

ГЕНЕРАЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ИНДУКЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В КОРНЕ *ARABIDOPSIS THALIANA* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПОВЫШЕННЫХ УРОВНЕЙ Ni^{2+} В СРЕДЕ

К.С. Лицкевич, А.Л. Рекиш

Белорусский государственный университет, г. Минск;

v.mackievic@gmail.com;

науч. рук. - В.С. Мацкевич

В последнее время актуальной проблемой индустриально развитых регионов стало загрязнение никелем. Повышенные уровни металла в окружающей среде наносят ущерб естественной флоре, а также вредит сельскому хозяйству. Несмотря на это, клеточные механизмы токсического действия никеля, а также роль связывания никеля с органическими лигандами остаются не изученными. Целью данной работы являлось установить роль взаимодействия Ni^{2+} с гистидином в индукции сигнальных и адаптивных реакций в корне арабидопсиса под действием никелевого стресса. Также в данной работе была проанализирована реакция на никелевый стресс линий, лишенных НАДФН-оксидаз – ферментов, ответственных за продукцию основной массы экзогенных АФК в растениях.

Ключевые слова: никель; гистидин; активные формы кислорода; флуоресцентная микроскопия; дигидроэтидиум; корень; арабидопсис; НАДФН-оксидаза.

ВВЕДЕНИЕ

Никель является необходимым микроэлементом для растений, поскольку он является функциональным компонентом растительных ферментов, в первую очередь уреазы. Однако, как и любой тяжелый металл, в высоких концентрациях никель оказывает токсическое действие на растительный организм. Избыточные уровни никеля (свыше 100 мг/г) вызывают угнетение роста растений, хлороз и некроз листьев, повреждение клеточных мембран, деградацию клеточных органелл, нарушение функционирования фотосинтетического, изменение активности ферментов и т.д. [1]. Действие никеля также сопровождается стимуляцией синтеза активных форм кислорода (АФК) и индукцией окислительного стресса, однако механизм данной реакции до конца не понятен. Известно, что в свободная ионная форма никеля (Ni^{2+}) не является редокс-активной в биологических условиях [2], вероятно для активации редокс-свойств необходимо связывание металла с хелаторами, в частности с гистидином (Гис) [3]. Целью настоящей работы являлось установить роль взаимодействия Ni^{2+} с Гис в индукции сигнальных и адаптивных реакций в корне арабидопсиса под действием Ni -стресса.

Основным источником продукции экзогенного АФК в растениях является фермент НАДФН-оксидаза [4]. В ряде работ было показано, что опосредованная НАДФН-оксидазой продукция АФК играет важную роль в регуляции адаптивных реакций растений при воздействии таких стресс-факторов, как засоление, экстремальные температуры, засуха и др. [5, 6]. Поэтому актуальным представлялось также проанализировать реакцию растений-нокауты по данной системе в ответ на обработку Ni^{2+} и никель-гистидиновыми комплексами (Ni-Гис).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе была протестирована реакция корней модельных растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. природного экотипа Col-0 и нокаутных линии *rbohC*, *rbohD*, *rbohF*, лишенной НАДФН-оксидазы типа C, D и F, соответственно. Растения выращивались в стерильной вертикальной культуре в чашках Петри на полной среде Мурасиге и Скуга, pH 6,0, 1 % сахара, 0,35 % Phytagel в контролируемых условиях 22°C, 16 ч свет/ 8 ч темнота. Анализ роста корней проводились при помощи стандартных тестов на прорастание (germination test), а также техники замены среды: на каждый вариант обработки высаживалось по 3 чашки Петри, в каждой по 10-15 семян, замена среды проводилась на 5 сут, регистрация прироста основного корня – на 10 сут (5 сут после введения Ni^{2+} и Ni-гистидиновых комплексов). Уровень АФК в клетках корня 7-дневных растений арабидопсиса регистрировался с использованием флуоресцентного зонда ди-гидроэтидиум (ДГЭ). Растения помещались в стресс-расторы (3 ммоль/л Ni^{2+} ; 6 ммоль/л гистидин; 3 ммоль/л Ni^{2+} + 6 ммоль/л гистидин), содержащие 10^{-5} моль/л ДГЭ, на протяжении 30 мин, в качестве контроля выступал буферный раствор следующего состава (ммоль/л): 0,1 KCl, 0,1 CaCl_2 , 1 Tris/ 2 Mes pH 6,0. Флуоресценция ДГЭ регистрировалась при помощи микроскопа Nikon TS100 ($\lambda_{\text{ex}} = 490$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 540$ нм). Изображения анализировались в приложении ImageJ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании влияния Ni^{2+} и Ni-Гис на рост основного корня *A. thaliana* с использованием техники замены среды было показано, что введение никеля в низких концентрациях (0,01–1 ммоль/л Ni^{2+}) не оказывало эффекта на скорость роста корня дикого типа Col-0. Никель начал ингибировать удлинение корня, начиная с 3 ммоль/л, вызывая снижение скорости роста на 80-85%. Обработка 10 ммоль/л Ni^{2+} вызывала 90% ингибирование. Гис уменьшал токсичность высоких уровней Ni^{2+} (3 и 10

