовах стресу кількість меристематичних клітин, які ділилися, протягом 1-ї та 2-ї доби істотно не змінювалася, надалі відбувалося стійке уповільнення поділу, яке тривало до загибелі рослин на 6-у добу (табл. 2).

Ми провели вимірювання довжини епідермальних клітин головного кореня в зоні диференціювання, які не утворюють кореневих волосків, так званих атрихобластів, оскільки зниження швидкості росту головного кореня може відбуватися як внаслідок зниження швидкості поділу меристематичних клітин, так і уповільнення процесу розтягання клітин кореня. Довжина атрихобластів в експерименті була меншою порівняно з контролем протягом усього дослідження приблизно на 25 %, причому цей показник майже не змінювався із збільшенням відстані від верхівки. Водночас, в контролі довжина клітин, розміщених далі від верхівки, була меншою, ніж довжина клітин, розміщених більш дистально (95 мкм та 80 мкм відповідно). Ймовірно, це явище відображає активацію приросту кореня в контролі. Отже, хоча різниця за довжиною клітин в умовах стресу та контрольованого варіанту і мала місце, відмінності між цими двома групами за приростом кореня були значно більш вираженими.

Відомо, що ріст рослин залежить від поділу клітин та їх розтягу [47, 48]. Згідно однієї точки зору, швидкість росту органу визначається розміром клітин, якого вони досягають в зоні розтягу [18]. Згідно іншої теорії, ріст органу відбувається внаслідок утворення нових клітин в зоні поділу [9]. Ці дві теорії не є взаємнесумісними [5].

Як показано в наших експериментах, основним наслідком зменшення приросту головного кореня арабідопсиса порівняно з контролем було пригнічення активності апікальної меристеми. Коефіцієнт кореляції між кількістю клітин, що діляться, та приростом кореня був високим і складав 0,91 для стресу та 0,61 для контролю. Водночас, було встановлено відносно незначний вплив розтягу клітин на приріст головного кореня, оскільки довжина клітин в умовах стресу була нижчою, ніж в контролі приблизно на 20 %.

Аналіз літературних даних виявив результати, подібні до отриманих в даній роботі. У переважній кількості робіт показано позитивну кореляцію між приростом кореня та поділом клітин апікальної меристеми як при інгібуванні, так і при стимуляції приросту внаслідок водного дефіциту. Зокрема, у роботі [44] поділ клітин кореня арабідопсиса корелює з приростом як у контролі, так і в умовах помірного та сильного стресу. У коренях спостерігали швидке падіння мітотичної активності після встановлення водного дефіциту у різних видів: *Triticum durum* [6], *Pisum sativum* [8], *Helianthus annuus* [29], та *Vicia faba* [51]. Стосовно остаточної довжини, яку клітини кореня досягають в зоні диференціації, припускається, що у арабідопсиса цей показник є достатньо стабільним і змінюється незначним чином [44, 47].

*Утворення розгалужених кореневих волосків в умовах стресу*

В умовах помірного водного стресу спостерігали значну кількість розгалужених кореневих волосків (РКВ) на головному корені *A.thaliana* (8,27%). У контролі їх практично не спостерігали (0,27%). Найбільша кількість розгалужених волосків в умовах водного дефіциту утворювалася на 1-у та 2-у добу (10% та 12,9% відповідно), а надалі їх кількість зменшувалася

(1,9%). Припускаємо, що утворенню розгалужених волосків сприяли помірні значення водного дефіциту.

Утворення кореневих волосків значною мірою залежить від вологості субстрату поблизу кореня [43]. Утворення кореневих волосків обумовлює низка клітинних процесів, включаючи формування цитоскелету, верхівковий градієнт цитоплазматичного кальцію та везикулярний транспорт [15, 11]. РКВ є частиною відповіді рослин на несприятливі фактори середовища, оскільки в звичайних умовах їх утворюється мало [33]. Ці фактори включають дисбаланс деяких іонів в ростовому середовищі, зокрема, дефіцит  $Mn^{2+}$  [34] та надлишок  $NH_4^+$  [50]. Добре відоме утворення РКВ у рослин родини бобових, де воно є наслідком взаємодії між рослиною та азотфіксуючими бактеріями [21].

