

УДК 581.1:577.121.7

АФК И ПРОТОН-ОПОСРЕДОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА РОСТ И УЛЬТРАСТРУКТУРУ КЛЕТОК КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ

С.А. Дмитриева, А.А. Пономарева, Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон

Аннотация

Изучена энергозависимость ответных реакций клеток корней пшеницы *Triticum aestivum* L. при действии салициловой кислоты (СК). Воздействие СК на корни привело к ингибированию роста корней, снижению митотической активности и преждевременной гибели клеток. Лизис клеток сопровождался появлением в клетках большого количества аутолитических вакуолей, содержащих фрагменты цитоплазмы и органеллы. Обсуждаются два возможных механизма снижения энергообеспечения, приводящего к СК-индуцированной гибели клеток.

Ключевые слова: корни пшеницы, салициловая кислота, активные формы кислорода, энергетический метаболизм, рост, ультраструктура.

Введение

В настоящее время салициловая кислота (СК) рассматривается в качестве гормона и регулятора роста растений, а также одной из сигнальных молекул, которая участвует в функционировании липоксигеназной и МАР-киназной сигнальных систем, а также способна активировать и влиять на уровень активных форм кислорода (АФК) в клетках и регулировать АФК- и NO-опосредованные сигнальные системы [1]. Эндогенная концентрация СК в клетке невысока и различается в зависимости от органа и видовой принадлежности растений [2]. Ее роль показана в реакциях сверхчувствительности клетки, индукции локального иммунитета и способности индуцировать системную приобретенную устойчивость (СПУ) растений к разнообразным по природе возбудителям болезней [3]. При атаке патогенов в растениях происходит усиленное образование СК, концентрация ее может повышаться в 10–100 раз [4]. При этом СК может выбрасываться в апопласт и циркулировать по растению. Экзогенная СК также изменяет метаболизм клеток и вызывает накопление мРНК патоген-индуцированных белков, которые участвуют в формировании СПУ [3].

В литературе описано разнообразное влияние СК на деление клеток, рост и развитие растений. Так, существуют данные об ингибировании роста проростков редиса и пролиферации клеток культуры табака [5, 6] при действии СК. В суспензионной культуре клеток табака в зависимости от концентрации СК наблюдалась задержка в прохождении фаз клеточного цикла [7]. СК блокировала клеточный цикл на стадии G0/G1 или G2, вплоть до полного подавления клеточного цикла, однако эффект СК был обратим, и при дальнейшем пересаживании

вании культуры клеток на среду без СК не было обнаружено аномалий в прохождении клеточного цикла [7]. Наряду с ингибирующим описаны и стимулирующие ее эффекты на рост и развитие растений. Так, показано, что СК активирует деление клеток и стимулирует рост, что, в свою очередь, оказывает существенный эффект на продуктивность пшеницы, а именно способствует увеличению высоты колоса и всего растения, количества и массы семян [8]. Известно, что эффекты СК на физиологические функции организмов обусловлены как АФК-опосредованными механизмами, так и протонфорными свойствами этой сигнальной молекулы. Экзогенная СК переносит протоны в клетку, что может привести к закислению цитоплазмы и смещению ионных градиентов. Таким образом, исходя из свойств СК, можно полагать, что обработка растений этой кислотой может индуцировать значительные изменения в энергетике клетки. От уровня энергетического обеспечения зависит как адаптация и рост клеток, так и срыв адаптации и клеточная смерть в изменившихся условиях окружающей среды. Целью нашей работы является исследование изменений в энергетическом метаболизме, росте и ультраструктуре клеток корней пшеницы при действии СК.

Материалы и методы исследования

Объект исследования. В качестве объекта исследования были использованы проростки яровой пшеницы сорта Люба (*Triticum aestivum* L.). Проростки выращивали на растворе 0.25 мМ CaCl₂ в течение 5 сут при +22 °С. Корни инкубировали в соответствующем инкубационном растворе (рН 7.0) при +30 °С.

Определение содержания перекиси водорода и супероксида. Содержание H₂O₂ определяли спектрофотометрически в растворе инкубации и растворимой фракции гомогената с использованием ксиленола оранжевого в присутствии Fe²⁺ (λ = 560 нм). Концентрацию H₂O₂ рассчитывали по калибровочной кривой. Специфичность подтверждали добавлением каталазы (500 ед. мг⁻¹). Количество супероксида определяли по методике, описанной ранее [9].

Определение малонового диальдегида (МДА). Содержание МДА определяли спектрофотометрически в растворимой фракции гомогената с использованием тиобарбитуровой кислоты (ТБК) (λ = 560 нм).

Определение интенсивности дыхания. Дыхательную активность отсеченных корней определяли по поглощению кислорода, измеряемому манометрическим методом Варбурга. Навеску корней помещали в сосудики Варбурга и инкубировали с умеренным встряхиванием при +30 °С. Интенсивность дыхания измеряли каждый час в течение 6 ч.

Определение проницаемости плазмалеммы корневых клеток для ионов калия. О проницаемости плазмалеммы корневых клеток для ионов калия судили по содержанию его в инкубационном растворе после инкубации отсеченных корней пшеницы. Измерения проводили на пламенном фотометре Phlapho-41 (Carl Zeiss, Jena, Германия).

Определение изменения рН инкубационного раствора. Измерение рН среды проводилось на рН-метре Mettler Toledo (США) после извлечения корней из среды инкубации.

