

Научная статья
УДК 577.13:577.19
EDN: PQNFQN
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-434-441



Повышение устойчивости культуры клеток *Arabidopsis thaliana* к фториду натрия за счет конститутивной экспрессии HSP101

Е.Л. Горбылева*✉, М.А. Сафонова**, А.В. Степанов*, Е.Г. Рихванов*

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Российская Федерация

**Байкальский гуманитарный институт, г. Иркутск, Российская Федерация

Аннотация. Фтор является одним из токсических компонентов выбросов промышленных предприятий. Повышенное содержание фтора в атмосфере, почве или воде негативно влияет на рост и развитие растений, а также снижает устойчивость к различным стрессовым факторам окружающей среды. Увеличение температуры окружающей среды вызывает у всех организмов защитный ответ в виде синтеза белков теплового шока. У растений имеется специфический белок HSP101, который выполняет функцию защиты клеток от тепловых повреждений и также является ответственным за индуцируемую термотолерантность – способность организмов выдерживать воздействие жесткого теплового шока, будучи предварительно подвергнутыми действию мягкого теплового стресса, в результате которого индуцируются белки теплового шока. Известно, что белки теплового шока участвуют в защите не только от повышенных температур, но и от других различных стрессовых факторов. В настоящей работе было изучено влияние обработки фторидом натрия на жизнеспособность культуры клеток *Arabidopsis thaliana*, экспрессию и синтез белков теплового шока, а также роль белка теплового шока HSP101 в устойчивости к фтору. Показано, что фторид натрия значительно снижает жизнеспособность клеток *A. thaliana*, подавляет активацию экспрессии гена HSP101 при повышении температуры. В то же время линия *A. thaliana* с конститутивной экспрессией гена HSP101 оказалась более устойчива к токсичному действию фторида натрия.

Ключевые слова: фторид натрия, *Arabidopsis thaliana*, белки теплового шока, культура клеток, тепловой стресс

Благодарности. Авторы выражают благодарность ведущему инженеру Т.М. Русалевой за помощь в выделении белка и проведении иммуноблоттинга с антителами, а также профессору Е. Виерлингу и доктору М. Эскобару (Университет Аризоны, США) за предоставленные антитела к Hsp101 и Hsp17.6 (класс I и II). Работа выполнена с использованием коллекции Центра коллективного пользования (ЦКП) «Биоресурсный центр» и оборудования ЦКП «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Для цитирования: Горбылева Е.Л., Сафонова М.А., Степанов А.В., Рихванов Е.Г. Повышение устойчивости культуры клеток *Arabidopsis thaliana* к фториду натрия за счет конститутивной экспрессии HSP101 // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 434–441. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-434-441>. EDN: PQNFQN.

PHYSICO-CHEMICAL BIOLOGY

Original article

Increased *Arabidopsis thaliana* cell culture resistance to sodium fluoride by constitutive expression of HSP101

Elena L. Gorbyleva*✉, Mariya A. Safonova**, Alexey V. Stepanov*, Evgenii G. Rikhvanov*

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

**Baikal Humanitarian Institute, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. Fluorine is one of the toxic elemental components of industrial emissions. Increased fluoride content in the atmosphere, soil or water negatively affects the growth and development of plants, as well as reducing resistance to various environmental stressors. An increase in ambient temperature causes a protective response in all organisms taking the form of heat shock protein synthesis. The specific protein HSP101, which performs the function of protecting plant cells from heat damage, is also responsible for inducible thermotolerance, representing the ability of organisms to withstand the effects of severe heat shock that were previously exposed to mild heat stress, as a result of which heat shock proteins are induced. Heat shock proteins are involved in protecting not only against

© Горбылева Е.Л., Сафонова М.А., Степанов А.В., Рихванов Е.Г., 2023

elevated temperatures, but also various other stress factors. In this work, the effect of sodium fluoride treatment on the viability of *Arabidopsis thaliana* cell culture, expression and synthesis of heat shock proteins was studied along with the role of heat shock protein HSP101 in providing resistance to fluoride. Sodium fluoride has been shown to significantly reduce the viability of *A. thaliana* cells by suppressing the activation of HSP101 gene expression with an increase in temperature. At the same time, the *A. thaliana* line, which has constitutive expression of the HSP101 gene, proved to be more resistant to the toxic effects of sodium fluoride.

