

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА КАК ИНДИКАТОРЫ СТРЕССОВОГО СОСТОЯНИЯ РАСТЕНИЙ

А.В. Федяева¹, И.В. Любушкина^{1,2}, А.В. Степанов¹, И. Ли³, А.В. Сидоров^{1,4}, Е.Г. Рихванов¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, fedyaeva.anna@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия, ostrov1873@yandex.ru

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный аграрный университет имени А.А. Ежевского», Иркутская область, пос. Молодёжный, Россия, li05161020@163.com

⁴Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иркутск, Россия, a_v_sidorov@mail.ru

Аннотация. Продукция активных форм кислорода повышается в ответ на действие стрессоров различной природы в клетках растений. В данной работе было показано, что тепловое и холодное воздействие, а также обработка гербицидом диуроном приводили к одновременному повышению уровня АФК и увеличению митохондриального мембранного потенциала в клетках растений. Это позволяет предполагать, что данные явления являются индикаторами стрессового состояния растения.

Ключевые слова: активные формы кислорода, митохондриальный потенциал

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-781-785

Абиотические или биотические стрессовые воздействия приводят к повышению продукции активных форм кислорода (АФК) в клетках растений [Zhang et al., 2009]. Одним из сайтов продукции АФК являются митохондрии [Gill et al., 2010]. Показано, что между продукцией АФК митохондриями и изменением потенциала на внутренней митохондриальной мембране наблюдается связь. Есть данные, свидетельствующие, что генерация АФК митохондриями усиливается при понижении митохондриального мембранного потенциала (ММП) [Vianello et al., 2007]. Однако в ряде случаях может наблюдаться и обратная зависимость: повышение уровня АФК в клетках растений происходит параллельно увеличению ММП [Федяева и др., 2014; Lyubushkina et al., 2014; Sun et al., 2012]. Известно, что обработка некоторыми гербицидами приводит к усилению генерации АФК [Chen et al., 2015; Pazmino et al., 2011]. Поэтому в данной работе изучили, как температурные воздействия и обработка гербицидом диуроном влияют на уровень АФК и изменение ММП и в культуре клеток растений.

Материалы и методы. В работе была использована суспензионная культура клеток растений: озимая пшеница (*Triticum aestivum* L.) и арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*). Культуру клеток растений выращивали при 26 °С и подвергали температурной обработке 45 °С в течение 30 мин и -8 °С в течение 1 ч, а также обработке гербицидом диуроном 200 мкМ в течение 1 ч. В работе был использован флуоресцентный микроскоп Axio Observer Z1.

Результаты. На начальном этапе работы изучали влияние температурной обработки на интенсивность флуоресценции DCF и JC-1 в культуре клеток озимой пшеницы. Для оценки изменения АФК в клетках растений использовали

флуоресцентный краситель DCF, флуоресценция которого усиливается при повышении уровня АФК. Для определения изменения ММП применяли флуоресцентный краситель JC-1, который накапливается в митохондриях в зависимости от ММП. Культуру клеток инкубировали при температуре 45 °С в течение 30 мин или -8 °С в течение 1 ч после этого добавляли краситель и через 10 мин фиксировали результат. Было показано, что тепловой шок приводил к увеличению интенсивности свечения красителя DCF (рисунок, а), и повышению интенсивности флуоресценции JC-1 (рисунок, б). Аналогичным образом, увеличение интенсивности флуоресценции обоих красителей в клетках растений наблюдалось при холодовом шоке (рисунок, в, г).

