

РАЗЛИЧНЫЕ ФОРМЫ СМЕРТИ РАСТЕНИЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ БИОТИЧЕСКИХ И АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Н.Е. Павловская, А.Ю. Гаврилова, К.Н. Гуляева

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Орловский государственный аграрный университет», Орёл, Россия, anechkag@bk.ru

Аннотация. Комитет номенклатуры по клеточной смерти (NCCD) сформулировал руководящие принципы определения и интерпретации гибели клеток с морфологических, биохимических и функциональных сторон (ферроптоз, лизосом-зависимая смерть, митотическая смерть, некроптоз, запрограммированная гибель клеток PCD, др.). В настоящее время раскрываются новые механизмы, которые объясняют множественные пути смерти клеток, в связи с чем, нами рассмотрена гибель клеток по пути апоптоза и некроза растительных клеток.

Ключевые слова: апоптоз, некроз, клеточная смерть

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-599-603

В составе запрограммированной клеточной гибели (PCD) в свою очередь выделяют несколько типов: апоптоз, аутофагическую гибель и запрограммированный некроз [Ogier Denis, Codagno, 2003; Edinger, Thompson, 2004]. В растениях, как и у животных, не существует лишь одного типа смерти. В растениях термин PCD, или ПКС широко используется для описания большинства случаев смерти. В клетках растений обнаружен ген, гомологичный животному гену *dad1*, который защищает клетки от апоптоза [Kelleher, Gilmore, 1997]. Активность этого гена, как и противостояние апоптозу резко уменьшаются при старении растения; это наблюдалось в стареющих лепестках гороха и при обезвоживании семян. Как и у животных, апоптоз у растений сопровождается чередой характерных структурно морфологических изменений клетки: происходит выраженная конденсация хроматина с последующим распадом ядра, клеточная мембрана становится пузырчатой, вся цитоплазма как бы вскипает, что называют «пляской смерти» (*dance macabre*), и образуются гигантские вакуоли. В большинстве случаев у растений разрушение тонопласта и вакуолизация цитоплазмы предшествуют разрушению ядра и митохондрий. В цитозоле апоптотических клеток растений отмечено резкое увеличение концентрации Ca^{2+} . В отличие от животных, остовы апоптотических растительных клеток, как правило, не исчезают бесследно из-за прочных клеточных стенок, они составляют обычно основу для образования сосудистых пучков и аэренхимы у растений. Запуск апоптоза в растениях контролируется различными факторами и зависит от функционального (физиологического) состояния растения.

Запрограммированная гибель клеток (PCD) в растениях является важнейшим компонентом механизмов развития и защиты. Некроз обычно описывается как хаотический и неконтролируемый способ смерти [Theresa et al., 2008]. Ультраструктурные исследования Керра и его коллег изначально описывали две различные формы гибели клеток [Kerr et al., 1972]: апоптоз и некроз. Первоначально апоптоз был описан в очень специфических морфологических терминах и до сих пор характеризуется усыханием клеток, ядерной конденсацией и фрагментацией и, в конечном счете, распадом клетки в «апоптотические тела» [Adrain, Martin, 2001]. Во время некроза определяющим признаком морфологических изменений является разбухание клетки, а не усадка. Это набухание связано с тем, что клетка теряет способность к осморегуляции, в результате чего вода и ионы падают в клетку [Lennon

et al., 1991]. В современной классификации ПКС апоптоз получил название «ПКС I типа», а некроз – «ПКС III типа»; «ПКС II типа» представлен аутофагией.

Растения используют ПКС как в процессе развития организма (например, при образовании ксилемы, прорастании семян, предотвращении самоопыления, старении), так и в ответ на стрессовые воздействия (солевой, температурный, окислительный стрессы) и при защите от патогенов. Как и в случае животных, ПКС может иметь разные формы [Фомичева и др., 2012,], но, в целом, можно проследить наличие ряда общих черт при ПКС в обоих царствах. К таким проявлениям ПКС относятся: фрагментация ДНК, выход цитохрома *c* из митохондрий, сжатие клетки, генерация активных форм кислорода, экспонирование фосфатидилсерина и т.д. Установлено наличие ряда сходных морфологических черт в ПКС животных и растений, но у растений отсутствуют каспазы – основные исполнители ПКС животных. Авторы предположили, что в осуществлении ПКС у растений задействованы протеазы, являющиеся функциональными аналогами каспаз животных, но структурно сильно отличающиеся от каспаз. К подобным ферментам относится фитаспаза [Чичкова, 2011].