Механізм утворення РКВ включає зазвичай порушення верхівкової полярності кореневого волоска під час росту останнього. До цих порушень можуть призводити, зокрема, руйнування верхівкового градієнту кальцію [21], мутації білків, що утворюють цитоскелет, актинів та тубулінів [14], та білків, що регулюють динаміку цитоскелету, зокрема, ROP GTPази [17]. Всі, чи частина цих чинників можуть бути задіяні і в нашому випадку.

*Зростання концентрації проліну при водному дефіциті*

Нами проведено вимірювання вмісту проліну у проростках, що вирощувалися в умовах водного стресу та в контролі (табл. 3). В перші 2 дні після пересадки вміст проліну в умовах стресу не перевищував істотно контрольних значень. На 3-ю добу він зріс до 0,074 мкг/г сирової ваги, на 4-у добу - до 0,106 мкг/г сирової ваги, і на 5-у добу - до 0,149 мкг/г сирової ваги. В результаті на 4-у та 5-у добу вміст проліну був у досліді приблизно в 3,5 раза вищим, ніж у контролі.

Таблиця 3

Біохімічні та молекулярні ознаки проростків *A. thaliana* в стаціонарних умовах вирощування та при дії помірного водного дефіциту

Доба	Вміст проліну в проростках, мкг/мг сирової маси			Генна експресія, відносні одиниці				
				Rd29A	AtP5CS	Rd17	DREB2A	ERD1
	К, M±m, N=5	Д, M±m, N=5	Д/К, M, N=3	Д/К, M, N=3	Д/К, M, N=3	Д/К, M, N=3	Д/К, M, N=3	Д/К, M, N=3
0	0,179±0,089	0,179±0,089	1	1	1	1	1	1
1	0,043±0,003	0,057±0,021	1,32	0,18	1,31	1,3	1,09	0,52
2	0,045	0,057±0,026	1,28	2,67	1,24	0,74	0,6	1,19
3	0,046±0,004	0,074±0,016	1,61	5,58	3,51	1,69	0,61	0,5
4	0,032	0,106±0,023	3,31	10,7	6,53	1,39	0,94	0,36
5	0,042±0,009	0,149±0,065	3,58	2,48	5,47	1,73	1	0,42

Спеціалізованими сполуками, які служать для підтримання осмотичного гомеостазу в рослинній клітині, є сумісні осмоліти - невелика група органічних сполук, які є високорозчинними та не перешкоджають клітинному метаболізму навіть у високих концентраціях [10]. Одним з найважливіших сумісних осмолітів є амінокислота пролін. Крім функції осмопротектора [12], пролін є також регулятором окисно-відновного потенціалу [32], він зв'язує радикал гідроксилу [39], захищає макромолекули від денатурації [35], та знижує рН всередині клітини [46].

Ми спостерігали поступове і відносно помірне зростання вмісту проліну. Підвищення вмісту проліну під впливом водного дефіциту неодноразово відмічено і в літературі, проте у відомих нам джерелах зростання було значно більшим [19; 28; 52]. Хоча у цих роботах не наведено кількісні дані стосовно інтенсивності стресу, можна припустити, що причина значно сильнішого зростання вмісту проліну у цих експериментах полягає в більш жорстких умовах водного дефіциту. Порівнюючи ВП середовища та концентрацію проліну в нашій роботі, можна зробити висновок про високу негативну кореляцію між цими двома показниками (-0,83 для стресу та -0,99 для контролю), яку ймовірно, можна пояснити тим, що причиною зростання вмісту проліну був саме водний дефіцит. Слід відмітити, що літературні дані свідчать про

наявність негативного впливу накопичення осмотично активних речовин, в т.ч. проліну, на інтенсивність росту клітин та органів [31; 3]. Так, показано, що піролін-5-карбоксилат (P5C) та, можливо, інші проміжні сполуки біосинтезу проліну можуть бути токсичними для клітин [23, 49]. Отже, уповільнення приросту кореня в нашому досліді може бути наслідком саме накопичення проліну.