Определение митотического индекса (МИ). Фиксированный материал (фиксатор Кларка) окрашивали при нагревании в ацетоорсеине. Из материала (1–2 мм от кончика корня) получали давленные препараты, которые анализировали в световом микроскопе (Carl Zeiss, Jena, Германия) с увеличением 600. Для каждого варианта опыта было проанализировано 5 тыс. клеток.

Определение жизнеспособности. Жизнеспособность клеток определяли с помощью 0.02%-ного раствора Эванса синего (Sigma, США) в HEPES-буфере (рН 7.0). Долю мертвых клеток оценивали по количеству окрашенных клеток с использованием светового микроскопа.

Определение митохондриального мембранного потенциала. Мембранный потенциал митохондрий оценивали с помощью специфического флуоресцентного красителя тетраметилродомин метил эстера (λ_{ab} 543 нм / λ_{em} 573 нм) на конфокальном микроскопе LSM-510 META (Carl Zeiss, Jena, Германия).

Электронно-микроскопические исследования. Для анализа ультраструктуры были использованы 1–2 мм кусочки ткани корня из зоны растяжения. Электронные микрографии были получены для клеток центрального цилиндра корня по методике, описанной ранее [10].

Все опыты проводили в 3–5 биологических и 3 аналитических повторностях. Представлены средние значения и стандартные отклонения. Статистическая обработка результатов производилась с использованием *t*-критерия Стьюдента. Звездочкой отмечены статистически значимые от контроля отличия ($p < 0.05$).

Результаты и обсуждение

Обработка растений пшеницы СК вызвала подавление роста корней и митотической активности корневых клеток. Так, уменьшение длины корней проростков, семена которых были замочены в течение 12 ч в растворах 0.01–1 мМ СК, наблюдалось в течение 5 сут при дальнейшем выращивании на контрольной среде (табл. 1). В этих экспериментах нами не было обнаружено значительного антимитогенного и мутагенного действия СК на клетки после 5 сут выращивания корней пшеницы. Митотическая активность клеток корней 5-суточных проростков всех исследованных вариантов достоверно не различалась (табл. 1). Однако в клетках корней более молодых (3-суточных) проростков, семена которых были замочены в растворах СК, МИ был достоверно ниже контрольного. Постоянное выращивание проростков на растворах СК привело к достоверному снижению митотической активности и роста корней проростков в течение 5 сут выращивания (табл. 2). Кроме того, 6-часовая инкубация в СК корней 5-дневных проростков, выращенных в контрольных условиях, привела к достоверному снижению МИ в зависимости от концентрации СК (табл. 3). Нами не проводилось изучение влияния СК на процессы растяжения корневых клеток, однако отсутствие эффекта СК на этапе прорастания семян, когда растяжение клеток вносит преобладающий вклад в рост корня, может свидетельствовать об отсутствии ингибирующего эффекта СК на процессы растяжения клеток. Мы полагаем, что в наших экспериментах ингибирование роста корней обусловлено именно подавлением деления клеток под действием СК.

Табл. 1

Влияние СК при замачивании семян на длину корней, МИ и частоту возникновения хромосомных aberrаций в клетках корневой меристемы при дальнейшем выращивании на контрольной среде в течение 5 сут

Вариант	Время, сут	Длина, мм	МИ, % ±	A, %
Контроль	3	21 ± 4	5.71 ± 1.08	6.76
СК (0.001 мМ)		25 ± 3	5.88 ± 0.94	7.51
СК (0.01 мМ)		18 ± 2	5.53 ± 0.94	8.99
СК (0.1 мМ)		17 ± 3*	5.90 ± 1.00	5.13
СК (1 мМ)		16 ± 2*	3.50 ± 0.65*	13.04
Контроль	5	66 ± 11	5.17 ± 0.93	3.41
СК (0.001 мМ)		59 ± 12	5.51 ± 0.87	4.49
СК (0.01 мМ)		57 ± 9*	5.64 ± 0.84	6.41
СК (0.1 мМ)		48 ± 9*	5.22 ± 0.83	5.19
СК (1 мМ)		44 ± 6*	4.9 ± 0.91	6.14

Табл. 2

Влияние СК на длину корней, МИ и частоту возникновения хромосомных aberrаций в клетках корневой меристемы при выращивании в течение 5 сут

Вариант	Время, сут	Длина, мм	МИ, % ±	A, %
Контроль	3	21 ± 4	5.66 ± 1.45	4.44
СК (0.001 мМ)		18 ± 5	4.21 ± 0.77*	5.13
СК (0.01 мМ)		14 ± 4*	4.89 ± 0.46*	4.97
СК (0.1 мМ)		15 ± 2*	4.12 ± 1.59*	5.08
СК (1 мМ)		9 ± 3*	2.78 ± 0.32*	4.93
Контроль	5	66 ± 9	5.56 ± 1.13	4.65
СК (0.001 мМ)		51 ± 7*	4.97 ± 0.95	4.21
СК (0.01 мМ)		46 ± 9*	4.43 ± 0.76*	5.09
СК (0.1 мМ)		47 ± 8*	4.67 ± 0.61*	5.13
СК (1 мМ)		27 ± 4*	2.05 ± 0.43*	4.97

Табл. 3

Изменение митотической активности в клетках корневой меристемы при инкубации корней в растворах СК

