

ГЕНЕРАЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КОРНЯХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ ПРИ АБИОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

В. Д. Громыко, А. Е. Ярошня

Белорусский государственный университет, г. Минск;

v.mackievic@gmail.com;

науч. рук. – В.С. Мацкевич, ст. преп.

Засоление и повышенные уровни тяжелых металлов являются основными лимитирующими факторами для сельского хозяйства. Известно, что в ответ на данные воздействия в растениях развиваются симптомы окислительного стресса, тем не менее, механизм индукции синтеза АФК в корнях высших растений до конца не ясен. При помощи АФК-чувствительного флуоресцентного зонда H₂DCFDA была протестирована реакция ризодермальных клеток арабидопсиса на NaCl и NiCl₂, а также показано вовлечение системы Ca²⁺-сигнализации в запуск окислительного стресса при данных воздействиях.

Ключевые слова: АФК; NaCl; никель; Ca²⁺-сигнализация; корень; арабидопсис.

ВВЕДЕНИЕ

Активные формы кислорода (АФК) представляют собой важную систему, участвующую в нормальных физиологических процессах, а также в ответе растений на стрессовые воздействия [1, 2]. Повышенные уровни АФК в клетке могут приводить к повреждениям структурных элементов, перекисному окислению липидов, индукции разрывов ДНК, нарушению синтеза и гидролиза белков. Таким образом, вследствие дисбаланса АФК растений теряют способность существовать в стрессовых условиях.

Среди абиотических факторов среды наиболее опасным для жизни растений является засоление почв. Приблизительно 25% всех почв земли засолено [3]. Высокое содержание NaCl угнетает растения (и даже приводит к их гибели), снижает продуктивность сельскохозяйственных видов. Тяжелые металлы являются одной из основных причин снижения качества и количества урожая, а также повреждения дикой флоры на техногенно-загрязненных территориях [4]. Среди опасных металлов-загрязнителей принципиальное значение имеет никель, так как он широко используется в промышленности, в частности, при производстве нержавеющей стали, сплавов, электроники и аккумуляторных батарей [5]. Флора, растущая вблизи добывающих шахт и перерабатывающих заводов, претерпевает негативное воздействие никеля, проявляющееся в торможении ростовых процессов, хлорозе листьев, некрозе корней, симптомах окислительного стресса. Тем не менее, механизм токсичности никеля до конца не ясен. Целью настоящей работы было

установить эффект NaCl и NiCl₂ на генерацию АФК в корнях высших растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводились с использованием проростков *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Семена арабидопсиса стерилизовались 20% раствором гипохлорита натрия (15 мин), промывались стерильной водой и высаживались на питательную среду следующего состава: 100% среда Мурашиги и Скуга, 1% сахароза, 0,35% Phytigel (pH 6,0). После выдерживания 2 сут при 4°C, растения культивировались в ростовом кабинете при 22°C, 16 ч света и 8 ч темноты. Анализ накопления АФК производился в клетках корня 7-дневных проростков с помощью красителя H₂DCFDA. После стрессовой обработки растения *A. thaliana* инкубировались в 50 мкМ H₂DCFDA в течении 10 мин, далее 5 мин отмывались в буфере (мМ): 0,1 KCl, 0,1 CaCl₂, 1 Tris/ 2 Mes (pH 6,0). Флуоресценцию детектировали при помощи микроскопа Nikon Eclipse TS-100 с использованием FITC фильтра. Полученные изображения анализировали в программе ImageJ. Статистический анализ данных проводили при помощи ANOVA теста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе анализировался уровень накопления АФК при обработке растений различными концентрациями NaCl и NiCl₂. Было показано, что воздействие 40-200 мМ NaCl индуцировало синтез АФК в клетках корня арабидопсиса, при этом накопление флуоресценции H₂DCFDA коррелировало с возрастанием концентрации соли. При низких концентрациях NiCl₂ (10-300 мкМ) уровень АФК в клетках корня был схож с контролем. С возрастанием концентрации металла наблюдалось увеличение накопления АФК. Наибольший эффект имела обработка 3 мМ NiCl₂, вызывающая увеличение флуоресценции H₂DCFDA в зрелой зоне на 90%, а в кончиках корня – на 50%.

Далее был проведен анализ кинетики данной реакции (рис. 1). При тестировании 3 мМ NiCl₂ наиболее высокий уровень генерации АФК в корнях *A. thaliana* был замечен при 75 мин. В зрелых клетках эпидермиса корней свечение H₂DCFDA увеличивалось на 90% по сравнению с обработкой буфером. При симуляции засоления, максимальное свечение H₂DCFDA в зоне всасывания вызывала обработка 200 мМ NaCl на протяжении 60 мин, после чего интенсивность флуоресценции снижалась. В кончиках корней

достоверное увеличение интенсивности флуоресценции H₂DCFDA было отмечено на 45 мин, после чего флуоресценция вышла на плато.