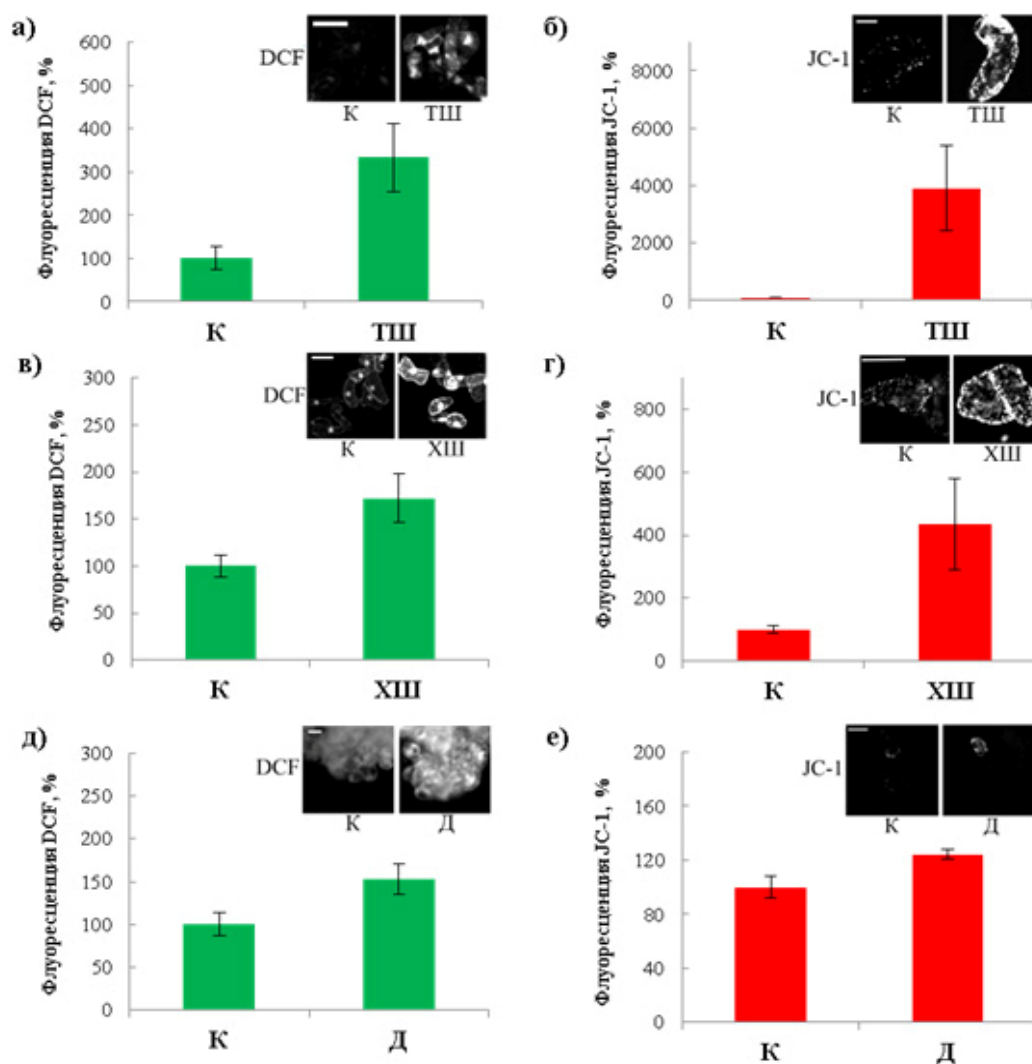


Рисунок. Влияние теплового шока (а, б), холодового шока (в, г) и обработки гербицидом диуроном (е, д) на изменение флуоресценции DCF и JC-1 в культуре клеток озимой пшеницы (а-г) и арабидопсиса (е, д). Обозначения: К – контрольная культура клеток, 26 °С; ТШ – культура клеток озимой пшеницы, инкубируемая при 45 °С; ХШ – культура клеток озимой пшеницы, инкубируемая при -8 °С; Д – культура клеток арабидопсиса, инкубируемая в присутствии 200 мкМ диурана. $n=3$, $M \pm S.E.$ Масштабная линейка: 20 мкм (б, д, е), 50 мкм (а, в, г).

На следующем этапе изучили влияние гербицида диурана на интенсивность флуоресценции красителей DCF и JC-1, для чего использовали культуру клеток арабидопсиса. Диурон (200 мкМ) вносили в культуру клеток (100 мкл) и инкубировали

1 ч. После этого, как видно из графика (рисунок, д, е), происходило увеличение интенсивности флуоресценции красителей DCF и JC-1.

Таким образом, температурное воздействие, как тепловое, так и холодное, а также обработка диуроном вызывают одновременное повышение флуоресценции DCF и JC-1.

Обсуждение. Известно, что температурное воздействие, как повышенными, так и низкими температурами вызывает в клетках растений повышение генерации АФК [Qu et al., 2013; Zhu et al., 2007]. К такому же эффекту может приводить обработка некоторыми гербицидами [Chen et al., 2015; Pazmino et al., 2011]. Действительно, повышение генерации АФК в клетках растений наблюдалось при действии теплового шока и холодного шока, а также при воздействии гербицида диурана (рисунок). В клетках растений описаны различные механизмы генерации АФК. АФК могут образовываться за счет функционирования НАДФН-оксидаз плазматической мембраны, хлоропластов, пероксисом [Mittler et al., 2011; Møller, 2001]. Митохондрии растительной клетки также являются важным источником образования АФК [Møller, 2001]. Принято считать, что усиление продукции АФК митохондриями наблюдается в результате нарушения функционирования митохондриальной электрон-транспортной цепи, в результате отдельные компоненты цепи перевосстанавливаются, что и является причиной генерации АФК. Нарушение функционирования цепи, как правило, приводит к снижению ММП. Поэтому снижение ММП часто сопровождается повышением продукции АФК митохондриями [Rhoads et al., 2006; Skulachev, 1998]. Однако это правило не всегда выполняется. Известны случаи, когда в клетках растений наблюдается одновременное усиление продукции АФК и повышение ММП [Sun et al., 2012; Федяева и др., 2014; Lyubushkina et al., 2014]. Действительно, при повышении продукции АФК в клетках растений при действии теплового и холодного шока, а также при обработке диуроном наблюдалось одновременное повышение ММП и уровня АФК (рисунок).