Вариант	2 ч	4 ч	6 ч
Контроль	4.95 ± 0.69	3.94 ± 0.59	4.35 ± 0.57
СК (0.001 мМ)	4.72 ± 0.81	3.66 ± 0.55	3.16 ± 0.47*
СК (0.01 мМ)	4.16 ± 0.79	3.51 ± 0.57	2.64 ± 0.32*
СК (0.1 мМ)	4.19 ± 0.84	3.21 ± 0.43*	2.86 ± 0.31*
СК (1 мМ)	2.93 ± 0.59*	2.41 ± 0.36*	1.82 ± 0.24*

Длительная (6 ч) инкубация корней с 1 мМ СК приводила к увеличению содержания H₂O₂ и МДА, продукта перекисного окисления липидов (табл. 4). Особенно значительные изменения наблюдались в содержании внутриклеточной H₂O₂, которое прогрессивно возрастало в течение 6 ч инкубации (табл. 4). Интенсификация в клетках процессов свободно-радикального окисления под влиянием СК подтвердилась и данными по повышению уровня МДА в клетках.

Табл. 4

Изменения уровня МДА и содержания H_2O_2 при действии 1 мМ СК

Варианты	Параметры	2 ч	4 ч	6 ч
Контроль	$H_2O_2^a$, мкМ	7.1 ± 1.0	8.9 ± 1.6	9.5 ± 0.3
	$H_2O_2^b$, мкМ	2.9 ± 0.2	3.8 ± 0.1	1.9 ± 0.7
	МДА, %	112 ± 19	94 ± 15	99 ± 17
СК (0.01 мМ)	$H_2O_2^a$, мкМ	9.3 ± 0.9	$13.4 \pm 0.7^*$	$16.1 \pm 1.0^*$
	$H_2O_2^b$, мкМ	1.7 ± 0.2	2.5 ± 0.3	2.1 ± 0.6
	МДА, %	102 ± 16	117 ± 10	$129 \pm 14^*$
СК (0.1 мМ)	$H_2O_2^a$, мкМ	10.1 ± 0.4	$14.0 \pm 0.9^*$	$15.8 \pm 0.8^*$
	$H_2O_2^b$, мкМ	1.4 ± 0.2	$2.7 \pm 0.3^*$	$4.6 \pm 0.1^*$
	МДА, %	111 ± 8	121 ± 19	144 ± 17
СК (1 мМ)	$H_2O_2^a$, мкМ	9.1 ± 0.8	$14.8 \pm 0.6^*$	$27.1 \pm 1.0^*$
	$H_2O_2^b$, мкМ	3.1 ± 0.2	$4.9 \pm 0.2^*$	$3.3 \pm 0.2^*$
	МДА, %	$124 \pm 9^*$	$140 \pm 12^*$	$153 \pm 8^*$

Примечание: $H_2O_2^a$ – внутриклеточная H_2O_2 , $H_2O_2^b$ – экстраклеточная H_2O_2 .

Табл. 5

Влияние СК на содержание супероксида в среде инкубации

Вариант	Адренохром, мкМ
Контроль	11.1 ± 2.0
СК (1 мМ)	$45.6 \pm 1.4^*$

После 4 ч наблюдалось достоверное увеличение МДА (табл. 4). Можно полагать, что одной из причин СК-индуцированной активации редокс-процессов в клетках является свойство СК ингибировать активность мощного антиоксидантного фермента каталазы и тем самым способствовать накоплению АФК [11]. Кроме того, СК может напрямую влиять на активность ферментов и усиливать экспрессию генов патоген-индуцированных белков, в том числе вовлеченных в продукцию АФК [12]. Так, на суспензионных клетках табака показано, что взаимодействие СК с пероксидазами может способствовать продуцированию ими супероксидного анион-радикала через образование салицилатного радикала [13]. Ранее в нашей лаборатории были получены данные о стимулирующей действии СК на супероксид-синтазную и пероксидазную активности в апопласте корней пшеницы [9]. В наших экспериментах воздействие 1 мМ СК на отсеченные корни пшеницы в течение 2 ч приводило к значительному усилению генерации супероксидного радикала (табл. 5). Можно полагать, что обнаруженное в наших экспериментах СК-индуцированное ингибирование роста и деления клеток может быть обусловлено развитием в них окислительного стресса. Как известно, СК является естественным прооксидантом и способствует усилению образования АФК [14]. АФК являются сигнальными молекулами, опосредующими гормональную, в том числе, салицилат-индуцированную, сигнализацию, рост и пролиферацию. Накопление же АФК выше физиологических значений приводит к окислительному стрессу, негативно действующему на прохождение клеточного цикла и угнетающего многие биохимические процессы в клетках [15]. В то же время механизмы, связанные с повреждающим действием АФК, эволюционно закреплены и используются клеткой для осуществления программ клеточного старения и гибели [15].