ммоль/л). Это говорит о том, что образование Ni-Гис комплексов позволяет растениям уменьшить вредное воздействие избыточных концентраций металла. Тесты на прорастание продемонстрировали схожие результаты, однако ингибирование роста наблюдалось уже при обработке 0,1 ммоль/л Ni^{2+} . Добавление Гис оказывало протекторное действие, при этом оптимальным соотношением аминокислоты к Ni^{2+} являлось 2:1 (рисунк).

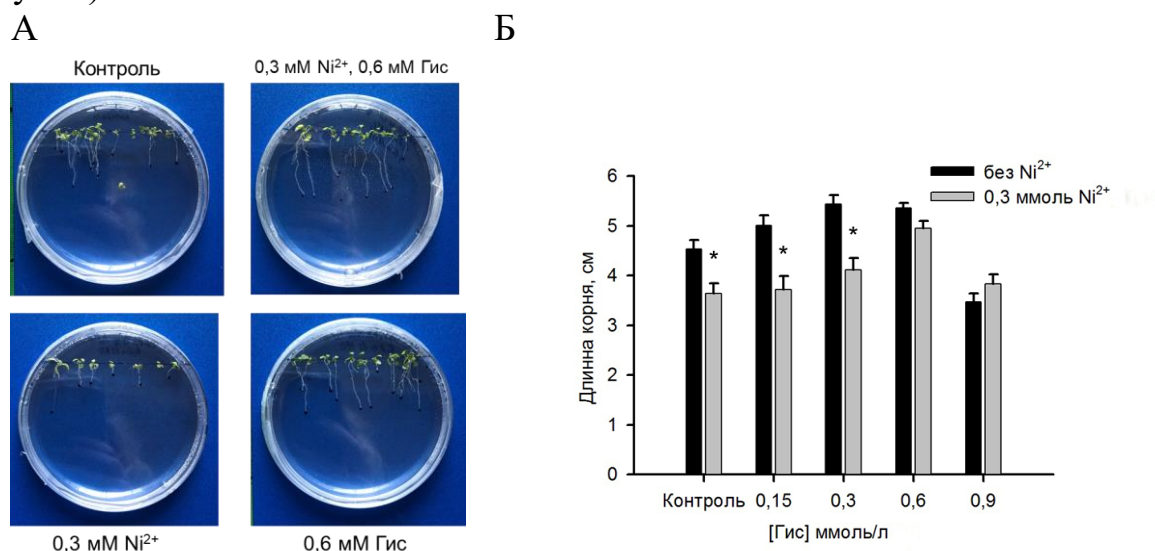


Рис. Изменения роста корней *Arabidopsis thaliana* при различных концентрациях никеля и никеля с гистидином: А – фотографии 7-дневных проростков; Б – прирост длины основного корня ($\bar{X} \pm \text{SE}$, $n=30$). Достоверность различий рассчитывалась по отношению к длине корня на безникелевой среде: * – $p \leq 0,05$

