

УДК 577.123:612.014.43

## ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА БИОСИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ *Polyscias filicifolia* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ТЕМПЕРАТУР

© 2011 г. Н. В. Кириллова, Ю. В. Белых, А. И. Спасенков

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург, 197376

e-mail: [biochem@spcra.ru](mailto:biochem@spcra.ru)

Поступила в редакцию 20.07.2010 г.

В клетках культуры ткани *Polyscias filicifolia*, выращенных на модифицированной среде Мурасиге–Скуга, в присутствии салициловой кислоты возрастало содержание как ДНК, так и РНК (от 20 до 50%). Обработка культуры ткани салициловой кислотой приводила к достоверному повышению содержания внутриклеточного белка и снижению общей протеолитической активности. В обработанных салициловой кислотой клетках содержание ДНК и РНК было выше как в условиях теплового (3 ч, 45°C), так и холодного (24 ч, 7°C) стресса по сравнению с клетками, подвергнутыми воздействию неблагоприятных температур без предварительной обработки салициловой кислотой.

Известно, что растения более зависимы от климатических условий по сравнению с животными, поэтому ответные реакции растительных клеток на температурный стресс занимают особое место среди механизмов адаптации растений к неблагоприятным условиям их среды обитания. В ответ на воздействие неблагоприятных температур, как правило, происходит общее снижение метаболической и функциональной активности клеток растений [1, 2]. В то же время установлено, что предобработка растительных тканей салициловой кислотой (СК) нивелирует неблагоприятные для жизни растения последствия воздействий как биотических, так и абиотических факторов. Показано, что СК участвует в сложных взаимодействиях сигнальных систем, индуцирующих развитие адаптации растительных клеток к неблагоприятным условиям среды, и, тем самым, способствует их выживанию [2–4]. Однако проявление защитных функций СК зависит от многих факторов, в том числе ответная реакция на воздействие СК может различаться у различных растений, а иногда переходить в свою противоположность – индукцию восприимчивости болезни [3–7]. Поэтому роль СК в патогенезе растений и при стрессе в настоящее время представляется достаточно сложной и противоречивой.

В настоящее время культивируемые растительные ткани широко используются в качестве адекватной модели для изучения на клеточном уровне адаптации растений к различным неблагоприятным воздействиям окружающей среды. Преимущество культивируемых растительных тканей заключается в том, что они выращиваются в строго контролируемых условиях и существуют в автономном режиме, в отсутствие характерных для интактного растения метаболических связей, а также фитогормональной регуляции, поэтому интерпретация от-

ветных реакций растительных клеток на строго определенные воздействия конкретного фактора окружающей среды может быть более однозначной. В связи с этим применение культур тканей растений позволяет изучить метаболические процессы, протекающих в клетке, с целью их практического применения. [8].

Культуры растительных клеток являются объектом биотехнологии для получения целевых продуктов [9], в частности, штамм тропического растения *Polyscias filicifolia* был введен в культуру изолированных тканей *in vitro* как обладающий высокой биологической активностью [10]. Дальнейшие исследования показали, что фармакологические препараты, полученные из биомассы данной культуры ткани, обладали адаптогенной, иммуномодулирующей, тонизирующей и стресспротекторной активностями [11].

Цель работы – изучение влияния СК на содержание ДНК и РНК в клетках культуры ткани *Polyscias filicifolia*, выращенных в стандартных условиях, а также сочетанное воздействие СК и высоко- или низкотемпературных шоков.

### МЕТОДИКА

Объектом изучения служила культура ткани растения полисциас папоротниковолистный *Polyscias filicifolia* (Moore ex Fournier) Bailey (сем. Araliaceae) в процессе ее длительного культивирования на модифицированной агаризованной среде Мурасиге и Скуга [12, 13] в темноте при  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , относительной влажности воздуха 70%, с циклом культивирования 30–35 сут (один пассаж). После этого разрыхленную культуру ткани весом около 5 г пересаживали на свежую питательную среду объемом 70 мл. В работе ис-

пользовали культуру ткани 20-суточного возраста, отобранную из 5–7 сосудов одного пассажа, повторности опытов – 5–6 пассажей. Навески ткани гомогенизировали в ступке на холоду с 0.05 М фосфатным буфером (рН 7.8) в соотношении 0.5 мл буфера/г сырой массы в присутствии 0.05 мл 3%-ного тритона X-100. Полученный гомогенат оставляли в течение 30 мин при 4°C, затем центрифугировали в течение 3 мин при 12000 g. Осадок отбрасывали, а в супернатанте определяли белок по методу Лоури. Оценку общей протеиназной активности проводили по приросту свободных аминокислот после предварительного осаждения белков из проб трихлоруксусной кислотой [14].