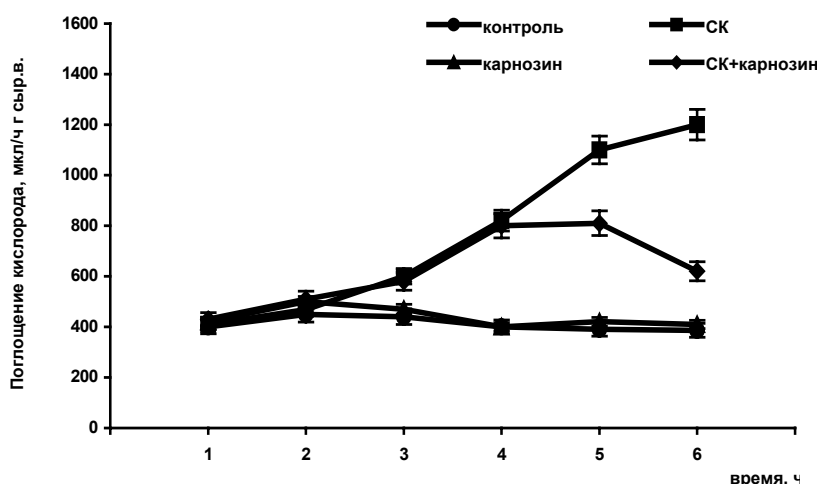


Рис. 1. Поглощение кислорода клетками отсеченных корней пшеницы при действии СК и карнозина в течение 6 ч инкубации

Табл. 6

Влияние СК, 2,4-ДНФ, СССР на pH раствора инкубации

Вариант	2 ч	4 ч	6 ч
Контроль	6.1 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.1 ± 0.1
СК (1 мМ)	6.9 ± 0.1*	6.9 ± 0.2*	6.7 ± 0.1*
2,4-ДНФ (0.1 мМ)	6.4 ± 0.2*	6.7 ± 0.2*	6.8 ± 0.3*
СССР (50 мкМ)	6.6 ± 0.3*	6.7 ± 0.1*	6.9 ± 0.1*

Разнообразие эффектов СК на физиологические функции организмов обусловлено не только АФК-опосредованными механизмами. Известно, что экзогенная СК переносит протоны в клетку, что приводит к закислению цитоплазмы и изменениям в энергетическом метаболизме [16]. Показано, что под действием СК происходит активация гликолиза и цикла Кребса [4]. В работах В.П. Скулачева СК рассматривается как типичный разобщитель окисления и фосфорилирования в митохондриях клеток млекопитающих [17]. Однако многие аспекты действия СК на энергетический обмен растительных клеток до сих пор остаются не выясненными.

В наших экспериментах 1 мМ СК вызвала значительное усиление потребления кислорода с максимумом к 4–5-му часу воздействия (рис. 1). Изучение влияния СК на транспорт H^+ и K^+ через плазматическую мембрану корней показало, что среда инкубации отсеченных корней подщелачивалась в среднем на 0.5–0.7 ед. pH (табл. 6), и наблюдался значительный выход K^+ из клеток (табл. 7). Если в контрольном варианте через 6 ч инкубации корней весь вышедший из клеток K^+ поглощался обратно, то в присутствии СК обратное поглощение ионов было снижено. Подщелачивание среды инкубации косвенно свидетельствует об усилении поступления в клетки H^+ , которые переносятся СК. Одним из следствий поступления внутрь клеток H^+ может быть деполяризация плазмалеммы и последующий выход из клеток K^+ . Ранее было показано, что эффекты СК на дыхательную активность и теплопродукцию корней во многом определяются ее протонофорными свойствами [16].

Табл. 7

Влияние СК, 2,4-ДНФ, СССР, карнозина и Tris-HCl буфера на выход K^+

Вариант	2 ч	4 ч	6 ч
Контроль	2.84 ± 0.35	1.03 ± 0.03	0.93 ± 0.02
СК (1 мМ)	6.2 ± 0.86*	8.56 ± 0.69*	2.36 ± 0.56*
Карнозин (20 мМ)	1.3 ± 0.21	1.26 ± 0.14	1.23 ± 0.35
СК + Карнозин	2.16 ± 0.31	1.98 ± 0.46	1.16 ± 0.29
СК + Tris-HCl буфер (10 мМ)	2.66 ± 0.49	1.64 ± 0.28	1.02 ± 0.21
Контроль	2.36 ± 0.32	1.03 ± 0.36	0.66 ± 0.13
2,4-ДНФ (0.1 мМ)	7.95 ± 0.56*	5.63 ± 0.68*	4.62 ± 0.49*
2,4-ДНФ + Карнозин	2.69 ± 0.21*	2.06 ± 0.36*	1.05 ± 0.34
2,4-ДНФ + Tris-HCl буфер	2.91 ± 0.11*	1.84 ± 0.27	1.06 ± 0.31
Контроль	1.56 ± 0.26	0.79 ± 0.39	0.36 ± 0.04
СССР (50 мкМ)	16.54 ± 1.03*	25.36 ± 2.56*	26.31 ± 1.23*
СССР + Карнозин	2.35 ± 0.95	15.23 ± 1.33*	12.99 ± 1.59*
СССР + Tris-HCl буфер	2.66 ± 0.53	12.39 ± 2.56*	11.27 ± 2.06*

Табл. 8

Изменение митотической активности в клетках корневой меристемы при инкубации корней в растворах СК, 2,4-ДНФ, СССР, карнозина и Tris-HCl буфера