Нокаутные мутанты по НАДФН-оксидазам D и F продемонстрировали схожую реакцию с диким типом. Растения *rbohC*, лишённые НАДФН-оксидазы C, были менее чувствительны к никелю: в тестах с заменой среды ингибирование удлинения корня начиналось только с 10 ммоль/л Ni^{2+} . Следовательно, генерация АФК с вовлечением комплекса НАДФН-оксидазы C, является важным компонентом при развитии окислительного стресса на фоне повышенных уровней никеля. Следует отметить, что добавление Гис не оказывало влияние на изменение скорости роста корня при выращивании растений на среде с никелем. Вероятно, протекторная роль данной аминокислоты заключается не только в физическом устранении Ni^{2+} путем хелатирования, но и в индукции АФК-зависимой сигнализации, запускающей реакции адаптации.

Тесты с флуоресцентным зондом ДГЭ показали, что обработка 3 ммоль/л Ni^{2+} не стимулировала сильного накопления АФК в корнях арабидопсиса в зоне всасывания. Выдерживание в растворе 6 ммоль/л Гис также не оказывало существенного влияния на синтез АФК. Совместная обработка Ni-Гис индуцировала сильную выработку АФК, интенсивность

флуоресценции ДГЭ возрастала на 50 % в зоне всасывания и на 75 % в зоне деления по сравнению с контролем. Линия *rbohC* не демонстрировала накопления АФК при обработке Ni-Гис ни в зрелой зоне, ни в кончиках корня. Нокауты по *RbohD* также были менее чувствительны к обработке Ni-Гис: увеличение флуоресценции ДГЭ наблюдалось только в зоне кончика корня (на 40% по сравнению с контролем). Нокауты по *RbohF* демонстрировали чувствительность к обработке Ni-Гис в зоне всасывания (увеличение флуоресценции ДГЭ на 40%), в то время как, в кончиках корня флуоресценция ДГЭ была на уровне контроля.

Таким образом, было показано: 1) При введении Ni^{2+} -содержащих смесей в среду выращивания ингибируется прорастание и рост главного корня *A. thaliana*: у дикого типа начиная с концентрации 3 ммоль/л, у нокаутов *rbohD* и *rbohF* – с 1 ммоль/л, *rbohC* – с 10 ммоль/л; 2) Гис в соотношении 2 Гис / 1 Ni^{2+} снижает токсическое действие Ni^{2+} на рост корня; 3) Свободный Ni^{2+} не вызывает значительного изменения в уровне АФК в корне арабидопсиса, в то время как при совместном введении Ni^{2+} и Гис активируются редокс свойства Ni^{2+} и индуцируется синтез АФК; 4) Зона деления более чувствительна к данному воздействию, чем зона всасывания, что может свидетельствовать роли АФК в качестве ключевых регуляторов активности меристем. Изменение содержания АФК в кончике корня определяет направление и скорость роста корня, что имеет важное значение при воздействии стрессоров; 5) Индуцированная Ni-Гис генерация АФК в корнях линий арабидопсиса, лишенных НАДФН-оксидаз, была на меньшем уровне, чем в диком типе, что свидетельствует о вовлечении данных систем в ответе растений на никелевый стресс.

Библиографические ссылки

1. Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants / T.V.M. Sreekanth [et al.] // Int. J. Environ. Sci. Technol. – 2013. – Vol. 10. – P. 1129–1140.
2. Halliwell B. & Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge – Oxford, UK: OUP, 1999. – 936 p.
3. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel / U. Krämer [et al.] // Nature. – 1996. – Vol. 379, № 6566. – P. 635–638.
4. Kaur G., Pati P.K. In silico physicochemical characterization and topology analysis of Respiratory burst oxidase homolog (Rboh) proteins from Arabidopsis and rice / G. Kaur, P.K. Pati // Bioinformation. – 2018. – T. 14, № 03. – C. 93–100.
5. Comparative analysis of the reactive oxygen species-producing enzymatic activity of Arabidopsis NADPH oxidases / H. Kaya [et al.] // Plant J. – 2019. – Vol. 98, № 2. – P. 291–300.