АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ В ОТВЕТ НА ПОВЫШЕННЫЕ УРОВНИ ИОНОВ НИКЕЛЯ В СРЕДЕ

А. Л. Рекиш, А. В. Ныч

Белорусский государственный университет, г. Минск;
v.mackievic@gmail.com, nych@bsu.by;
науч. рук. – В. С. Мацкевич, ст. преп.

В индустриально развитых регионах уровни никеля (Ni^{2+}) в среде часто превышают допустимые значения и оказывают токсическое действие на окружающую флору. Механизмы ответной реакции растений на избыток Ni^{2+} в настоящее время не ясен. В данной работе было показано, что повышенные уровни Ni^{2+} ингибируют ростовые процессы и индуцируют гибель клеток корня высших растений. Добавление гистидина оказывает протекторное действие при никелевом стрессе, снижает ЗКГ, а также может индуцировать автофагию в кончиках корней на ранних стадиях токсического воздействия Ni^{2+}, что может быть связано с удалением поврежденных органов, перестройкой метаболизма и запуском адаптивных реакций.

Ключевые слова: автофагия; никель; гистидин; флуоресцентная микроскопия; корень; арабидопсис; ATG8a-mCherry.

ВВЕДЕНИЕ

В индустриально развитых регионах часто возникает проблема никелевого загрязнения. Для большинства видов растений концентрации Ni^{2+} свыше 10-50 мкМ вызывают токсические эффекты: тормозят рост, подавляют фотосинтез, прорастание семян, транспорт сахара и индуцируют хлороз, некроз и увядание [1]. Первичный и наиболее общий ответ растений на воздействие стресс-факторов среды – ингибирование ростовых процессов, происходящее вследствие переключения с использования энергетических ресурсов для накопления биомассы на активацию защитных механизмов. Одним из таких механизмов является запуск автофагических реакций. Автофагия играет двоякую роль: с одной стороны, она направлена на выживание клетки, с другой – служит частью процесса запрограммированной клеточной гибели (ЗКГ). Не смотря на то, что автофагия давольно хорошо изучена в животных организмах, в растениях механизм индукции автофагических реакций не до конца понятен [2]. Особенно актуальным представляется исследование данного процесса в клетках корня, так как именно они выступают основной мишенью большинства абиотических стресс-факторов. Цель данной работы: выявить влияние повышенных уровней никеля на жизнеспособность клеток корня высших растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе тестировалась реакция двух видов растений *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. и *Triticum aestivum* L. Культивирование пшеницы проводилось рулонным методом [3]. Анализ ростового ответа арабидопсиса проводился с использованием тестов в стерильной гелевой среде и гидропонике [4, 5]. Общую жизнеспособность клеток корня оценивали при помощи Evans Blue [3]: после обработки стресс-растворами проростки выдерживались 30 мин в 0,025% растворе ЕВ, затем 10 мин промывались в буфере (мМ): 0,1 KCl, 0,1 $CaCl_2$, 1 Tris/ 2 Mes pH 6,0; накопление флуоресценцию ЕВ регистрировали на микроскопе Nikon Eclipse TS100 (фильтр G-2A); изображения анализировались в приложении ImageJ. Индукцию автофагии в клетках корня арабидопсиса при никелевом стрессе регистрировали с использованием трансгенной линии *A. thaliana*, у которых экспрессируется меченый mCherry белок ATG8a; флуоресценцию mCherry определяли также на микроскопе Nikon Eclipse TS100 (фильтр G-2A) и анализировали в программе ImageJ.

