



УДК 581.1

Мягкий тепловой стресс способствует защите клеток *A. thaliana* от летального действия салициловой кислоты

Е. Л. Горбылева^{1,2}, Е. Г. Рихванов¹, Т. М. Русалева¹, А. В. Степанов¹,
Г. Б. Боровский¹, В. К. Войников¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

²Национальный исследовательский Иркутский государственный технический университет, Иркутск
E-mail: dzubina@sifibr.irk.ru

Аннотация. Салициловая кислота (СК) является важной сигнальной молекулой в развитии устойчивости растений к биотическому стрессу. Изучено влияние разных концентраций СК на жизнеспособность культуры клеток *A. thaliana*. Показано, что экзогенное применение СК в высоких концентрациях приводило к гибели культуры клеток, развивающейся во времени и сопровождающейся отставанием плазмалеммы от клеточной стенки. Такая реакция, согласно литературным данным, определяется как программируемая клеточная смерть (ПКС). Инкубирование клеток в условиях мягкого теплового стресса сопровождалось индукцией синтеза белков теплового шока (БТШ) и снижало гибель клеток при обработке СК (явление перекрёстной устойчивости). Предполагается, что такая перекрёстная устойчивость обусловлена способностью БТШ ингибировать ПКС у растений.

Ключевые слова: салициловая кислота, белки теплового шока, *Arabidopsis thaliana*, программируемая клеточная смерть, тепловой стресс.

Введение

Салициловая кислота (СК) – важная сигнальная молекула в развитии устойчивости растений к биотическому стрессу [15]. Известно, что обработка низкими концентрациями СК приводит к повышению соле- и термоустойчивости растений [2; 5], однако её высокие концентрации могут вызывать гибель растительных клеток по типу программируемой клеточной смерти (ПКС) [2; 3].

На животных показано, что повышенное содержание белков теплового шока (БТШ) может приводить к снижению или полной отмене признаков ПКС [7]. БТШ индуцируются при мягком тепловом стрессе и защищают клетки от последующего повреждающего теплового воздействия. Это явление называется индуцированной термотолерантностью (ИТ). Ведущую роль в развитии ИТ у растений играет белок Hsp101 [9].

Об антиапоптотических функциях БТШ у растений практически ничего не известно. В связи с этим целью данной работы было изучение влияния защитной роли БТШ при действии салициловой кислоты в культуре клеток *A. thaliana*.

Материалы и методы

В работе использовали 8-дневную культуру клеток *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn. (раса Columbia). Культуру клеток выращивали в темноте при 26 °С в среде, содержащей соли по Murashige и Skoog [1]. Определение жизнеспособных клеток оценивали по показателям восстановления 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) [1]. Белок выделяли в буфере (0,1 М Трис-НСl, 3 мМ ДДС-Na, 1 мМ β-меркаптоэтанол, рН 7,4–7,6), центрифугировали (15 000 g, 15 мин), осаждали трёхкратным объёмом ацетона. Осадок белка растворяли в буфере для образца (0,625 М Трис-НСl, 8 мМ ДДС-Na, 0,1 М β-меркаптоэтанол, 10 % глицерин, 0,001 % бромфеноловый синий, рН 6,8). После разделения белков путём ДДС-электрофореза в 14 % ПААГ проводили иммуноблоттинг с антителами согласно опубликованной методике [1]. Окрашивание мёртвых клеток проводили с помощью красителя Эванса голубого [6]. Микроскопический анализ проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver Z1 с цифровой монохромной камерой AxioCam MRm3 и пакетом программного обеспечения AxioVision Rel. 4.6.

Эксперименты повторяли не менее трёх раз. Представлены средние арифметические значения и их стандартные отклонения.

Результаты

Изучалось влияние разных концентраций СК на жизнеспособность клеток *A. thaliana*, для чего в среду инкубации добавляли СК в концентрациях 0,5; 1; 2,5 и 5 мМ и инкубировали в течение 24 ч при 26 °С (рис. 1). Затем клетки несколько раз промывали культуральной средой для удаления СК, ресуспендировали в свежей среде и инкубировали при 26 °С. Жизнеспособность клеток определяли через 48 ч по-

сле отмывки по восстановлению ими ТТХ (см. рис. 1, А), либо окрашиванию мёртвых клеток красителем Эванса голубым (см. рис. 1, Б).

