

**Российская академия наук
Общество физиологов растений России
Научный совет по проблемам физиологии растений и фотосинтезу РАН
Институт биологии Карельского научного центра РАН
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
Институт леса Карельского научного центра РАН
Петрозаводский государственный университет**

VIII СЪЕЗД ОБЩЕСТВА ФИЗИОЛОГОВ РАСТЕНИЙ РОССИИ

**РАСТЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ГЛОБАЛЬНЫХ И ЛОКАЛЬНЫХ
ПРИРОДНО-КЛИМАТИЧЕСКИХ И АНТРОПОГЕННЫХ
ВОЗДЕЙСТВИЙ**

**Всероссийская научная конференция с международным участием
и школа для молодых ученых
(Петрозаводск, 21-26 сентября 2015 г.)**

Тезисы докладов

**Петрозаводск
2015**

РАЗВИТИЕ НЕКОТОРЫХ СИМПТОМОВ ЗАПРОГРАМИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В КОРНЕ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ В ОТВЕТ НА АБИОТИЧЕСКИЕ СТРЕСС-ФАКТОРЫ

The development of programmed cell death symptoms in roots of higher plants in response to abiotic stresses

Мацкевич В.С.¹, Звонарев С.Н.¹, Кирисюк Ю.В.², Демидчик В.В.¹

¹ Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь; dzemidchyk@bsu.by

² Брестский государственный университет, Брест, Беларусь

Запрограммированная клеточная гибель (ЗКГ) - важнейший физиологический процесс у всех эукариот, играющий основополагающую роль в развитии и выживании многоклеточных организмов. Хорошо известна функция ЗКГ в качестве защитного механизма при биотическом стрессе, однако развитие ЗКГ, особенно в клетках корня, при абиотических воздействиях изучено слабо. Целью настоящей работы было апробирование подходов анализа морфологических симптомов ЗКГ, изменения жизнеспособности клеток, синтеза активных форм кислорода (АФК), а также активации протеаз ЗКГ в трихобластах и атрихобластах эпibleмы *Arabidopsis thaliana* L. Neunh. при обработке NaCl, Ni²⁺ и смесями, генерирующими гидроксильные радикалы (1 mM CuCl₂, L-аскорбиновая кислота и H₂O₂). Тесты проводились на растениях дикого типа (WS), а также нокаутах *gork1-1* (GORK1) и *rhd2-1* (RBOHC), лишенных наружу-выпрямляющего K⁺-канала и функциональных НАДФН-оксидазы С, соответственно. K⁺-канал GORK1 является основной системой, катализирующей выход K⁺ из клеток корня в различных физиологических состояниях, включая стрессовые. НАДФН-оксидазы ответственны за Ca²⁺-зависимую генерацию супероксидного радикала и других АФК при стрессе и росте клетки удлинением.

Среди адаптированных в настоящей работе тестов ЗКГ ризодермы наибольшую чувствительность продемонстрировали морфологические тесты (конденсация протоплазмы, образование темных телец, повреждение плазматической мембраны и т.д.), а также оценка активности каспазоподобных протеаз (CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker; Promega). Оценка жизнеспособности с использованием Evans Blue и флуоресцеиндиацетата показала высокую чувствительность в случае оксидативного стресса и NaCl (150-400 mM), но не давала достоверных отличий по сравнению с контролем в случае Ni²⁺ (0,1-5 mM). Оксидативный стресс индуцировал морфологические симптомы ЗКГ и активацию протеаз в ризодерме, прогрессирующие в течение 2 сут и приводящие к практически полному отмиранию данной ткани. Доля клеток с симптомами ЗКГ была выше у растений дикого типа, чем у растений *gork1-1* и *rhd2-1*. Это указывает на вовлечение белковых продуктов генов *gork1-1* и *rhd2-1* в развитие ЗКГ в корне. Стресс, вызываемый летальной концентрацией Ni²⁺, приводил к прогрессирующим морфологическим изменениям внутри клетки, характерным для ЗКГ, и индукции протеаз. Эти процессы развивались медленнее у *gork1-1*, однако не показывали достоверного отличия у растений *rhd2-1*. Засоление (400 mM NaCl) приводило к быстрому развитию морфологических и биохимических признаков ЗКГ, которые проявлялись слабее у растений *rhd2-1*. Ионы гадолиния (блокатор Ca²⁺-каналов) подавляли развитие симптомов ЗКГ в ответ на оксидативный стресс и Ni²⁺. Это свидетельствует об участии Ca²⁺-проницаемых катионных каналов в развитии ЗКГ в эпibleме. Ионы тетраэтиламмония (блокатор K⁺-каналов) в значительной степени снижали скорость развития симптомов ЗКГ при оксидативном стрессе и в меньшей степени при засолении, однако они проявляли незначительное действие по отношению к избытку Ni²⁺. Тиомочевина, представляющая собой агент, устраняющий гидроксильные радикалы, резко снижала скорость появления симптомов ЗКГ при оксидативном стрессе и воздействии избытка Ni²⁺. Корневые волоски демонстрировали большую скорость развития симптомов ЗКГ при абиотических стрессовых воздействиях, чем зрелые атрихобласты. Развитие симптомов ЗКГ коррелировало с синтезом АФК (анализ по накоплению флуоресценции дигирозидиума).

В настоящей работе было установлено, что в большинстве случаев у растений дикого типа развитие симптомов ЗКГ происходит быстрее, чем у растений *gork1-1* и *rhd2*, лишенных функционального наружу-проводящего K⁺-канала и основной системы синтеза экзогенных АФК (НАДФН-оксидазы типа С) в корне, соответственно. Кроме того, блокаторы катионных каналов снижали долю клеток, имеющих симптомы ЗКГ, в особенности, в случае влияния оксидативного стресса. Таким образом, можно предложить следующую последовательность ранних стадий ЗКГ, вовлекающих системы плазматической мембраны клеток ризодермы: 1) рецепция на уровне ионных каналов или деполяризация (при засолении) вызывает вход Ca²⁺, приводящий к активации НАДФН-оксидаз, генерирующих АФК; 2) Ca²⁺-проницаемые каналы дополнительно активируются АФК; 3) наружу-проводящие K⁺-каналы активируются деполяризацией и АФК; 4) K⁺- и Ca²⁺-зависимые каспазоподобные протеазы начинают разрушение структурных белков и ферментов. Данные, приведенные в настоящей работе показывают, что регуляция и контроль развития ЗКГ может также осуществляться на уровне биосинтеза гидроксильного радикала (эффект тиомочевины).