

УЧАСТИЕ МИТОХОНДРИЙ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ В РАЗВИТИИ ГИБЕЛИ ПРИ ОБРАБОТКЕ ДИУРОНОМ

А.В. Федяева¹, И. Ли², И.В. Любушкина^{1,3}, А.В. Сидоров^{1,4}, Е.Г. Рихванов¹

¹ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, e-mail: fedyaeva.anna@mail.ru

²ФГБОУ ВО Иркутский государственный аграрный университет им. А.А. Ежевского, Иркутская обл., пос. Молодёжный, e-mail: li05161020@163.com

³ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск, e-mail: ostrov1873@yandex.r

⁴ФГБОУ ВО Иркутский государственный медицинский университет Минздрава России, Иркутск, e-mail: a_v_sidorov@mail.ru

Известно, что митохондрии клеток растений являются одним из основных сайтов продукции активных форм кислорода (АФК) (Møller, 2001). Митохондрии принимают участие в развитии устойчивости клетки к стрессовому воздействию (Huang et al., 2016), либо при сильном действии стресса вовлечены в регуляцию клеточной гибели (Yao et al., 2004). Гербициды могут оказывать фитотоксичный эффект за счет их влияния на митохондрии (Palmeira et al., 1994). Гербицид диурон является ингибитором транспорта электронов. Ранее было показано (Федяева и др, 2014), что тепловой шок приводит в культуре клеток озимой пшеницы к увеличению митохондриального мембранного потенциала (ММП) и повышению АФК, более того, наблюдалась связь между этими процессами.

В связи с чем целью настоящего исследования было изучить влияние диурона на жизнеспособность культуры клеток арабидопсиса, а также оценить его влияние на изменение АФК, митохондриального мембранного потенциала и выявить связь между этими явлениями.

Материалы и методы

В работе использовали гетеротрофную суспензионную культуру клеток арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*). В культуру клеток добавляли диурон (200 мкМ) и инкубировали 1, 24 и 48 ч. Жизнеспособность клеток оценивали с использованием флуоресцентных красителей: FDA и PI. Изменение уровня АФК определяли с использованием флуоресцентного красителя H₂DCF • DA. Определение ММП оценивали по флуоресценции красителя JC-1. Работа проводилась с использованием флуоресцентного микроскопа Axio Observer Z1. Опыты повторяли не менее 3 раз. Полученные данные были обработаны статистически, приведены среднеарифметические значения и стандартные ошибки.

Результаты

Сначала необходимо было оценить влияние гербицида диурона на жизнеспособность культуры клеток арабидопсиса. Динамика инкубации клеток с диуроном показала, что происходило снижение числа живых клеток (рис. 1, а). Через 1 ч после воздействия агента жизнеспособность составляла 60 %, спустя 24 ч – 40%. Гибель почти всех клеток происходила в конце эксперимента (48 ч). Параллельная оценка морфологии клеток показала, что увеличения числа конденсированных клеток не происходило через 1 ч после воздействия диурона, но повышение степени конденсации наблюдалось через 24 и 48 ч инкубации до 24 и 55 %, соответственно (рис. 2, б).

Затем проводилась оценка влияния диурона на развитие окислительного стресса и изменение ММП. Повышение уровня АФК в культуре клеток арабидопсиса происходило только через 1 ч после воздействия диуроном (рис. 1, в). Сходные данные получены

при измерении ММП. Как показано на рис 1, *з*, повышение ММП регистрировалось только у клеток арабидопсиса, которые инкубируются с диуроном в течение 1 ч.

Таким образом, обработка гербицидом диуроном приводит к кратковременному повышению потенциала на внутренней митохондриальной мембране и к развитию окислительного стресса, что сопровождается гибелью клеток, имеющей признак программируемой клеточной гибели (ПКГ).

Обсуждение

Известно, что гербицид диурон является токсичным агентом для клеток растений (Chesworth et al., 2004), животных (Bouilly et al., 2007) и человека (Huovinen et al., 2015). Используемая в данной работе концентрация диурона, вызывала гибель клеток (рис. 1а), что сопровождалось конденсацией протопласта (рис. 1, б), одним из параметров ПКГ (Affenzeller et al., 2009). Поэтому можно предполагать, что обработка диуроном вызывает гибель клеток по типу ПКГ. Другим признаком ПКГ является развитие в клетке окислительного стресса. Как показано в данной работе, сразу после воздействия гербицидом происходило повышение уровня АФК (рис. 1, в). Полученные данные согласуются с результатами других работ, свидетельствующих, что диурон приводит к развитию окислительного стресса в клетках животных (Huovinen et al., 2015) и повышению активности ферментов антиоксидантной защиты в клетках растений (Jin et al., 2017).

Одним из сайтов продукции АФК являются митохондрии (Møller, 2001). Ранее нами было показано, что холодовое и тепловое воздействие приводит к увеличению и одновременному повышению АФК. Более того, наблюдалась зависимость между этими процессами (Lyubushkina et al., 2013; Федяева и др., 2014). Подобная зависимость наблюдалась и в данной работе. Кратковременная обработка диуроном повышала ММП в клетках арабидопсиса, параллельно наблюдалось усиление продукции АФК (рис. 1, *з*). Данные, полученные с использованием диурона, подтверждают причинно-следственную связь между повышением ММП и продукцией АФК.