Обработка СК в концентрации 0,5 и 1 мМ в течение 24 ч несколько снижала жизнеспособность клеток *A. thaliana*, концентрация 2,5 мМ снижала её примерно вдвое, а концентрация 5 мМ СК действовала наиболее сильно. Сопоставление результатов обоих методов определения жизнеспособности показало, что снижение количества клеток, способных восстанавливать ТТХ, совпадает с увеличением количества мёртвых клеток (см. рис. 1, А; Б).

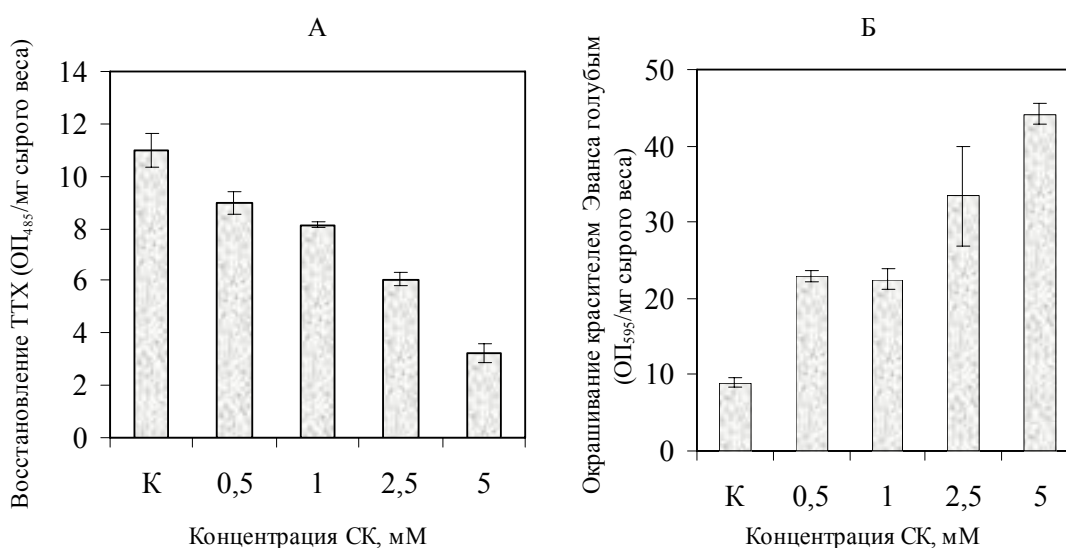


Рис. 1. Влияние разных концентраций СК на жизнеспособность клеток *A. thaliana*. Определение жизнеспособности по восстановлению ТТХ (А) и окрашиванию красителем Эванса голубым (Б). Клетки обрабатывали 0,5; 1; 2,5 и 5 мМ СК и инкубировали 24 ч при 26 °С. К – контроль. Жизнеспособность определяли через 48 ч после отмывки. n = 6–8

Концентрация СК 5 мМ была выбрана для дальнейших исследований как значительно снижающая жизнеспособность большинства клеток, однако не приводящая к их полной гибели.

На следующем этапе исследования изучались параметры гибели клеток. Указанная концентрация является достаточно высокой и может вызывать некроз клеток растений, в связи с чем было изучено её действие во времени. Культуру клеток *A. thaliana* обрабатывали СК в концентрации 5 мМ при 26 °С в течение 6, 18 и 24 ч, далее клетки отмывали и инкубировали в течение 48 ч. Жизнеспособность клеток в опыте снижалась пропорционально времени инкубирования с СК, тогда как число мёртвых клеток возрастало (рис. 2, А, Б).

Таким образом, гибель культуры клеток *A. thaliana* при обработке СК происходит не сразу, а развивается во времени.

Известно, что развитие ПКС сопровождается конденсацией протопласта с отставанием плазмалеммы от клеточной стенки (необратимый плазмолиз) [14].

С целью установить изменения в клетках культуры *A. thaliana*, подвергающихся обработке СК, была изучена их морфология. Через 24 ч после обработки 5 мМ СК (рис. 3) наблюдалось отставание плазмалеммы от клеточной стенки, протопласт конденсировался и превращался в плотный комок, однако некоторая часть клеток погибала некротическим путём. В контроле таких изменений не наблюдалось.