Холодовой и тепловой стрессы моделировали следующим образом: культуру ткани полисиас 20-суточного возраста подвергали высоко- (3 ч при 45°C) и низкотемпературной (24 ч при 7°C) обработке, что составляло  $\pm 19^\circ\text{C}$  по сравнению со стандартной температурой культивирования. Выбранные температурные режимы широко используются при изучении влияния температурных стрессов на растительные ткани [15–17].

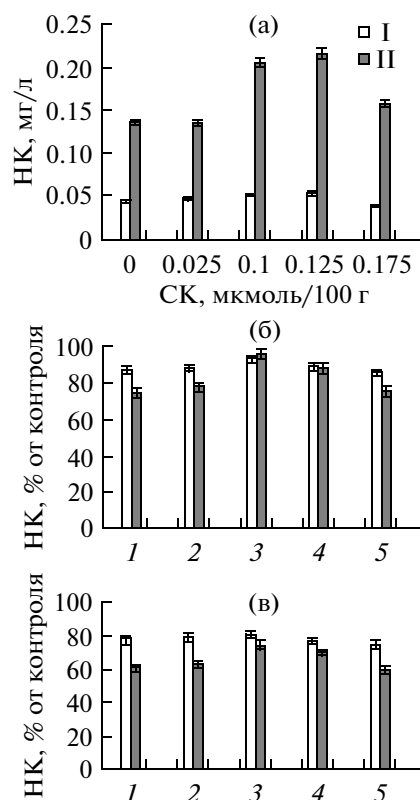
Спектрофотометрическое количественное определение РНК и ДНК проводили по методикам, описанным ранее [18]. Непременным условием использованных методик является удаление пигментов, а также кислоторастворимого и липидного фосфора.

Стерильные исходные 0.05 мМ растворы СК вносили в асептических условиях в каллусы 20-суточного возраста. Через 24 ч после выдерживания культуры в стандартных условиях выращивания оценивали уровень содержания нуклеиновых кислот и белка в растительных клетках по сравнению с контрольными образцами. Во второй серии опытов культивируемые клетки после их предобработки СК подвергали температурному стрессу, как описано выше, и также рассчитывали содержание нуклеиновых кислот и внутриклеточного белка. В клетках культуры ткани, выращенной в стандартных условиях, содержание нуклеиновых кислот принимали за 100%.

Представленные в данной работе данные обрабатывали статистически. Результаты выражали в средних значениях со стандартным отклонением (SD). Для оценки различий между экспериментальными данными использовали критерий – непарный *t*-тест Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне вероятности  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

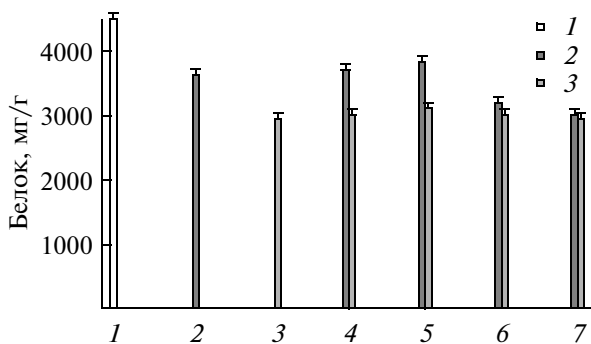
Данные о содержании ДНК и суммарного пула РНК в клетках культуры ткани полисиас, выращенных в стандартных условиях и в присутствии экзогенной СК, приведены на рис. 1а. В работе использовали СК в низких концентрациях, которые, как правило, применяются при изучении регулятор-



**Рис. 1.** Влияние СК на содержание ДНК (I) и РНК (II) в контроле (а), при высокой (б) и низкой (в) температурах. Воздействие неблагоприятных температур (1), совместное влияние температуры и СК в концентрациях 0.025 (2), 0.1 (3), 0.125 (4) и 0.175 (5)  $\mu\text{mol}/100\text{g}$  сырой биомассы.