*Експресія стрес-індукованих генів в умовах помірного водного дефіциту*

Для дослідження експресії деяких стрес-індукованих генів в умовах пролонгованого водного стресу для *A.thaliana* були обрані наступні гени: *DREB2A*, *RD17*, *RD29A*, *ERD1*, *AtP5CS*. Експресія цих генів відображає різноманітні сторони адаптації рослин до водного дефіциту. У табл. 4 наведено функції цих генів.

Таблиця 4

Список генів, експресія яких вивчалася в даній роботі

Код	Ім'я	“Прямий” праймер	“Зворотний” праймер	Функція
At5g05410	DREB2A	cga gtt tga aca taa cta ttg g	ttg agg ctt tgt agc gga tc	Транскрипційний фактор, АБК незалежний
At1g20440	RD17	gaa caa gcc tag tgt cat cga	ggt agt gga aac tgg tac atc	LEA білок групи 2 (дегідрин). Індукується DREB2A, АБК незалежний
At5g52310	RD29A	gtt act gat ccc acc aaa gaa g	gtc cat tcc agt ttc agt ctt c	Білок, подібний до LEA білків групи 2. Індукується DREB2A та АБК
At2g39800	ATP5CS	gat ttg gac ttg gtg cag agg	tat gag tac taa gca gag agg a	Ключовий фермент біосинтезу проліну. АБК залежний
At5g51070	ERD1	ctt tct cta tca gca cga aac g	ttt ttt cca cca ggt cca gaa c	АТР-залежна Сір протеаза, БТШ групи 2. DREB2A та АБК незалежний
At3g62250	Ubq5	aac cct tga ggt tga atc atc c cga	gtc ctt ctt tct ggt aaa cgt	Убіквітин 5
At4g20890	Tub9	gta cct tga agc ttg cta atc cta	ggt ctg gac gtt cat cat ctg ttc	Тубулін 9

Відносна (стрес/контроль) експресія генів *RD29A* та *AtP5CS*, була більшою за одиницю (рівень експресії в умовах стресу є вищим, ніж в контролі) протягом усього експерименту, за винятком 1-ї доби для *RD29A* (табл.3). Протягом експерименту експресія поступово зростала, досягаючи максимальних значень на 4-у добу та 5-у добу. Для *RD29A* найвищі значення експресії склали 10,77 а для *AtP5CS* – 6,53 (стрес/контроль).

Як відомо, 40 генів (що відповідає 11% від усіх стрес-індукованих генів) різноманітних транскрипційних факторів (ТФ) були ідентифіковані як гени, експресія яких індукується посухою, холодом або осмотичним стресом. Серед цих ТФ, зокрема, було шість, що належать до підродини *DREB* [36].

У нашому експерименті було визначено експресію одного ТФ з цієї групи, а саме, *DREB2A*. Як видно (табл.3), істотних змін експресії *DREB2A* протягом досліді не спостерігали. Значення відносної експресії були близькими до одиниці, незначно відхиляючись у більший або менший бік.

*RD17* є одним із генів-мішеней для *DREB2A*, елементом АБК-незалежного шляху. Як видно, суттєвих змін експресії *RD17* протягом експерименту не відмічено. І, нарешті, результати вивчення експресії *ERD1*, що є елементом окремого АБК-незалежного шляху передачі сигналу при водному стресі [38], показують, що зростання експресії цього гена при

водному стресі відсутнє. Навпаки, спостерігали нижчу експресію *ERD1* при водному стресі порівняно з контролем протягом усього експерименту, за винятком 2-ї доби.

Аналіз експресії генів, які реагують на водний, сольовий, та холодний стреси, показав наявність кількох регуляторних систем, що відповідальні за стрес-індуковану генну експресію. Частина генів є АБК-залежними, в той час, як решта - АБК-незалежні [10;37], що вказує на наявність комплексних регуляторних механізмів між сприйняттям сигналу про абіотичний стрес та експресією генів [37; 53]. На даний момент ідентифіковано два основних елементи в промоторах стрес-індукованих генів: елемент відповіді на АБК - ABRE (abscisic acid responsive element) та елемент відповіді на зневоднення - DRE (dehydration responsive element). Проведений у цьому досліді аналіз генної експресії показав, що крім *AtP5CS*, зростає експресія ще одного АБК-залежного гена, *RD29A*. Хоча функція білка RD29A і мало вивчена, різке зростання його експресії при зневодненні дозволяє використовувати його як маркер водного стресу в багатьох дослідженнях [36;20]. Водночас значення експресії цих двох генів не досягають рівня, характерного для гострого водного дефіциту [52; 30].