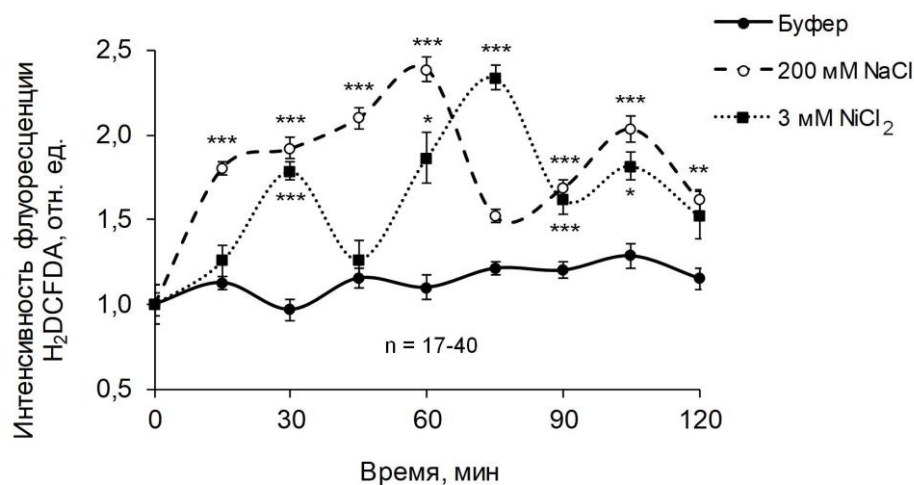


Рис. 1. Изменение флуоресценции H₂DCFDA в зоне всасывания корней арабидопсиса при обработке проростков NaCl и NiCl₂ ($\bar{X} \pm Sx$; $n=17-40$). Достоверность различий рассчитывалась по отношению к контролю: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

Для установления роли Ca²⁺-сигналикации в индукцию синтеза АФК при засолении и тяжелометаллическом стрессе использовался блокатор Ca²⁺-проницаемых катионных каналов Gd³⁺ (рис. 2). Было показано, что в зрелой зоне интенсивность флуоресценции H₂DCFDA увеличивалась в 1,5 и 2,3 раза при обработке 100 и 200 мМ NaCl, соответственно. Добавление 0,1 мМ GdCl₃ снижало NaCl-индуцированное накопление АФК в зрелой зоне, однако не оказывало протекторного эффекта в кончике корня. При этом никель-индуцированная флуоресценция H₂DCFDA снижалась на фоне 0,1 мМ GdCl₃ как в зрелой зоне, так и в кончиках корня. Следует также отметить, что снижение синтеза АФК при никелевом стрессе наблюдалось при добавлении гистидина.

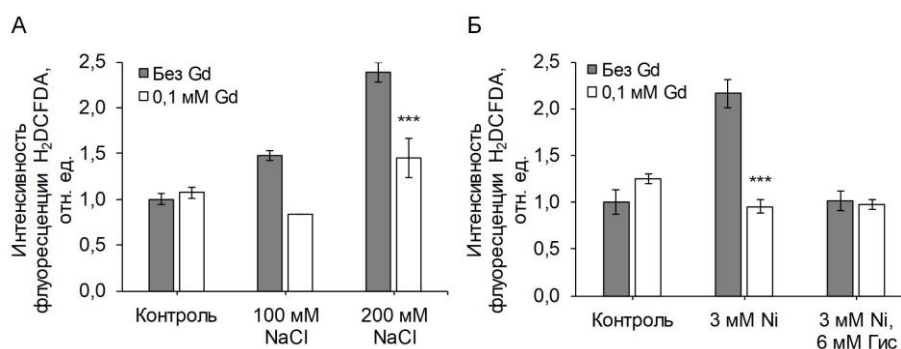


Рис. 2. Эффект добавления Gd³⁺ на накопление АФК в клетках корней арабидопсиса в ответ на засоление и никелевый стресс ($\bar{X} \pm Sx$; $n=10-20$). Достоверность различий рассчитывалась по отношению к обработке растворами без Gd³⁺: *** – $p < 0,001$

Таким образом, нами было показано: 1) Обработка проростков арабидопсиса растворами NaCl, концентрацией свыше 100 мМ, вызывает увеличение флуоресценции H₂DCFDA, что свидетельствует о накоплении АФК; 2) Максимальная интенсивность флуоресценции H₂DCFDA при солевом стрессе регистрировалась на 60 мин инкубации растений в 200 мМ NaCl; 3) При низких концентрациях никеля (10-300 мкМ) уровень АФК в клетках корня *A. thaliana* был на уровне контроля, с возрастанием уровня NiCl₂ до миллимолярных концентраций наблюдалось увеличение накопления АФК; 4) Наибольший эффект имела 75-минутная обработка 3 мМ NiCl₂, вызывающая увеличение флуоресценции H₂DCFDA в зрелой зоне на 90%; 5) Добавление блокатора Ca²⁺-проницаемых катионных каналов (GdCl₃) снижает NaCl- и NiCl₂-индуцированное накопления АФК, что говорит о вовлечении системы Ca²⁺-сигнализации в запуск окислительного стресса при действии абиотических стресс-факторов.

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. Васильевна, П.Е. Активные формы кислорода в физиологии и патологии клетки / П.Е. Васильевна, Н.В. Егорович, Л.О. Сергеевна // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 13-22.
2. Колупаев, Ю.Е. Активные формы кислорода и стрессовый сигналинг у растений / Ю.Е. Колупаев, Ю.В. Карпец // Украинский биохимический журнал. – 2014. – Т. 86. – С. 1-18.
3. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review / P. Parihar [et al.] // Environ Sci Pollut Res. – 2015. – Vol. 22, № 6. – P. 4056-4075.
4. Aftab, T. Plant micronutrients: deficiency and toxicity management / T. Aftab, K.R. Ha-keem // Springer Nature Switzerland AG. – 2020. – P. 104-108.
5. Серегин, И.В., Кожевникова, А.Д. Физиологическая роль никеля и его токсическое действие на высшие растения / И.В. Серегин, А.Д. Кожевникова // Физиология растений. – 2006. – Т. 53. – С. 285-308.