ной функции экзогенного салицилата в растительных объектах ( $10^{-7}$ – $10^{-9}$  М) [19–21]. Как видно из представленных данных, в культивируемых клетках культуры полисиас, выращенных в среде в присутствии СК, достоверно повышалось содержание ДНК и РНК по сравнению с контролем.

Наименьший эффект на содержание нуклеиновых кислот СК оказывала в концентрации 0.175  $\mu\text{mol}/100\text{g}$  культивируемых клеток. Воздействие СК на растительные ткани, по мнению ряда авторов [4, 6, 22, 23], обусловлено, прежде всего, ее индукцией на гены транскрипционных факторов, отвечающих за экспрессию соответствующих генов совместно с NO, липоксигеназной и другими сигнальными системами растительных клеток. Подтверждением этого являются исследования, в которых достоверно установлено повышение содержания ряда мРНК в присутствии экзогенной СК в клетках растений. Данные мРНК, как было установлено, кодировали соответствующие транскрипционные факторы и некоторые другие белки, отвечающие в растениях за процессы адаптации к неблагоприятным условиям среды [2, 4, 22–25].



**Рис. 2.** Влияние СК на содержание белка в условиях температурного стресса; контроль (1), тепловой (2) и холодной (3) стрессы, совместное влияние неблагоприятных температур и СК в концентрациях 0.025 (4), 0.1 (5), 0.125 (6) и 0.175 (7) мкмоль/100 г сырой биомассы.

Известно, что по содержанию ДНК в клетке можно косвенно судить о митотической активности культивируемых клеток. Ранее нами было установлено, что воздействие высоких и низких положительных температур на пролиферативную активность культуры ткани полисциас сопровождается достоверным уменьшением в клетках содержания ДНК и РНК [26]. Анализ полученных в данной работе результатов показал, что содержание ДНК и суммарного пула РНК в клетках полисциас после совместного воздействия неблагоприятных температур и СК было ниже контрольных значений, однако эти показатели были выше, чем в культивируемых растительных клетках, предварительно необработанных СК. Результаты проиллюстрированы на рис. 1б, 1в. Как видно из представленных данных, наиболее выраженный эффект на пролиферативную активность в условиях теплового шока и воздействия низких положительных температур оказывали концентрации СК в 0.1 мкмоль/100 г сырой биомассы. Несмотря на то, что в преобработанных СК клетках содержание ДНК было на 9–10% ниже контрольных значений, однако этот показатель был на 5–6% выше по сравнению с содержанием ДНК в необработанных СК клетках. Более низкие концентрации экзогенной СК (0.025 мкмоль/100 г сырой биомассы) практически не вызывали существенных изменений в содержании нуклеиновых кислот в стрессовых условиях по сравнению с клетками, необработанными СК. Повышение концентрации СК в среде культивирования до 0.175 мкмоль/100 г сырой биомассы приводило к снижению содержания нуклеиновых кислот в каллусной ткани полисциас. При этом воздействие неблагоприятных температур вызывало снижение содержания нуклеиновых кислот не только по сравнению с контролем, но и на 2–3% по сравнению с клетками, необработанными СК.

Данные о влиянии СК на содержание нуклеиновых кислот, как было установлено нами ранее [27],

коррелировали с результатами, характеризующими концентрацию общего белка в культивируемых клетках полисциас в ее присутствии. В частности, было показано, что внесение в среду культивирования СК (до 0.1 мкмоль/100 г сырой биомассы) сопровождалось достоверным повышением содержания белка в растительных клетках. В работах других авторов с использованием растительных объектов также были получены сопоставимые с нашими результаты о влиянии СК на содержание белка в клетках [28, 29]. В частности, было установлено повышение его содержания в ткани клубней картофеля на 55% по отношению к контролю уже через 5 ч после обработки дисков композицией, содержащей СК [30]. Однако в ряде работ было выявлено снижение содержания белков в растительных клетках при действии СК [21, 30]. В связи с неоднозначным влиянием СК на различные растительные объекты к настоящему времени у исследователей нет единого мнения об универсальности действия СК, более того, полагают, что характер ее воздействия у разных растений при стрессе может сильно различаться [20].