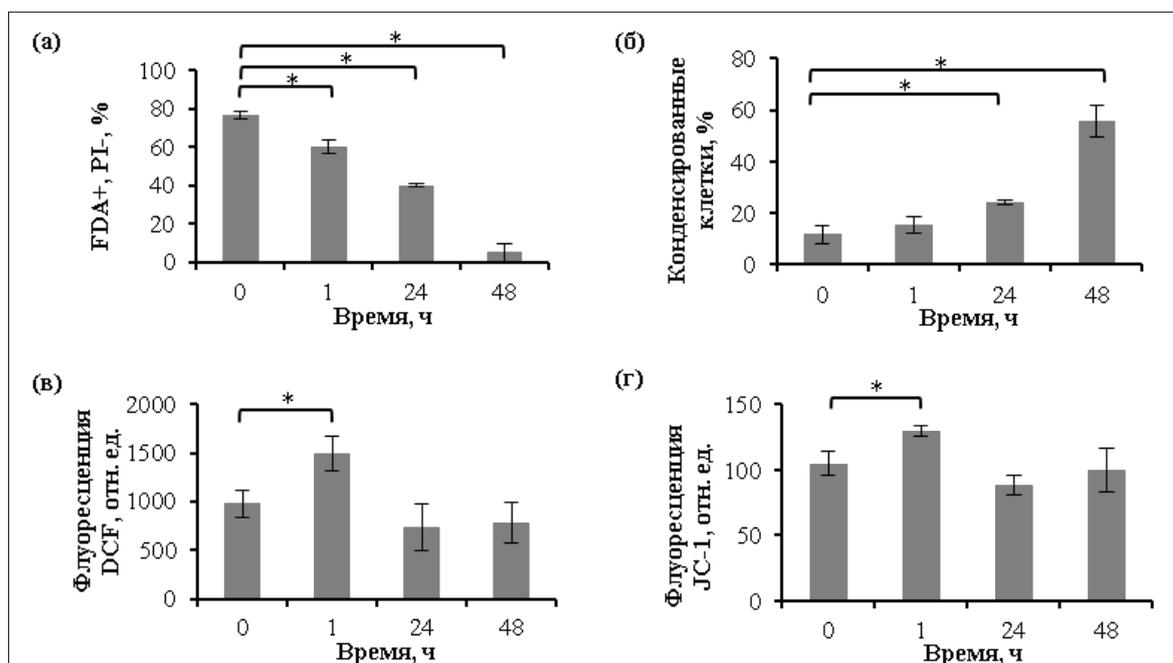


Рис. 1. Временная динамика изменения жизнеспособности (а), конденсации протопласта (б), активных форм кислорода (в), митохондриального мембранного потенциала в культуре клеток арабидопсиса после воздействия гербицида диурона (200 мкМ) в течение 1, 24 и 48 ч.

Количественный обсчет клеток. $n = 3$, $M \pm S.E.$ * – достоверные различия по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Повышение АФК до критического уровня может иметь отрицательный эффект на жизнеспособность. Поэтому одной из вероятных причин фитотоксического эффекта диурона является его способность вызывать окислительный взрыв в митохондриях растений в результате повышения ММП.

Коллектив авторов выражает благодарность за помощь в научной работе А.В. Степанову.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Литература

Федяева А.В., Степанов А.В., Любушкина И.В., Побежимова Т.П., Рихванов Е.Г. Тепло-вой шок индуцирует продукцию активных форм кислорода и повышает потенциал на внутренней митохондриальной мембране в клетках озимой пшеницы // Биохимия. – 2014. – Т. 79. – С. 1476–1486.

Affenzeller M.J., Darehshouri A., Andosch A., Lütz C., Lütz-Meindl U. Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Micrasterias denticulate* // J Exp Bot. – 2009. – V. 60. – P. 939–954.

Bouilly K., Bonnard M., Cagnaire B., Renault T., Lapègue S. Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in pacific oyster, *Crassostrea gigas* // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 2007. – V. 52. – P. 58–63.

Chesworth J.C., Donkin M.E., Brown M.T. The interactive effects of the antifouling herbicides Irgarol 1051 and Diuron on the seagrass *Zostera marina* (L.) // Aquat Toxicol. – 2004. – V. 66. – P. 293–305.

Huang S., Van Aken O., Schwarzländer M., Belt K., Millar A.H. The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants // Plant Physiol. – 2016. – V. 171. – P. 1551–1559.

Huovinen M., Loikkanen J., Naarala J., Vähäkangas K. Toxicity of diuron in human cancer cells // Toxicol In Vitro. – 2015. – V. 29. – P. 1577–1586.

Jin Y., Chen S., Fan X., Song H., Li X., Xu J., Qian H. Diuron treatment reveals the different roles of two cyclic electron transfer pathways in photosystem II in *Arabidopsis thaliana* // Pestic Biochem Physiol. – 2017. – V. 137. – P. 15–20.

Lyubushkina I.V., Grabelnych 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. 251. – P. 615–623.

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.

Palmeira C.M., Moreno A.J., Madeira V.M. Interactions of herbicides 2,4-D and dinoseb with liver mitochondrial bioenergetics // Toxicol Appl Pharmacol. – 1994. – V. 127. – P. 50–57.

Yao N., Eisfelder B.J., Marvin J., Greenberg J.T. The mitochondrion – an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* // The Plant Journal. – 2004. – V. 40. – P. 596–610.