Накопичення ж самого проліну відбувалося завдяки дії *AtP5CS*, ключового фермента синтезу проліну. Високий рівень кореляції між цими двома показниками, експресією *AtP5CS*, та концентрацією проліну (коефіцієнт кореляції становив 0.93) є одним зі свідчень на користь факту, що *AtP5CS* є ключовим ферментом синтезу проліну [52].

Іншим важливим шляхом реакції на водний стрес є той, що опосередковується ТФ родини DREB. В нашій роботі не відмічено істотного зростання ні самого *DREB2A*, ні генів, експресія яких контролюється цим ТФ. Це може бути непрямим свідченням переважної ролі АБК-залежного шляху та самої абсцизової кислоти в реакції рослин арабідопсиса на помірний водний стрес.

### Висновки

У даній статті викладено отримані експериментальні дані стосовно реакції проростків арабідопсиса на помірний водний дефіцит на клітинному та молекулярному рівні. Метод імітації водного дефіциту, створений в нашій роботі, охарактеризовано через два параметри-водні потенціали ростового субстрату та листків, величина яких знаходилась в межах значень, характерних для помірного водного дефіциту.

Дослідження показало, що рослини реагують зростанням експресії АБК-чутливих генів *RD29A* та *AtP5CS*, ключового фермента синтезу проліну, а також підвищенням вмісту самого проліну. Ці зміни вкликали пригнічення прроди кореня внаслідок активності поділу клітин апікальної меристем, а також зниження маси рослин. Окремо слід виділити таку адаптацію, як утворення розгалужених кореневих волосків, які можуть збільшувати поглинання води на початкових етапах дії водного дефіциту.

1. Бобровницький Ю. Експресія деяких генів, що індукуються водним стресом, у проростках *Arabidopsis thaliana*, вирощуваних за умов помірного водного дефіциту/ Ю. Бобровницький // *Biopolym. Cell.*– 2011.–Т. 27.–С. 59–65.
2. Векірчик К.М. Фізіологія рослин. Практикум./ К.М. Векірчик – К.:Вища школа, 1984.–240 с.
3. Жолкевич В.Н. Взаимодействие теплового шока и водного стресса у растений. 2. Осморегуляция в листьях растений хлопчатника при последовательном действии кратковременной гипертермии и почвенной засухи/ В.Н. Жолкевич, Н.К. Зубкова, С.Н. Маевская [и др.]// *Физиология растений.*– 1997.– Т.44.– С. 613–623.
4. Кордюм Е..Л., под редакцией. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях./ Е.Л. Кордюм– К.:Наукова Думка, 2003. – 277 с.
5. Beemster G.T. Variation in growth rate between *Arabidopsis* ecotypes is correlated with cell division and A-type cyclin-dependent kinase activity/ G.T.Beemster , K. De Vusser, E. De Tavernier [et al.] // *Plant Physiol.* – 2002.– №129. – P. 854–864.
6. Bitonti M.B. Response of meristematic cells to osmotic stress in *Triticum durum*/ M.B. Bitonti, F.Ferraro, C.Floris, A.M. Innocenti// *Biochem. Physiol. Pfl.*–1991.– № 187.– P. 453–457
7. Bobrownyzky J. A method for the imitation of drought stress in *Arabidopsis thaliana*/ J. Bobrownyzky J. // *Інтродукція рослин .*– 2006.– № 1.–С. 98–105.