Вариант	2 ч	4 ч	6 ч
Контроль	4.55 ± 0.35	4.25 ± 0.03	4.11 ± 0.02
СК (1 мМ)	3.72 ± 0.86	1.45 ± 0.69*	1.75 ± 0.56*
Карнозин (20 мМ)	4.38 ± 0.21	3.72 ± 0.14	3.94 ± 0.35
СК + Карнозин	4.37 ± 0.31	3.78 ± 0.46	3.91 ± 0.29
СК + Tris-HCl буфер (10 мМ)	4.63 ± 0.49	3.61 ± 0.28	3.39 ± 0.21
Контроль	4.36 ± 0.32	3.92 ± 0.36	4.17 ± 0.13
2,4-ДНФ (0.1 мМ)	3.77 ± 0.56	1.91 ± 0.68*	0.61 ± 0.49*
2,4-ДНФ + Карнозин	4.77 ± 0.21	3.67 ± 0.36	3.45 ± 0.34
2,4-ДНФ + Tris-HCl буфер	4.49 ± 0.11	3.84 ± 0.27	3.38 ± 0.31
Контроль	4.58 ± 0.26	4.18 ± 0.39	3.88 ± 0.04
СССР (50 мкМ)	3.49 ± 1.03*	0.98 ± 2.56*	0.69 ± 1.23*
СССР + Карнозин	3.54 ± 0.95*	3.73 ± 1.33	3.21 ± 1.59*
СССР + Tris-HCl -буфер	4.11 ± 0.53	3.92 ± 2.56	3.67 ± 2.06

Для подтверждения предположения о протон-опосредованных механизмах действия СК нами были проведены эксперименты с использованием типичных протонифоров и соединений, обладающих протонной буферной способностью. Воздействие на корни протонифоров 2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ) и карбонилцианид 3-хлоргидразон (СССР), также как и СК, привело к увеличению проницаемости плазмалеммы для K^+ и H^+ , о чем свидетельствует подщелачивание раствора инкубации (табл. 6, 7). Эти эффекты сопровождалось снижением митотической активности клеток (табл. 8). Анализируя изменения в МИ, проницаемости плазмалеммы для K^+ и H^+ , можно заключить, что эффекты протонифоров и СК имеют однонаправленное действие на эти процессы и возрастают в ряду СК < 2,4-ДНФ < СССР.

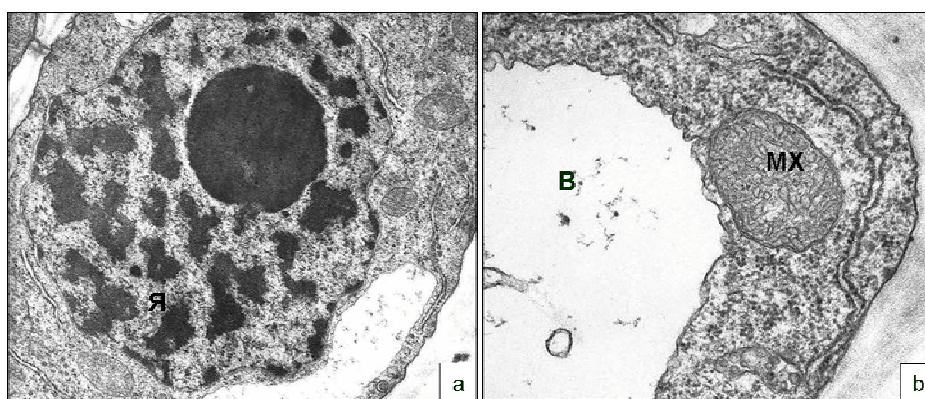


Рис. 2. Ультраструктура клеток корней пшеницы контрольного варианта: *a* – ядро в клетках исходных корней; *b* – ортодоксальная митохондрия после 6 ч инкубации

Предотвращение сдвигов протонного градиента при инкубировании корней с добавлением соединений, обладающих протонной буферной способностью (20 мМ карнозина или 10 мМ Tris-HCl буфера) приводило к нивелированию ингибирующего эффекта СК, СССР и 2,4-ДНФ на МИ (табл. 8). Кроме того, и карнозин, и Tris-HCl буфер (рН 7.0) препятствовали выходу K^+ из клеток (табл. 7). Отмечено также снижение стимуляции поглощения кислорода при совместном действии СК и карнозина (рис. 1).

Воздействие карнозина (табл. 8) не привело к значительным изменениям митотической и дыхательной активности (рис. 1) клеток корней пшеницы. Действие Tris-HCl буфера не выявило достоверных от контроля различий в исследуемых параметрах (табл. 7, 8). То, что действие буферных соединений приводило к снятию эффектов как протонофоров, так и СК, позволяет нам предположить, что эффекты СК на дыхательную и митотическую активность во многом обусловлены ее протонофорными свойствами. Как известно, увеличение в клетке содержания протонов (подкисление цитоплазмы) является одной из причин ингибирования синтеза ДНК и пролиферации клеток [16]. Таким образом, можно полагать, что ингибирование деления клеток при действии СК обусловлено, помимо усиленной генерации АФК, сдвигами протонного градиента. Значительное СК-индуцированное усиление потребления кислорода (рис. 1) может быть связано, во-первых, с описанным в литературе разобщающим эффектом СК, во-вторых, с активацией работы митохондриального аппарата для компенсации энергетических затрат, направленных на поддержание ионных градиентов на плазмалемме, и в-третьих, с процессами свободного окисления, происходящими при разрушении внутриклеточных структур. Для выяснения этого вопроса нами были проведены ультраструктурные и гистохимические исследования.

В нормальных физиологических условиях (контроль) клетки имели округлое ядро, характеризующееся диффузным хроматином, светлой кариоплазмой и крупным ядрышком (рис. 2, *a*). В цитоплазме содержалось много ортодоксальных митохондрий (округлой или овальной формы с рыхло упакованными кристами). Шероховатый эндоплазматический ретикулум представлен каналами, содержащими на мембранах значительное количество рибосом. В процессе

6 ч инкубации отсеченных корней в контрольной среде клетки не претерпевали каких-либо существенных конформационных перестроек (рис. 2, *b*).