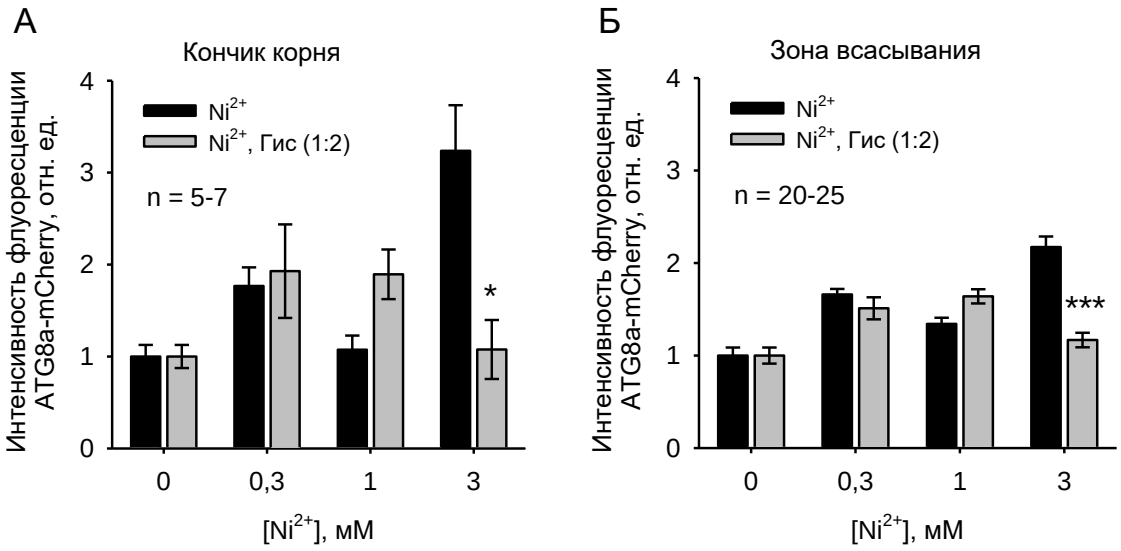
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ростовые тесты в гелевой среде показали, что никель (Ni^{2+}) в концентрации свыше 100 мМ ингибирует рост корней арабидопсиса. Добавление гистидина (Гис) оказывает протекторное действие при никелевой стрессе, при этом наиболее эффективным является соотношение 1 Ni^{2+}: 2 Гис. В гидропонной системе были получены схожие результаты, однако токсический эффект Ni^{2+} был более выражен. Так, например, в гелевых тестах на 5 сут культивирования на фоне 0,3 мМ Ni^{2+} скорость роста корней арабидопсиса снижалась на 25%, а в гидропонике – на 50%.

При выдерживании растений в растворах с 0,3-3 мМ Ni^{2+} в течение 15 ч наблюдалось резкое снижение общей жизнеспособности клеток корня арабидопсиса, о чем свидетельствовало накопление синего окрашивания и красной флуоресценции ЕВ. В кончиках корней, обработанных Ni^{2+}, интенсивность флуоресценции ЕВ возрастала в 2,2-2,5 раза по сравнению с контрольными образцами. В зрелой зоне корня Ni^{2+}-индуцированное увеличение флуоресценции составляло 50-70%.

Обработка арабидопсиса сублетальными и летальными концентрациями никеля в течение 3-15 ч индуцировала развитие автофагии в клетках корня арабидопсиса. Наибольший эффект регистрировался при 15 ч экспозиции растений в 3 мМ Ni^{2+}: флуоресценция ATG8a-mCherry в кочихак корня возрастала в 3,2 раза, в

зоне всасывания – в 2,3 раза (рисунок). При введении Гис Ni^{2+}-индуцированная автофагия снижалась во всех случаях, кроме 3 ч обработки 1 мМ Ni^{2+} и 2 мМ Гис. Образующиеся комплексы Ni-$Гис_{1(2)}$ благодаря своей редокс-активности стимулируют быстрое накопление АФК в кончиках корней и запуск автофагии. Вероятно, данный механизм используется растениями для распознавания повышенных уровней никеля в среде и удаления корней, растущих в направлении данного стрессора. Интересно отметить, что как в кончиках корней, так и в зрелой зоне при увеличении времени обработки никелем до 24 ч флуоресценция ATG8a-mCherry снижалась примерно до уровня контроля. В то время как введение комплексов Ni-$Гис_{1(2)}$ вызывало значительное увеличение флуоресценции ATG8a-mCherry. Можно предположить, что на данном этапе развития никелевого стресса включаются другие, более поздние, типы клеточной гибели, в частности апоптозоподобная ЗКГ.