8. *Bracale M.* Water deficit in pea root tips: effects on the cell cycle and on the production of dehydrin-like proteins/ M. Bracale, M. Levi, C. Savini [et al.] // Ann. Bot.–1997.– № 79.– P. 593–600.
9. *Bradford K.J.* Sensitivity thresholds and variable time scales in plant hormone action/ Bradford K.J., Trewavas A.J.// Plant Physiol.– 1994.– № 105.– P. 1029–1036.
10. *Bray E.* Plant responses to water deficit/ Bray E //Trends Plant Sci.– 1997.– № 2.–P.48–54.
11. *Carol R.J.* Building a hair: tip growth in *Arabidopsis thaliana* root hairs/ R.J. Carol, L. Dolan //Philos. T. Roy. Soc. B.–2002.– № 357.–P.815–821.
12. *Christian J.H.* The influence of nutrition on the water relations of *Salmonella oranienburg*/ J.H. Christian // Aust. J. Biol. Sci.– 1955.– № 8.– P.75–82.
13. *Creelman R.A.* Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. Analysis of growth, sugar accumulation and gene expression/ R.A. Creelman, H.S. Mason, R.J. Bensen [et al.] // Plant Physiol.–1990.– № 92.– P. 205–214.
14. *Diet A.* The enr mutants enhance the lrx1 root hair mutant phenotype of *Arabidopsis thaliana*/ Diet A., Brunner S., Ringli C. // Plant Cell Physiol. –2004.– № 45.– P. 734–741.
15. *Galway M.E.* Growth and ultrastructure of *Arabidopsis* root hairs: the rhd3 mutation alters vacuole enlargement and tip growth/ M.E. Galway, J.W. Heckman, J.W. Schiefelbein //Planta.–1997.– № 201.– P. 209–218.
16. *Gingrich J.R.* Effect of soil moisture tension and oxygen concentration on the growth of corn roots / J.R. Gingrich, M.B. Russell // Agron. J.–1956.– № 48.–P. 517–520.
17. *Jones M.* Nuclear dynamics during the simultaneous and sustained tip growth of multiple root hairs arising from a single root epidermal cell/ Jones M., Smirnoff N. // J.Exp. Bot.–2006.– № 57.– P. 359–364.
18. *Kaplan D.R.* The relationship of cells to organisms in intact plants: problem and implications of an organismal perspective/ D.R. Kaplan // Int. J. Plant Sci.–1992.– № 153.– S28–S37.
19. *Kavi Kishor P.B.* Overexpression of  $\Delta$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants/ P.B.Kavi Kishor, Z. Hong, C.-H. Miao [et al.] //Plant Physiol.– 1995.–108.– № 4.– P. 1387–1394.
20. *Kim J.-M.* Alterations of lysine modifications on the histone H3 N-tail under drought stress conditions in *Arabidopsis thaliana*/ J.-M.Kim, T.K. To, J. Ishida [et al.]//Plant Cell Physiol.– 2008.– № 49.– P. 1580–1588.
21. *Lévy J.* A putative Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses/ J.Lévy, C. Bres, R. Geurts [et al.] // Science.–2004.– № 303.–P.1361–1364.
22. *Mane S.* Early PLD $\alpha$ -mediated effects in response to progressive drought stress in *Arabidopsis*: a transcriptome analysis/ S.P. Mane, C. Vasquez-Robinet, A.A. Sioson [et al.] // J. Exp. Bot.– 2006.– № 58.– P. 241–252.
23. *Mani S.* Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*/ S. Mani, B. Van De Cotte, M. Van Montagu, N. Verbruggen // Plant Physiol.–2002.– № 128.– P. 73–83.
24. *Materechera S.* Growth of seedling roots in response to external osmotic stress by polyethylene glycol 20 000/ S.A. Materechera, A.R. Dexter, A.M. Alston, J.M. Kirby // Plant Soil .– 1992.– № 143.– P. 85–91.
25. *Mirreh H.F.* Influence of soil water matric potential and resistance to penetration on corn root elongation/ H.F. Mirreh, J.W. Ketcheson // Can. J. Soil Sci.–1973.– № 53.–P. 383–388.
26. *Nguyen A.* Variation in growth and osmotic regulation of roots of water-stressed maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) provenances/ A. Nguyen, A. Lamant // Tree Physiol.–1989.– № 5.–P. 123–133.
27. *Oono Y.* Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray/ Y. Oono, M. Seki, N. Tokihiko [et al.] // Plant J. – 2003. – № 34.– P. 868–887.
28. *Rizhsky L.* When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress/ L. Rizhsky, H. Liang, J. Shuman [et al.] //Plant Physiol.–2004.– № 134.–P.1683–1696.
29. *Robertson J.M.* Developmental responses to drought and abscisic acid in sunflower roots. 2. Mitotic activity/ J.M. Robertson, E.C. Yeung, D.M. Reid, K.T. Hubick // J. Exp. Bot.–1990.– № 41.– P. 339–350.
30. *Sakuma Y.* Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression / Y. Sakuma, K. Maruyama, Q. Feng [et al.]//Proc. Natl. Acad. Sci. – 2006. –№ 103.– P. 18822–18827.
31. *Sanchez-Aguayo I.* Quantitative determination of changes induced by NaCl in vacuoles and cellular size of *Lycopersicon esculentum* root cells/ I. Sanchez-Aguayo, A.L. Gonzalez-Utor //Plant Cell Environ.–1992.– № 15.–P.867–870.
32. *Saradhi A.* Proline accumulation under heavy metal stress/ A. Saradhi, P. P. Saradhi // J. Plant Physiol.– 1991.– № 138: P. 554–558.