Через 2–3 ч воздействия 1 мМ СК часть митохондрий приобретала тороидальный (кольцевой) вид (рис. 3, *c, d*). Предполагается, что митохондрии кольцевой формы имеют большую поверхность соприкосновения с цитоплазмой, чем ортодоксальные, что обеспечивает более высокий уровень энергообмена между данными компартментами клетки [18]. Такое изменение формы митохондрий описано для клеток при различных стрессовых условиях [18]. В клетках наблюдались также контакты митохондрий с липидными каплями (рис. 3, *e*). После 4 ч количество тороидальных митохондрий значительно уменьшалось, и большинство митохондрий имело ортодоксальный вид с небольшим просветлением матрикса (рис. 3, *f–h*). Считается, что при разобщении митохондрии характеризуются увеличением своего размера, редукцией крист и значительным просветлением матрикса [10]. При окраске клеток специфическим флуоресцентным красителем тетраметилпродаминол нами не было выявлено изменения мембранного потенциала митохондрий при 6 ч инкубации с СК (рис. 4). Таким образом, ни изменения структуры митохондрий, ни изменения в мембранном потенциале не подтвердили предположения о том, что увеличенное потребление кислорода обусловлено разобщающим эффектом СК. Наблюдаемая нами стимуляция потребления кислорода при действии СК может быть вызвана активацией работы митохондриального аппарата из-за недостаточности энергоресурсов и с целью синтеза дополнительных молекул АТФ для поддержания работы АТФ-азных систем плазмалеммы, направленной на удаление из клеток избытка протонов, перенесенных СК. Однако сравнение ультраструктуры активно работающих митохондрий в клетках контрольного варианта, характеризующихся плотным матриксом и четко очерченными кристами [10], со структурой митохондрий при действии СК, характеризующихся ортодоксальной формой и слегка просветленным матриксом, опровергло предположение об активации работы митохондрий. Таким образом, сопоставление структуры митохондрий с фактами усиления потребления кислорода и накопления АФК и МДА свидетельствует о том, что при обработке 1 мМ СК в корнях происходят интенсивные процессы свободного окисления, приводящие в результате к острому энергетическому дефициту. Подавление синтеза АТФ при действии СК показано также для клеток табака [19]. Контакты митохондрий с липидными каплями указывают на возможное использование липидов в качестве альтернативного энергетического субстрата и подтверждают факт салицилатиндуцированного энергетического кризиса в клетках (рис. 3, *e*).

Инкубация корней в 1 мМ СК сопровождалась изменениями почти во всех органеллах клеток. Помимо изменений структуры митохондрий, происходила конденсация хроматина в ядре (рис. 3, *c*), образование пероксисом (рис. 3, *f*). Расширение каналов шероховатого эндоплазматического ретикулума (рис. 3, *c, d*), по всей вероятности, обусловлено включением в клетке процессов, направленных на детоксикацию СК. Скопления черных липидных капель вблизи мембран, возможно, представляют собой продукты деградации мембранных липидов, обусловленных развитием в клетках окислительного стресса (рис. 3, *c*). Кроме того, уже после 1 ч воздействия СК на корни наблюдалось образование