Различие между апоптозом и некрозом проявляется в зависимости от сроков и тяжести повреждений. Действительно, Леннон и др.(1991) показали, что в клетках животных апоптоз или некроз могут быть экспериментально вызваны изменением уровней стресса (ядами, ультрафиолетовым облучением и т.д.). McCabe et al. (1997) подвергали морковные клетки различным уровням теплового стресса. Авторы отметили, что гибель клеток при температурах до 55 °С приводила к апоптозу, а при более высоких температурах к некрозу.

Целью данного исследования было: исследовать различия в проявлении видов смерти проростков гороха, подвергающихся воздействию биотических и абиотических стрессоров.

Объект и методы: горох (*Pisum sativum*) – сорт Норд, колеоптили ячменя. Факторы воздействия на экспериментальные растения: инфицирование грибом *Fusarium oxysporum*, инфицирование грибом *Ascochyta pisi*, обработка раствором Cd^{2+} в форме $CdSO_4$ концентрацией $5 \cdot 10^{-3}$ М, согласно [Серегин, 2001], обработка раствором 6-бензиламинопурина (6-БАП), концентрацией 27 мкМ (избыток) и 4 мкМ (близкая к *in vivo*), согласно [Carimi, 2003], обработка гороха вытяжкой колеоптилей пшеницы.

Для определения динамики изменений ДНК колеоптили или листья отделяли от прочих органов растения, размещали в незамкнутой стеклянной таре и замораживали в течение суток. Далее пробы быстро измельчали алюминиевым пестиком в пробирке Эппендорфа.

Затем выделение ДНК производилось с помощью набора реагентов и методики, разработанных предприятием BioKom. Методика выделения ДНК базируется на извлечении ДНК сорбентом NucleOS из продуктов обработки пробы лизисным реагентом, в дальнейшем NucleOS промывается солевым буфером и ДНК десорбируется и переводится в раствор реагентом ExtraGene. ДНК, растворенная в ExtraGene, подвергается электрофоретическому разделению. Электрофорез осуществляют на агарозном геле (1.5% раствор агарозы в воде) в TBE-буфере с добавлением бромистого этидия. Фотографии гелевой пластины получают на ультрафиолетовом трансиллюминаторе (BioKom), используя способность комплекса бромистого этидия с ДНК светиться в ультрафиолетовом свете [Шевелуха, 2003].

Исследование проявлений клеточной гибели в проростках гороха под действием абиотических факторов включали обработку кадмием и 6-БАП. Установлено, что в норме в проростках гороха состав и целостность молекул ДНК в течение всего периода изучения изменяются очень слабо (Рис. 1а). Основное различие заключается в увеличении светимости, свидетельствующем о накоплении в растущем листе ДНК, не

подвергающейся ни апоптозной, ни некротической деградации. Под влиянием обработки кадмием в проростках гороха происходят изменения ДНК в процессе некроза, индуцированного кадмием. Наблюдается высокая степень бессистемной деструкции (рис. 1б).

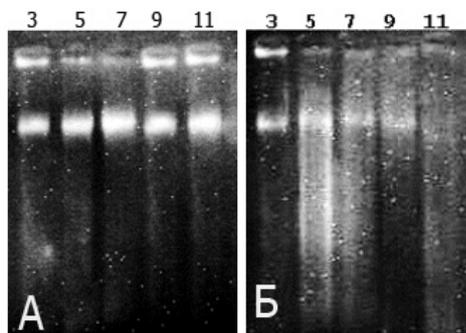


Рис. 1. Электрофореграмма ДНК, выделенной из контрольных проростков гороха. Метка обозначает возраст проростка в сутках.

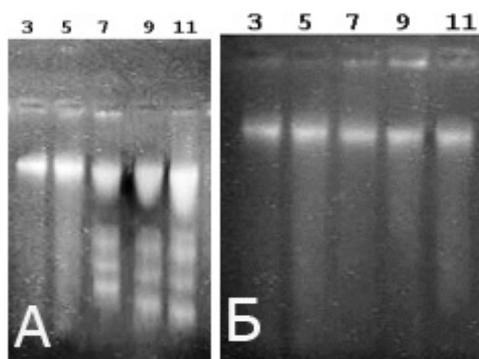


Рис. 2. Изменения ДНК в проростках гороха под действием избытка 6-БАП (А) и близкого к *in vivo* (Б).

Под влиянием избытка кадмия (рис. 2а) по электрофореграмме можно наблюдать типичную для апоптоза картину – лестницеобразные пятна на электрофореграмме, связанные с апоптотической формой деградации ДНК и хроматина. На электрофореграмме в проростках гороха под действием 6-БАП в концентрации, близкой к *in vivo* (рис. 2б), видна стабильная, не подвергающаяся деградации ДНК. Характерные признаки апоптоза или некроза отсутствуют.