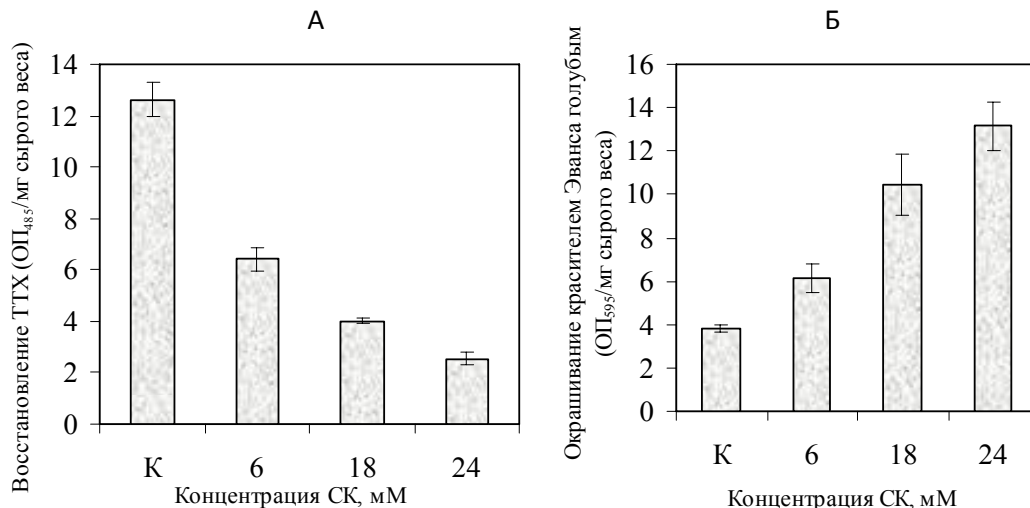


Рис. 2. Временная динамика снижения жизнеспособности клеток *A. thaliana* при обработке СК в концентрации 5 мМ. Определение жизнеспособности по восстановлению ТТХ (А) и окрашиванию красителем Эванса голубым (Б). Клетки инкубировали с 5 мМ СК 6, 18, 24 ч при 26 °С. В качестве контроля (К) использовали клетки, инкубированные 24 ч в отсутствии СК. Жизнеспособность определяли через 48 ч после отмычки. n = 6

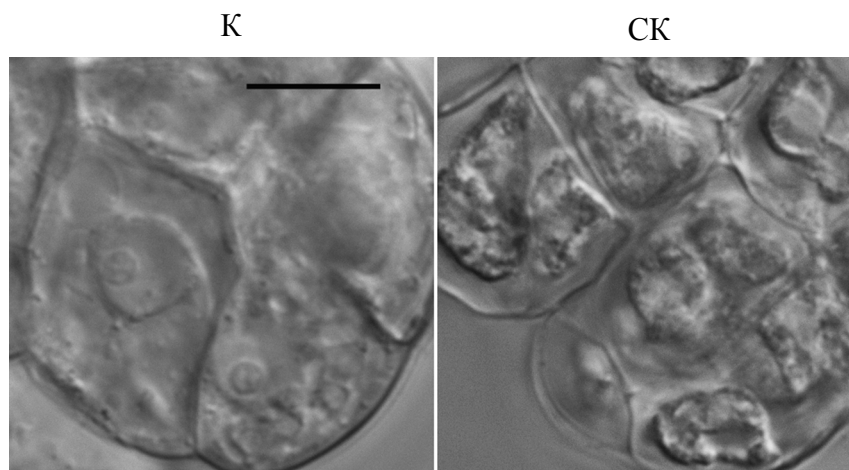


Рис. 3. Влияние СК на морфологию клеток *A. thaliana*. Микрофотографии клеток выполнены методом интерференционного контраста (DIC). Культуру клеток инкубировали с 5 мМ СК в течение 24 ч при 26 °С. К – контроль. Масштабный отрезок равен 10 мкм

Для проверки предположения, что БТШ могут снижать вызываемую СК гибель клеток, в первую очередь был подтвержден их синтез в культуре клеток *A. thaliana* при тепловой обработке (рис. 4). Далее клетки инкубировали при 26 и 37 °С в течение 2 ч и отбирали пробы для иммуноблоттинга с антителами против белков Hsp101, Hsp17.6 (класс I), Hsp17.6 (класс II) и Hsp60. Результаты показали значительное повышение уровня БТШ при мягком тепловом стрессе (см. рис. 4). Чтобы выяснить, как повышенное содержание БТШ влияет на жизнеспособность клеток *A. thaliana* при обработке СК, их предварительно инкубировали при 26 и 37 °С (2 ч), 24 ч обрабатывали 5 мМ СК при

26 °С, затем отмывали и инкубировали в течение 48 ч (рис. 5).