Зависимость между повышением генерации АФК и изменением митохондриального потенциала указывает на то, что, во-первых, при действии исследуемых стрессовых ситуаций наблюдается усиление продукции именно митохондриальных АФК, а во-вторых, повышение ММП в данных условиях является причиной усиления продукции АФК. Предполагается, что повышение ММП может быть следствием либо повышения уровня восстановленных эквивалентов, таких как НАДН и НАДФН, либо нарушением способности внутренней митохондриальной мембраны проводить протоны в матрикс в результате нарушения функционирования FoF₁-АТР-синтазы или нарушения транспорта АДФ в митохондрии. Следует отметить, что повышение ММП в нашем случае наблюдалось только на ранних этапах стрессового воздействия (данные не приведены). Можно предположить, что на ранних этапах наблюдается прямая связь между повышением ММП и продукцией АФК, то есть повышение ММП стимулирует продукцию АФК, а на более поздних этапах – обратная, продукцию АФК стимулирует снижение ММП.

В нашей работе показано, что стрессоры различной природы вызывают как изменение потенциала на внутренней митохондриальной мембране, так и повышение генерации АФК. Таким образом, полученные нами данные позволяют предположить, что наблюдаемые явления являются индикаторами стрессового состояния растения.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН (г. Иркутск).

Литература

- Федяева А.В., Степанов А.В., Любушкина И.В., Побежимова Т.П., Рихванов Е.Г. Тепловой шок индуцирует продукцию активных форм кислорода и повышает потенциал на внутренней митохондриальной мембране в клетках озимой пшеницы // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 11. – С. 1476–1486.
- Chen Z.W., Chen H., Zou Y.Q., Qiu J.G., Wen Y.Z., Xu D.M. Are nutrient stresses associated with enantioselectivity of the chiral herbicide imazethapyr in *Arabidopsis thaliana*? // J. Agric. Food Chem. – 2015. – V. 63, No. 47. – P. 10209–10217.
- Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant physiology and biochemistry. – 2010. – V. 48, No. 12. – P. 909–930.
- Lyubushkina I.V., Grabelnykh O.I., Pobezhimova T.P., Stepanov A.V., Fedyaeva A.V., Fedoseeva I.V., Voinikov V.K. Winter wheat cells subjected to freezing temperature undergo death process with features of programmed cell death // Protoplasma. – 2014. – V. 215. – P. 615–623.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. ROS signaling: the new wave? // Trends Plant Sci. – 2011. – V. 16, No. 6. – P. 300–309.
- Møller I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron Transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2001. – V. 52. – P. 561–591.
- Pazmiño D.M., Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M.C., Archilla-Ruiz A., Del Río L.A., Sandalio L.M. Differential response of young and adult leaves to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pea plants: role of reactive oxygen species // Plant Cell Environ. – 2011. – V. 34, No. 11. – P. 1874–1889.
- Rhoads D.M., Umbach A.L., Subbaiah C.C., Siedow J.N. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling // Plant Physiol. – 2006. – V. 141, No. 2. – P. 357–366.
- Skulachev V.P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. – V. 1363, No. 2. – P. 100–124.
- Sun J., Zhang C.L., Deng S.R., Lu C.F., Shen X., Zhou X.Y., Zheng X.J., Hu Z.M., Chen S.L. An ATP signalling pathway in plant cells: extracellular ATP triggers programmed cell death in *Populus euphratica* // Plant Cell Environ. – 2012. – V. 35, No. 5. – P. 893–916.
- Vianello A., Zancani M., Peresson C., Petrusa C., Casolo V., Krajnakova J., Patui S., Braidot E., Macri F. Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death // Physiologia Plantarum. – 2007. – V. 129. – P. 242–252.
- Qu A.L., Ding Y.F., Jiang Q., Zhu C. Molecular mechanisms of the plant heat stress response // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2013. – V. 432, No. 2. – P. 203–207.
- Zhang L., Li Y., Xing D., Gao C. Characterization of mitochondrial dynamics and subcellular localization of ROS reveal that HsfA2 alleviates oxidative damage caused by heat stress in *Arabidopsis* // J Exp Bot. – 2009. – V. 60. – P. 2073–2091.
- Zhu J., Dong C.H., Zhu J.K. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation // Curr. Opin. Plant Biol. – 2007. – V. 10, No. 3. – P. 290–295.

MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL AND REACTIVE OXYGEN SPECIES, AS INDICATORS OF STRESS STATUS OF PLANTS

A.V. Fedyaeva¹, I.V. Lyubushkina^{1,2}, A.V. Stepanov¹, Y. Li³, A.V. Sidorov^{1,4}, E.G. Rikhvanov¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *fedyaeva.anna@mail.ru*

²Irkutsk State University, Irkutsk, Russia, *ostrov1873@yandex.r*

³Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Irkutsk State Agricultural University named after A.A. Ezhevsky», Irkutsk region, Molodezhny settlement, Russia, *li05161020@163.com*

⁴Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Irkutsk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Irkutsk, Russia *a_v_sidorov@mail.ru*

Abstract. Reactive oxygen species production is activated in response to different stress factors. Heat shock and cold shock as well as treatment by diuron herbicide was shown to led to simultaneous increase in ROS production and mitochondrial membrane potential level in plant cells. It was supposed that these phenomena are indicators of the stress situation in plant.

Keywords: *reactive oxygen species, mitochondrial potential*