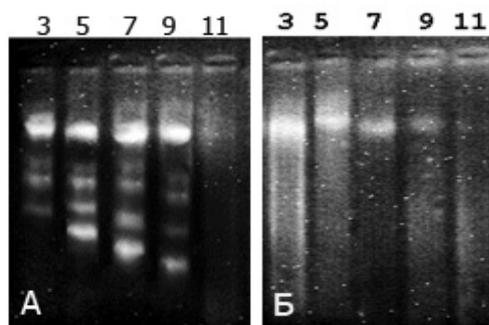


Рис. 3. Изменения ДНК в проростках гороха под действием вытяжки coleoptилей пшеницы (А); Б – под действием инфекции *Ascochyta pisi*.

Результаты анализа ДНК листьев гороха, обработанных вытяжкой колеоптилей пшеницы, полностью подтвердили предположения о том, что апоптоз в листьях гороха необратимо индуцируется действием вытяжки колеоптилей пшеницы.

На электрофореграммах ДНК листьев гороха и линейных профилях (рис. 3а) хорошо различима, характерная для апоптоза “лестница”, проявляющаяся уже с 5-х суток жизни обработанного листа, таким образом, анализ ДНК окончательно подтверждает выводы о запуске апоптоза в листе гороха действием вытяжки колеоптилей пшеницы.

Биотические и абиотические факторы по-разному влияют на проявление смерти клеток гороха.

Литература

Гагарина А.Ю. Особенности функционирования антиоксидантной системы растений при индуцированном апоптозе // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Воронежский государственный университет. Воронеж, 2012.

Павловская Н.Е., Гагарина А.Ю. Индуцирование апоптоза в проростках гороха // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2011. – № 6. – С. 128.

Павловская Н.Е., Козьявина К.Н., Гагарина А.Ю., Гагарина И.Н., Горькова И.В. Антиоксиданты в явлениях апоптоза и некроза // Биоантиоксидант. VIII Международная конференция: тезисы докладов. – 2010. – С. 98–100.

Павловская Н.Е., Гаврилова А.Ю., Нагур М.Ю. Выявления довизуальных симптомов нарушений у растений // Электронный научно-методический журнал Омского ГАУ. – 2016. – № S2. – С. 29.

Фомичева А. С., А. И. Тужиков, Р. Е. Белошистов, С. В. Трусова, Р. А. Галиуллина, Л. В. Мочалова, Н.В. Чичкова, А. Б. Вартапетян. Программированная клеточная смерть у растений / Успехи биологической химии. – 2012. – Т. 52. – С. 97–126.

Чичкова Н.В. Фитаспаза: апоптотическая протеаза растений // Автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора химических наук: 02.00.10 – биоорганическая химия. — Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. — Москва, 2011. — 50 с.

Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas // Trends in Biochemical Sciences. – 2001. – V. 26. – P. 390–397.

Edinger A.L., Thompson C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy // Curr. Opin. Cell Biol. – 2004. – V. 16. – P. 663–669.

Galluzzi L., Vitale I., Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature // Cell Death & Differentiation. – 2018. – doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.

Kelleher D.J., Gilmore R. DAD1, the defender against apoptotic cell death, is a subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – V. 94. – P. 4994–4999.

Kerr J.F., Wyllie A., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // British Journal of Canc. – 1972. – V. 26. – P. 239–257.

Lennon S.V., Martin S.J., Cotter T.G. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli // Cell Proliferation. – 1991. – V. 24. – P. 203–214.

Ogier-Denis E., Codogno P. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – V. 1603. – P. 113–128.

Reape T.J., Molony E.M., McCabe P.F. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes / J. of Experimental Botany. – V. 59. – P. 435–444.

VARIOUS FORMS OF DEATH OF PLANTS UNDER INFLUENCE OF BIOTIC AND ABIOTIC FACTORS

N.E. Pavlovskaya, A.Yu. Gavrilova, K.N. Gulyaeva

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Orel State Agrarian University”, Orel, Russia, anechkag@bk.ru

Abstract. The Committee on Nomenclature for Cell Death (NCCD) formulated guidelines for the determination and interpretation of cell death from morphological, biochemical and functional aspects (ferroptosis, lysosome-dependent death, mitotic death, necroptosis, programmed cell death PCD, etc.). At the present time, new mechanisms that explain the multiple pathways of cell death are revealed, in connection with which we considered cell death along the path of apoptosis and necrosis of plant cells.

Keywords: *apoptosis, necrosis, cell death*