Таким образом, жизнеспособность клеток, инкубированных с 5 мМ СК при 26 °С снижалась на 85 %, а клеток, предварительно инкубированных при 37 °С, – на 55 %. То есть способность клеток восстанавливать ТТХ после инкубирования при 37 °С повышалась на 30 %, и такое повышение выживаемости коррелировало с присутствием БТШ. Следовательно, предварительное инкубирование клеток *A. thaliana* в условиях мягкого теплового стресса частично защищало их от гибели, вызванной обработкой СК.

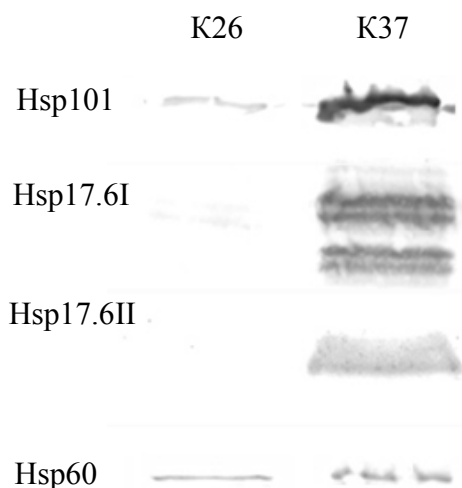


Рис. 4. Синтез БТШ в нормальных условиях и при мягком тепловом стрессе. Представлены результаты иммуноблоттинга. Клетки инкубировали при 26 °C или 37 °C в течение 120 мин

Обсуждение

Влияние экзогенной СК на растения имеет двойной характер. С одной стороны, её низкие концентрации вызывают повышение устойчивости к стрессовым факторам [2; 9]. С другой – обработка высокими концентрациями СК приводит к гибели клеток [2; 3]. В наших экспериментах гибель клеток наблюдалась при обработке 5 мМ СК в течение 24 ч (см. рис. 1), причём происходила в зависимости от времени инкубирования с СК (см. рис. 2). Аналогичные данные с использованием той же самой концентрации СК получены J. Garcia-Heredia с соавторами [3] на культуре клеток арабидопсиса.

Согласно имеющимся литературным данным, экзогенная СК вызывает клеточную гибель по типу ПКС. В наших экспериментах гибель при действии СК развивалась во времени (см. рис. 2), а также наблюдался один из характерных признаков ПКС – отставание цитоплазмы от клеточной стенки (см. рис. 3). Плазмолиз и дальнейшая конденсация протопласта у растений являются активными процессами и не проявляются у клеток, погибающих некротическим путём [14]. Таким образом, на основании полученных нами и литературных данных можно считать, что воздействие СК в наших экспериментах вызывало ПКС.

Считается, что ПКС, вызванная СК, происходит за счёт накопления большого количества перекиси водорода, перекисного окисления липидов и окислительного повреждения белков

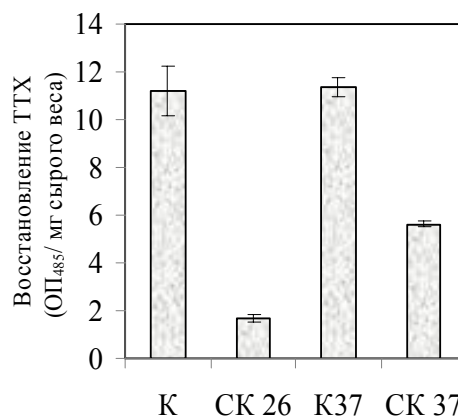


Рис. 5. Влияние мягкого теплового стресса на гибель клеток *A. thaliana*, вызванную обработкой СК. Определение жизнеспособности по восстановлению ТТХ. Клетки предварительно инкубировали при 26 °C или 37 °C в течение 2 ч, затем обрабатывали 5 мМ СК в течение 24 ч. К – контроль. Жизнеспособность определяли через 48 ч после отмывки. n = 4