Повышение уровня белка в растительных клетках может быть обусловлено влиянием СК на активность протеаз. Однако проведенное нами ранее определение общей протеиназной активности в культуре ткани полисциас показало достоверное повышение общей протеолитической активности в клетках в присутствии СК [27]. Полученные результаты не противоречат данным литературы. Так, другими исследователями было установлено возрастание в присутствии СК целого ряда протеиназ за счет, как предположили авторы, индукции биосинтеза ферментов и/или регуляции их процессинга [31, 32]. Кроме того, имеются данные о репрессии СК генов, кодирующих ингибиторы протеиназ [33].

Таким образом, как было показано нами ранее, изменение протеолитической активности в культивируемых клетках при воздействии СК не коррелировало с уровнем внутриклеточного белка [27]. Содержание общего белка в клетках, как известно, определяется соотношением скоростей его биосинтеза и распада и всегда меняется при изменении любой из этих двух величин. Поэтому увеличение уровня общего белка в клетках может быть обусловлено как замедлением скорости его распада, так повышением скорости его биосинтеза. В частности, было установлено, что обработка СК и жасмонатом листьев гороха повышала уровень биосинтеза белка, а именно, обработка СК листьев гороха приводила к увеличению включения  $^{14}\text{C}$ -аминокислот в полипептиды с молекулярными массами 90, 64, 57, 38, 32, 25 и 18 кДа [28].

Данные о сочетанном влиянии СК и неблагоприятных температур на содержание внутриклеточного белка представлены на рис. 2. Из полученных результатов видно, что наиболее выраженный эффект на содержание белка оказывала СК также в концентрации

0.1 мкмоль на 100 г сырой биомассы. Обработка экзогенной СК культивируемых клеток в концентрациях 0.025 и 0.1 мкмоль на 100 г сырой биомассы увеличивала в них содержание внутриклеточного белка при воздействии высоких и низких положительных температур по сравнению с необработанными СК клетками. Повышение концентрации СК до 0.125–0.175 мкмоль на 100 г сырой биомассы вызывало противоположное действие, а именно резкое снижение содержания внутриклеточного белка в преобработанных СК клетках по сравнению не только с контролем, но и клетками, выращенными без СК.