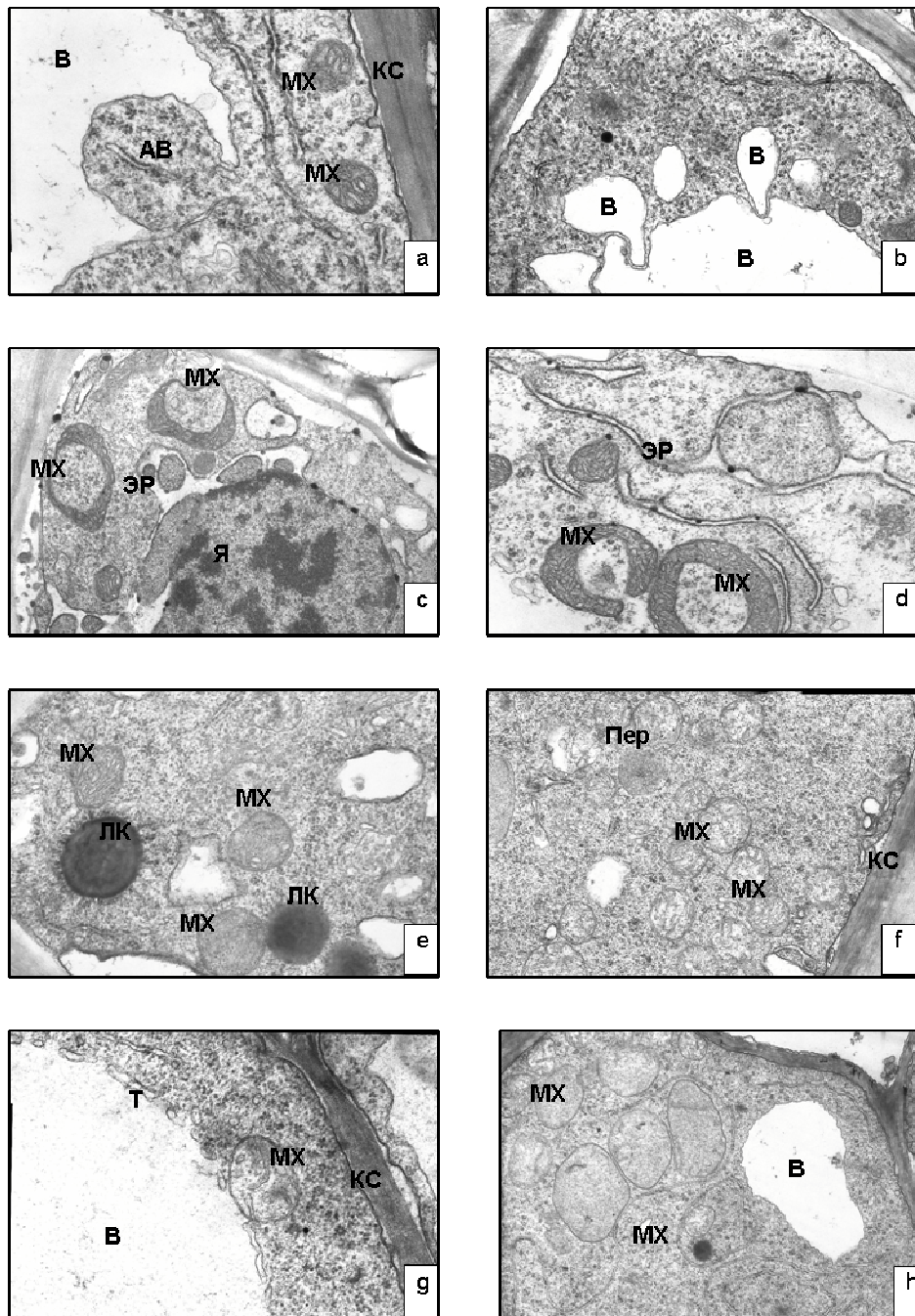


Рис. 3. Ультраструктура клеток корней пшеницы при действии 1 мМ СК: *a* – конденсированные митохондрии, образование аутолитических вакуолей через 1 ч; *b* – вакуолизация клеток через 2 ч; *c, d* – тороидальные митохондрии, расширение каналов ЭПР через 3 ч; *e, f* – просветленные митохондрии, контакт митохондрий с липидными каплями через 4 ч; *g* – разрушение тонопласта через 5 ч; *h* – просветленные митохондрии через 6 ч

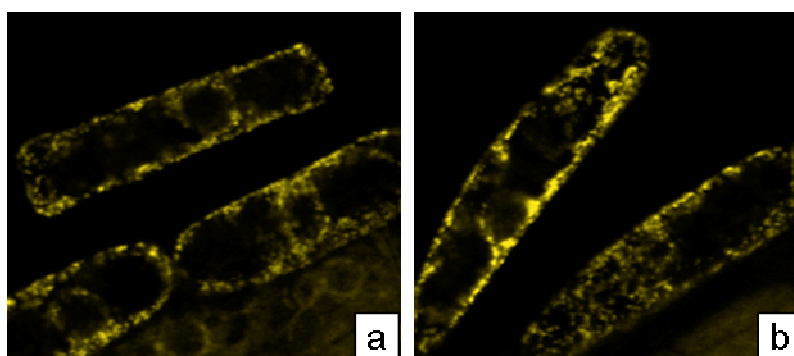


Рис. 4. Митохондриальный мембранный потенциал в клетках корней, обработанных СК: *a* – контроль, *b* – 1 мМ СК

Табл. 9

Количество живых клеток через 6 ч инкубации в растворах СК и карнозина

Вариант	Живые клетки, %
Контроль	97.3 ± 23.6
СК (1 мМ)	59.2 ± 21.4*
Карнозин (20 мМ)	95.5 ± 35.1
СК + Карнозин	77.7 ± 22.9*

большого количества аутолитических вакуолей, содержащих куски цитоплазмы и органеллы (рис. 3, *a*). Аутолитические вакуоли характерны для стареющих клеток растений и клеток, испытывающих недостаток питательных веществ [20]. Согласно существующим в литературе представлениям, образование подобных вакуолей характерно для процесса аутофагии, который в настоящее время относят к одному из видов программируемой клеточной смерти [20].

Обнаружено, что 6 ч инкубация с 1 мМ СК вызвала гибель части клеток, которая сопровождалась массовой усиленной вакуолизацией цитоплазмы клеток (рис. 3, *b, c, e, f*), разрывами тонопласта (рис. 3, *g*), еще большим образованием аутолитических вакуолей, содержащих куски цитоплазмы и органеллы, полной деструкцией внутриклеточной организации. При окрашивании клеток красителем Эвансом синим, который проникает только в мертвые клетки, было обнаружено, что после 6 ч воздействия СК окрашивается около 40% клеток растущей части корня (табл. 9). Интересно, что при совместном действии СК и карнозина процент мертвых клеток уменьшался.

Таким образом, можно полагать, что подавление роста корней, митотической активности клеток и разрушение внутриклеточной организации в клетках корней пшеницы при действии СК обусловлено развитием в клетках окислительного стресса, увеличением протонной проницаемости плазмалеммы и, в конечном итоге, нарушением энергообеспечения клеток. Это подтверждается нашими данными о СК-индуцированном увеличении образования АФК и перекисного окисления липидов, а также снятии эффектов СК и других протонифоров при действии буферных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 06-04-48143), государственного контракта на выполнение научно-исследовательских работ (№ 35-405/06), грантом Президента РФ для поддержки ведущих научных школ РФ (№ НШ-5492.2008.4).