вследствие способности кислоты ингибировать каталазу [12]. СК может также вызывать ПКС посредством влияния на митохондрии, вызывая в относительно низких концентрациях разобщение окислительного фосфорилирования, а в более высоких – ингибирование дыхания [2; 10; 13]. На животных показано, что СК взаимодействует с комплексом I ЭТЦ, приводя к увеличению уровня митохондриальных АФК, запускающему ПКС [4].

Известно, что БТШ также могут подавлять апоптоз у животных, вызванный различными стимулами [7]. У растений антиапоптотическая роль БТШ практически не изучена. Ранее показано, что инкубирование культуры клеток *A. thaliana* в условиях мягкого теплового стресса, при котором синтезируются БТШ, защищало от ПКС, вызванной жёстким тепловым шоком [11]. Аналогично этому, в наших экспериментах предобработка в условиях мягкого теплового стресса способствовала снижению гибели культуры клеток *A. thaliana* от действия высокой концентрации СК. В данном эксперименте была использована инкубация клеток при 37 °C в течение 2 ч, достаточная для накопления БТШ Hsp101 и нмБТШ. Мягкий тепловой стресс защищал клетки от летального действия СК не со 100%-ной эффективностью, но способствовал значительному (примерно на 30 %) росту числа выживших клеток. Таким образом, БТШ защищают клетки не только от летального действия гипертермии, но и от дей-

ствия других факторов, не связанных с высокой температурой, в том числе от действия СК.

В литературе описаны эксперименты, когда мягкий тепловой стресс защищает клетки растений от действия не только повреждающей высокой температуры, но и других стрессоров [8]. Это явление названо перекрёстной устойчивостью. Вначале предполагалось, что стрессоры вызывают в клетке агрегацию и денатурацию белковых молекул, а перекрёстная устойчивость достигается в результате предотвращения этих процессов БТШ и другими защитными системами клетки. Впоследствии оказалось, что при этих воздействиях в клетках животных развивается ПКС. Стало очевидно, что одним из механизмов перекрёстной устойчивости является способность БТШ ингибировать развитие ПКС [7]. Перекрёстная устойчивость также может развиваться и у растений [8]. Мягкое тепловое воздействие, сопровождающееся синтезом БТШ, индуцирует устойчивость растений не только к жёсткому тепловому шоку, но и к другим абиотическим стрессам, включая аноксию, окислительный стресс, тяжёлые металлы. Эти воздействия в растительной клетке могут вызывать развитие ПКС. Возможно, явление перекрёстной устойчивости у растений также определяется способностью БТШ ингибировать развитие ПКС.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение № 8266.

Литература

1. Влияние салициловой кислоты на развитие индуцированной термотолерантности и индукцию синтеза БТШ в культуре клеток *Arabidopsis thaliana* / Е. Л. Дзюбина [и др.] // Физиология растений. – 2009. – Т. 56. – С. 78–84.
2. Тарчевский И. А. Протеомный анализ изменений в корнях гороха, вызванных апопозиндуцирующей концентрацией салициловой кислоты / И. А. Тарчевский, В. Г. Яковлева, А. М. Егорова // Докл. РАН. – 2008. – Т. 422. – С. 410–414.
3. Acetylsalicylic acid induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures / J. M. Garcia-Heredia [et al.] // *Planta*. – 2008. – Vol. 228. – P. 89–98.
4. Amirsadeghi S. The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress / S. Amirsadeghi, C. A. Robson, G. C. Vanlerberghe // *Physiol. Plantarum*. – 2007. – Vol. 129. – P. 253–266.
5. Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress / N. A. Khan [et al.] // *Int. J. Plant Biol.* – 2010. – Vol. 1. – P. 1–8.
6. Baker C. J. Active oxygen species in plant pathogenesis / C. J. Baker, E. W. Orlandi // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 1995. – Vol. 33. – P. 299–321.
7. Beere H. ‘The stress of dying’: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis / H. Beere // *J. Cell. Sci.* – 2004. – Vol. 117. – P. 2641–2651.
8. Chinnusamy V. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants / V. Chinnusamy, K. Schumaker and J.-K. Zhu // *J. Exp. Bot.* – 2004. – Vol. 55. – P. 225–236.
9. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis* / C. Queitsch [et al.] // *Plant Cell*. – 2000. – Vol. 12. – P. 479–492.
10. Maxwell D. P. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence / D. P. Maxwell, R. Nickels, L. McIntosh // *The Plant J.* – 2002. – Vol. 29. – P. 269–279.
11. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in *Arabidopsis* cell culture / E. G. Rikhvanov [et al.] // *Plant J.* – 2007. – Vol. 52. – P. 763–778.
12. Rao M. Y. Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: The role of salicylic acid / M. Y. Rao, K. R. Davis // *Plant J.* – 1999. – Vol. 17. – P. 603–614.
13. Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport / C. Norman [et al.] // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 134. – P. 492–501.
14. Swidzinski J. A. A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* / J. A. Swidzinski, L. J. Sweetlove, C. J. Leaver // *Plant J.* – 2002. – Vol. 30. – P. 431–446.
15. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? / L. A. J. Mur [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2007. – Vol. 59. – P. 1–20.