Таким образом, в данном исследовании было установлено, что обработка салициловой кислотой культуры ткани *Polyscias filicifolia* приводит к изменению содержания нуклеиновых кислот и суммарного белка в растительных клетках полисциас, культивируемых как в стандартных условиях, так и при воздействии неблагоприятных температур. При сочетанном воздействии салициловой кислотой и неблагоприятных температур уровень нуклеиновых кислот оставался выше по сравнению с их концентрацией в культуре клеток, подвергнутых воздействию неблагоприятных температур, без предварительной обработки салициловой кислотой. Проведенное исследование позволяет дополнить общую картину ответных реакций растительных клеток, отражающих структурно-функциональную перестройку в растениях при стрессе.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Тарчевский И.А.* Катаболизм и стресс у растений. М.: Наука, 1993. 80 с.
2. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с.
3. *Васюкова Н.И., Герасимова Н.Г., Озерецковская О.Л.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1999. Т. 35. № 5. С. 557–563.
4. *Shilpi M., Sudhir K.S., Narendra T.* // FEBS J. 2006. V. 273. № 5. P. 907–925.
5. *Kang H.M., Salveit M.E.* // Physiol. Plant. 2002. V. 115. № 4. P. 571–576.
6. *Raskin I.* // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1992. V. 43. P. 439–463.
7. *Rock C.D.* // New Phytol. 2000. V. 148. № 3. P. 357–396.
8. *Носов А.М.* // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 6. С. 837–844.
9. *Бурьянов Я.И.* // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 6. С. 930–944.
10. *Слепян Л.И., Арнаутов Н.И., Грушвицкий И.В.* // Растительные ресурсы. 1975. Т. 11. № 2. С. 198–204.
11. *Трилис Я.Г., Давыдов В.В.* // Растительные ресурсы. 1995. Т. 31. № 3. С. 19–35.
12. *Murachige T., Skoog F.* // Physiol. Plantarum. 1962. V. 15. № 5. P. 473–497.
13. *Писецкая Н.Ф.* // Растительные ресурсы. 1970. Т. 6. № 4. С. 516–522.
14. *Barret A.J., Kirschke H., Cathepsin H., Cathepsin L.* // Methods of Enzymology: Proteolytic Enzymes / Ed. L. Lorand. N.-Y.: Acad. Press, 1981. V. 80. P. 535–561.
15. *Foyer C.H., Lopez-Delgado H., Dat J.F., Scott I.M.* // Physiol. Plant. 1997. V. 100. № 2. P. 241–254.
16. *Bowler C., Montagu M.V., Inze D.* // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1992. V. 43. P. 83–116.
17. *Dat J.F., Lopez-Delgado H., Foyer C.H., Scott I.M.* // Plant Physiol. 1998. V. 116. № 3. P. 1351–1357.
18. Методы биохимического исследования растений / Ред. А.И. Ермаков. Л.: Наука, 1972. С. 325–327.
19. *Васюкова Н.И., Герасимова Н.Г., Озерецковская О.Л.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1999. Т. 35. № 5. С. 557–563.
20. *Валуева Т.А., Ревина Т.А., Гвоздева Е.Л., Герасимова Н.Г., Ильинская Л.И., Озерецковская О.Л.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 5. С. 601–606.
21. *Максютова Н.Н., Галеева Е.И.* // Биохимия. 2005. Т. 70. № 3. С. 390–396.
22. *Сахабутдинова А.Р., Фатхутдинова Д.Р., Шакирова Ф.М.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 5. С. 579–583.
23. *Overmyer K., Brosché M., Pellinen R., Kuittinen T., Tuominen H., Ahlfors R., Keinänen M., Saarma M., Scheel D., Kangasjärvi J.* // Plant Physiol., 2005. V. 137. № 3. P. 1092–1104.
24. *Тарчевский И.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 5. С. 441–449.
25. *Молодченкова О.О., Адамовская В.Г., Левицкий Ю.А., Гонтаренко О.В., Соколов В.М.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 4. С. 441–446.
26. *Кириллова Н.В., Спасенков А.М., Спасенкова О.М., Стрелкова М.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 3. С. 292–296.
27. *Белых Ю.В., Кириллова Н.В., Спасенков А.И.* // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2009. Сер. 3. № 2. С. 145–151.
28. *Тарчевский И.А., Максюткова Н.Н., Яковлева В.Г.* // Физиология растений. 1996. Т. 43. № 5. С. 667–670.
29. *Герасимова Н.Г., Придворова С.М., Озерецковская О.Л.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 1. С. 117–120.
30. *Ramanujam M.P., Abduljaleel V., Kumaravelu G.* // Biol. Plantarum. 1998. V. 41. № 2. P. 307–311.
31. *Hara-Nishimura L., Shimada T., Hiraiwa N.* // J. Plant Physiol. 1995. V. 145. № 5–6. P. 632–640.
32. *Kinoshita T., Yamada K, Hiraiwa N, Kondo M.* // Plant J. 1999. V. 19. № 1. P.43–53.
33. *Pena-Cortes H., Albrecht T., Prat S., Weiler E.W., Willmitzer L.* // Planta. 1993. V. 191. № 1. P. 123–128.

## Influence of Salicylic Acid on Biosynthesis of Nucleic Acids in *Polyscias filicifolia* Cell Culture under the Action of Unfavorable Temperatures

N. V. Kirillova, Yu. V. Belykh, and A. I. Spasenkov

*St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, ul. Professora Popova 4, St. Petersburg, 197376 Russia*

*e-mail: biochem@spsca.ru*

Received July 20, 2010

**Abstract**—Amounts of DNA and RNA was increased (from 20 to 50%) in the presence of salicylic acid in cells of *Polyscias filicifolia* tissue culture grown in Murachige–Skoog modified medium. Treatment of the tissue culture with salicylic acid resulted in a significant increase of intracellular protein and decrease of proteolytic activity. In cells treated with salicylic acid, the amounts of DNA and RNA was higher in conditions of heat (3 h, 45°C) and cold (24 h, 7°C) stress in comparison with cells exposed to unfavorable temperatures without the initial treatment with salicylic acid.