Summary

S.A. Dmitrieva, A.A. Ponomareva, F.V. Minibayeva, L.K. Gordon. ROS and Proton Mediated Effects of Salicylic Acid on the Growth and Ultrastructure of Cells in Wheat Roots.

Energy dependence of salicylic acid (SA) induced cell responses in the roots of wheat *Triticum aestivum* L. seedlings was studied. Treating roots with SA led to the inhibition of root growth, the decrease in mitotic activity and premature cell death. Cellular lysis was accompanied by appearance of numerous autolytic vacuoles containing fragments of cytoplasm and organelles. Two possible mechanisms of energy depletion resulting in the SA induced cell death are discussed.

Key words: wheat roots, salicylic acid, reactive oxygen species, energy metabolism, growth, ultrastructure.

Литература

1. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – 294 с.
2. *Chen Z., Iyer S., Caplan A., Klessig D.F., Fan B.* Differential accumulation of salicylic acid-sensitive catalase in different rice tissues // *Plant Physiol.* – 1997. – V. 114, No 1. – P. 193–201.
3. *Yalpani N., Silverman P., Wilson T.M.A., Kleier D.A., Raskin I.* Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco // *The Plant Cell.* – 1991. – V. 3, No 8. – P. 809–818.
4. *Raskin I.* Salicylate, A new plant hormone // *Plant Physiol.* – 1992. – V. 99, No 3. – P. 799–803.
5. *Ray S.D.* GA, ABA, phenol interaction and control of growth: phenolics as effective modulators of GA-ABA interaction in radish seedlings // *Biol. Plant.* – 1986. – V. 28, No 7. – P. 361–369.
6. *Chen H.-J., Hou W.-C., Kuc J., Lin Y.-H.* Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent excretion modes of salicylic acid in tobacco cell suspension culture // *J. Exp. Bot.* – 2001. – V. 52, No 359. – P. 1219–1226.
7. *Perennes C., Glab N., Guglieni B., Doutriaux M.P., Phan T.H., Planchais S., Bergounioux C.* Is arcA3 a possible mediator in the signal transduction pathway during agonist cell cycle arrest by salicylic acid and UV irradiation? // *J. Cell Sci.* – 1999. – V. 112, No 8. – P. 1181–1190.
8. *Шакирова Ф.М.* Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.
9. *Часов А.В., Гордон Л.Х., Колесников О.П., Минабаева Ф.В.* Peroксидаза клеточной поверхности – генератор супероксид-аниона в корневых клетках пшеницы при раневом стрессе // *Цитология.* – 2002. – Т. 44, № 7. – С. 691–696.
10. *Пonomareva A.A., Pologalova O.O.* Структурно-функциональные изменения в клетках корней пшеницы при действии карбонилцианид 3 – хлоргидраза // *Цитология.* – 2001. – Т. 43, № 6. – С. 561–566.
11. *Ruffer M., Steipe B., Zenk M.N.* Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase // *FEBS Lett.* – 1995. – V. 377, No 2. – P. 175–180.

12. *Li J., Shan L., Zhou J.M., Tang X.* Overexpression of Pto induces a salicylate-independent cell death but inhibits necrotic lesions caused by salicylate-deficiency in tomato plants // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2002. – V. 15, No 7. – P. 266–274.
13. *Kawano T., Muto S.* Mechanism of peroxidase action for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture // *J. Exp. Bot.* – 2000. – V. 51, No 345. – P. 685–693.
14. *Yu D., Xie Z., Chen C., Fan B., Chen Z.* Expression of tobacco class II catalase gene activates the endogenous homologous gene and is associated with disease resistance in transgenic potato plants // *Plant Mol. Biol.* – 1999. – V. 39, No 3. – P. 477–488.
15. Программированная клеточная гибель / Под ред. В.С. Новикова. – СПб.: Наука, 1996. – 216 с.
16. *Гордон Л.Х., Минибаева Ф.В., Огородникова Т.И., Рахматуллина Д.Ф., Ценцевичский А.Н., Колесников О.П., Максютин Д.А., Валитова Ю.Н.* Салициловая кислота вызывает диссипацию протонного градиента на плазмалемме растительных клеток // *Докл. РАН.* – 2002. – Т. 387, № 6. – С. 839–841.
17. *Скулачев В.П.* Аккумуляция энергии в клетке. – М.: Наука, 1969. – 440 с.
18. *Буфетов Е.Н., Польшалова О.О., Пономарева А.А.* Ультраструктурные особенности митохондрий в процессе адаптации клеток к действию ротенона // *Цитология.* – 2004. – Т. 46, № 11. – С. 985–992.
19. *Xie Z., Chen Z.* Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells // *Plant Physiol.* – 1999. – V. 120, No 1. – P. 217–226.
20. *Slavikova S., Shy G., Yao Y., Glozman R., Levanyon H., Pietrokovski S., Elazar Z., Galili G.* The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in Arabidopsis plants // *J. Exp. Bot.* – 2005. – V. 56, No 421. – P. 2839–2849.

Поступила в редакцию
24.06.08

Дмитриева Светлана Анатольевна – младший научный сотрудник Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

E-mail: dmitrieva@mail.knc.ru

Пономарева Анастасия Анатольевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

E-mail: ponomareva@mail.knc.ru

Минибаева Фарида Вилевна – доктор биологических наук, заведующий лабораторией Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

E-mail: minibayeva@mail.knc.ru

Гордон Лев Хаимович – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

E-mail: gordon@mail.knc.ru