33. *Schiefelbein J.* Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot/ *J. Schiefelbein* // *Curr. Opin. Plant Biol.*– 2003.– № 6.– P. 74–78.
34. *Schmidt W.* Inner voices meet outer signals: The plasticity of rhizodermic cells / *W. Schmidt* // *Plant Sci.*– 2008.– № 174.– P. 239–245.
35. *Schobert B.* Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins/ *B. Schobert, H. Tschesche* // *Biochim. Biophys. Acta.*–1978.– № 541.–P. 270–277.
36. *Seki M.* Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray / *M. Seki, M. Narusaka, J. Ishida [et al.]*// *Plant J.* – 2002. – № 31.– P. 279–292.
37. *Shinozaki K.* Molecular responses to dehydration and low temperature:differences and cross-talk between two stress signaling pathways/ *K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki* // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2000. – № 3.– P. 217–223.
38. *Shinozaki K.* Gene networks involved in drought stress response and tolerance/ *K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki* // *J. Exp. Bot.*– 2007.– № 58.– P. 221–227.
39. *Smirnoff N.* Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes/ *N. Smirnoff, Q. J. Cumbes* // *Phytochemistry.*– 1989.– № 28.– P. 1057–1060.
40. *Söderman E.* The HD-Zip gene ATHB6 in Arabidopsis expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions/ *E. Söderman, M. Hjellström, J. Fahleson, P. Engström* // *Plant Mol. Biol.* – 1999.– № 40.– P. 1073–1083.
41. *Spollen WG.* Regulation of cell expansion in roots and shoots at low water potentials/ *W.G. Spollen, R.E. Sharp, I.N. Saab, Y. Wu.* In: *Smith JAC, Griffiths H, eds. Water deficits. Plant responses from cell to community.*–Oxford: BIOS, 1993.– P. 37–52.
42. *Triboulot M-B.* Stimulation and inhibition of pine root growth by osmotic stress/ *M.-B. Triboulot, J. Pritchard, D. Tomos* // *New Phytol.*–1995.– № 130.– P. 169–175.
43. *Uphoff J.C.T.* Plant hairs./ *J.C.T. Uphoff, K. Hummel* In: *Encyclopedia of plant anatomy. Vol. IV (5).*–Berlin: eds. Gebr. Borntraeger, 1962.
44. *Van der Weele C.M.* Growth of Arabidopsis thaliana seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media/ *C.M. Van der Weele, W.G. Spollen, R.E. Sharp, T.I. Baskin* // *J. Exp. Bot.*– 2000.– № 51.– P. 1555–1562.
45. *Vartanian N.* Drought rhizogenesis in Arabidopsis thaliana/ *N. Vartanian, L. Marcotte, J. Giraudat* // *Plant Physiol.* – 1994. – № 104.– P. 761–767.
46. *Venekamp J. H.* Organic acids as sources of drought-induced proline synthesis in field bean plants, *Vicia faba L./ J. H. Venekamp, J.E.M. Lampe, J.T.M. Koot* // *J. Plant Physiol.*–1989.– № 133.– P. 654–659.
47. *Werner T.* Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity/ *T. Werner, V. Motyka, V. Laucou [et al.]* // *Plant Cell.*–2003.– № 15.–P. 2532–2550.
48. *West G.* Cell cycle modulation in the response of the primary root of Arabidopsis to salt stress/ *G. West, D. Inzé, G.T.S. Beemster* // *Plant Physiol.*–2004.– № 135.– P. 1050–1058.
49. *Yamada M.* Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress/ *M. Yamada, H. Morishita, K. Urano [et al.]* // *J. Exp. Bot.*–2005.– № 56.– P. 1975–1981.
50. *Yang N.* Ammonium-stimulated root hair branching is enhanced by methyl jasmonate and suppressed by ethylene in Arabidopsis thaliana/ *N. Yang, C. Zhu, L. Gan [et al.]*// *Journal of Plant Biology* .–2011.– № 54.– P. 92–100.
51. *Yee V.F.* Polyethylene glycol induced water stress in *Vicia faba* seedlings: cell division, DNA synthesis and a possible role for cotyledons/ *V.F. Yee, T.L. Rost* // *Cytologia.*–1982.– № 47.– P. 615–624.
52. *Yoshida Y.* Correlation between the induction of a gene for  $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in Arabidopsis thaliana under osmotic stress/ *Y. Yoshida, T. Kiyosue, T. Katagiri, [et al.]*// *Plant J.* – 1995. –№ 7.– P. 751–760.
53. *Zhu J.K.* Cell signaling under salt, water and cold stresses/ *J.K. Zhu* // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2001. – № 4.– P. 401–406.