Индукция автофагии в корнях арабидопсиса при 15 ч обработке растений растворами Ni^{2+} и Ni-$Гис_2$: А – Интенсивности флуоресценции ATG8a-mCherry в кончиках коня (X±SE, n=5-7); Б – Интенсивности флуоресценции ATG8a-mCherry в зоне всасывания (X±SE, n=20-25)Достоверность различий рассчитывалась по отношению к контролю при помощи ANOVA-теста: * – $p \leq 0,05$ и *** – $p \leq 0,001$

В опытах с сельскохозяйственными культурами нами было продемонстрировано, что низкие концентрации Ni^{2+} (до 0,01 мМ) стимулировали рост основного корня пшеницы, однако при увеличении концентрации металла свыше 0,03 мМ наблюдалось ингибирование ростовых процессов. Полунгибирующий эффект отмечался при 0,3 мМ Ni^{2+}, концентрация 10 мМ Ni^{2+} была летальной. В присутствие Гис токсический эффект Ni^{2+} снижался, ингибирование роста корней регистрировалось только, начиная с обработки 0,3 мМ Ni^{2+} и 0,6 мМ Гис.

Как и в случае с арабидопсисом, Гис также оказывал протекторное действие на жизнеспособность клеток корня при никелевом стрессе.

В результате нами было показано, что присутсвие Ni^{2+} в среде выращивания в концентрации свыше 0,03-0,1 мМ ингибирует рост растений, а также снижает жизнеспособность клеток корня. Гис оказывает протекторное действие при никелевом стрессе, причем наибольший эффект демонстрирует соотношение 1 Ni^{2+}: 2 Гис. При воздействии 0,3-3 мМ Ni^{2+} в первые 15 ч наблюдается запуск автофагических реакций, однако при увеличении времени экспозиции уровень автофагии падает, что, вероятно, обусловлено включением других типов клеточной гибели. Гис снижает Ni^{2+}-индуцированную автофагию при 15 ч воздействия, однако при 3 ч обработке слимулирует автофагические реакции в кончиках корней, что может быть связано с удалением поврежденных органов, перестройкой метаболизма и запуском адаптивных реакций.

Работа была выполнена в рамках темы НИР «Исследование функционального взаимодействия сигнально-регуляторных и антиоксидантных систем при стрессе с целью повышения общей стрессоустойчивости высших растений и создания новых биотехнологий» (№ госрегистрации 20211222), подпрограммы «Молекулярные и клеточные биотехнологии-2» государственной программы научных исследований «Биотехнологии-2» на 2021–2025 годы.

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. The role of ion disequilibrium in induction of root cell death and autophagy by environmental stresses / *V. Demidchik [et al.]* // Functional plant biology. – 2017. – Vol. 45, № 1. – P. 28-46.
3. Ингибирование ростовых процессов и индукция запрограммированной клеточной гибели в корне *Helianthus annuus* L. под действием ионов никеля и никель-гистидиновых комплексов / *В.С. Мацкевич и др*. // Экспериментальная биология и биотехнология – 2020. – Т. 1. – С. 11-19.
4. Effects of exogenously-applied L-ascorbic acid on root expansive growth and viability of the border-like cells / *X. Li [et al.]* // Plant Signaling & Behavior. – 2018. – P. 1–4.
5. *Kozhevnikova, A.D.* Translocation of Ni and Zn in *Odontarrhena corsica* and *Noccaea caerulescens*: the effects of exogenous histidine and Ni/Zn interactions / *A.D.Kozhevnikova, I.V. Seregin, H. Schat* // Plant and Soil. – 2021. – Vol. 468, № 1. – P. 295-318.