Mild heat shock promotes *A. thaliana* cells protection from lethal effect of salicylic acid

Е. Л. Горбылева^{1,2}, Е. Г. Рихванов¹, Т. М. Русалева¹, А. В. Степанов¹,
Г. В. Боровский¹, В. К. Воейков¹

¹*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk*

²*National Research Irkutsk State Technical University, Irkutsk*

Abstract. Salicylic acid (SA) is an important signal molecule in the development of plant resistance to biotic stress. Exogenous applying of high SA concentrations led to programmed cell death (PCD) of *A. thaliana* cells. Cells incubation at mild heat shock was accompanied by the induction of heat shock proteins (HSPs) synthesis and resulted in the decreasing of the cell death from SA treatment (cross resistance). This cross resistance is supposed to be caused by the HSPs ability to inhibit PCD in plants.

Key words: salicylic acid, heat shock proteins, *Arabidopsis thaliana*, programmed cell death, heat shock.

Горбылева Елена Леонидовна
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
кандидат биологических наук,
младший научный сотрудник
тел. (3952) 42-46-59, факс (3952) 51-07-54
E-mail: dzubina@sifibr.irk.ru

Gorbyleva Elena Leonidovna
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Ph. D. of Biology, junior research scientist
phone: (3952) 42-46-59, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: dzubina@sifibr.irk.ru

Рихванов Евгений Геннадьевич
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
тел. (3952) 42-46-59, факс (3952) 51-07-54
E-mail: eugene@sifibr.irk.ru

Rikhvanov Evgenii Gennadiyevich
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033,
D. Sc. in Biology, senior research scientist
phone: (3952) 42-46-59, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: eugene@sifibr.irk.ru

Русалева Татьяна Михайловна
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
ведущий инженер
тел. (3952) 42-46-59, факс (3952) 51-07-54,
E-mail: dzubina@sifibr.irk.ru

Rusaleva Tatyana Mikhailovna
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
leading engineer
phone: (3952) 42-46-59, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: dzubina@sifibr.irk.ru

Степанов Алексей Владимирович
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
кандидат биологических наук, научный сотрудник
тел. (3952) 42-46-59, факс (3952) 51-07-54,
E-mail: stepanov@sifibr.irk.ru.

Stepanov Alexey Vladimirovich
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
Ph. D. of Biology, research scientist
phone: (3952) 42-46-59, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: stepanov@sifibr.irk.ru.

Боровский Геннадий Борисович
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
тел. (3952) 42-46-59, факс (3952) 51-07-54
E-mail: borovskii@sifibr.irk.ru.

Borovskii Gennadii Borisovich
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
D. Sc. in Biology, senior research scientist
phone: (3952) 42-46-59, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: borovskii@sifibr.irk.ru.

Войников Виктор Кириллович
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
доктор биологических наук, директор института
тел. (3952)42-46-59, факс (3952) 51-07-54
E-mail: vvk@sifibr.irk.ru

Voinikov Victor Kirillovich
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
D. Sc. in Biology, Director
phone: (3952) 42-67-21, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: vvk@sifibr.irk.ru