Ю.А. Бобровницкий

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев

РЕАКЦИИ ПРОРОСТКОВ *ARABIDOPSIS THALIANA* L. НА УМЕРЕННЫЙ ВОДНЫЙ ДЕФИЦИТ НА КЛЕТОЧНОМ И МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ

Приведены данные исследований реакции проростков резушки Таля (*Arabidopsis thaliana* L.) на умеренный водный дефицит на клеточном и молекулярном уровнях. Проростки изучали по следующим показателям: сырой вес, скорость роста главного корня, наличие и количество разветвленных корневых волосков, активность апикальной меристемы главного корня, длина эпидермальных клеток в зоне корневых волосков, содержанию пролина, экспрессии генов, чувствительных к засухе. Исследование показало, что на умеренный водный дефицит растения реагируют возрастанием экспрессии АБК-чувствительных генов *RD29A* та *AtP5CS*, ключевого фермента синтеза пролина, а также повышением содержания самого пролина. Эти изменения вызывали угнетение прироста корня и снижение массы растений. Угнетение прироста корня происходило вследствие падения активности апикальной меристемы. Отмечено образование разветвленных корневых волосков, которые могут увеличивать поглощение воды на начальных этапах действия водного дефицита.

*Ключевые слова:* *Arabidopsis thaliana*, водный дефицит, рост корня, разветвленные корневые волоски, экспрессия генов

J. A. Bobrowniucky

Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REACTION OF SEEDLINGS OF *ARABIDOPSIS THALIANA* L. ON MODERATE WATER DEFICIT ON CELLULAR AND MOLECULAR LEVEL

In this paper we present our data on the reaction of seedlings of *Arabidopsis thaliana* L. on the moderate water deficit on cellular and molecular level. The seedlings were studied by the following criteria: fresh weight of plants, growth rate of the main root, the amount of branched root hairs, number of dividing cells in root meristem, the length of epidermal cells in the zone of root hairs, proline content, expression of drought sensitive genes. The study revealed that plants react on water deficit by increasing the expression of ABA-sensitive genes *RD29A* and *AtP5CS*, the key enzyme of proline biosynthesis, as well as by increasing the content of proline itself. These changes level caused the decrease of both the root growth rate and the fresh weight of the plants. The decrease of root growth rate was a consequence of the lower activity of root apical meristem. We noticed the production of branched root hairs under conditions of water deficit, which could increase water uptake at the initial stages of water deficit.

*Key words:* *Arabidopsis thaliana*, water deficit, root growth, branched root hairs, gene expression

Рекомендує до друку

Н.М. Дробик

Надійшла 19.04.2012