Keywords: sodium fluoride, *Arabidopsis thaliana*, heat shock proteins, cell culture, heat stress

Acknowledgements. The authors are grateful leading ingeneer T.M. Rusaleva for the help in isolation protein fractions and immunoblotting with antibodies, and also to Dr. M. Escobar and Professor E. Vierling (University of Arizona, USA) for the gift of antibodies to Hsp101 and Hsp17.6 (class I and II). The study was carried out using the collection of the Central Collective Use Center "Bioresource Center" and the equipment of the "Bioanalytics Center" of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (Irkutsk).

For citation: Gorbyleva E.L., Safonova M.A., Stepanov A.V., Rikhvanov E.G. Increased *Arabidopsis thaliana* cell culture resistance to sodium fluoride by constitutive expression of HSP101. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(3):434-441. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-434-441>. EDN: PQNFQN.

ВВЕДЕНИЕ

Фтор – это двухатомный бесцветный газ с резким запахом, один из основных элементов атмосферных выбросов промышленных предприятий, которые специализируются на производстве алюминия, минеральных и фосфорных удобрений. Фтор является одним из главных загрязнителей в природе [1, 2]. Фтор не является необходимым питательным компонентом для роста и развития растений, поэтому он фитотоксичен [3]. Токсичность фтора также обусловлена его высокой реакционной способностью, что позволяет ему образовывать соединения с очень многими элементами периодической системы. Фтор – очень сильный окислитель, он участвует в образовании свободных радикалов, таких как гидроксил радикал ($\text{OH}^{\cdot}$), супероксид анион радикал ($\text{O}_2^{\cdot -}$), в образовании пероксида водорода (H_2O_2), появление которых приводит к клеточным повреждениям [1, 2].

В растения фтор попадает через атмосферу или через почву. При этом фториды обычно диссоциируют, и ионы фтора транспортируются в верхушку побега и запасующие органы, накапливаясь главным образом в листьях [2–4].

У растений, подверженных воздействию фторидов, в частности NaF, наблюдается разнообразный спектр повреждений: угнетение роста, апикальный некроз, хлороз, покраснение, деформация и увядание листьев, вплоть до их сбрасывания и полной гибели чувствительных видов. Фториды вызвали снижение хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов, увеличение содержания антоцианов [2, 4–8]. Обработки фторидами приводили также к увеличению активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы), изменению в уровне флавонов, фенолов, увеличению содержания аскорбиновой кислоты, глутатиона [2, 4, 9, 10]. Фтор даже в небольших количествах может нарушать гомеостаз растений, не вызывая при этом видимых повреждений [11]. Показано, что загрязнение фтором может снижать устойчивость растений к различного рода стрессовым факторам [12].

Наряду с антропогенным загрязнением окружающей среды химическими веществами, в частности фтором, в настоящее время происходит глобальное потепление климата. Засуха и повышение среднегодовой температуры являются одним из главных факторов снижения урожая. В связи с этим возникает вопрос, как скажется потепление климата на устойчивости растений в условиях загрязнения окружающей среды фторидами.

При повышении температуры окружающей среды у всех живых организмов начинается синтез белков теплового шока (БТШ) для защиты клеток от дальнейшего теплового повреждения. У растений эту функцию выполняет белок HSP101 [13, 14]. Показано также, что повышение количества БТШ происходит в ответ на действие различных стрессовых факторов, не связанных с температурой.

На основании вышеперечисленных данных было предположено, что увеличение количества БТШ приведет к повышению устойчивости растений к фтору. Поэтому целью работы являлось изучение токсичности NaF и его эффекта на синтез БТШ у *Arabidopsis thaliana*, а также с использованием линии с конститутивной экспрессией HSP101 оценка того, как искусственное повышение количества HSP101 повлияет на устойчивость клеток *A. thaliana* к фторид-ионам.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы три культуры клеток *Arabidopsis thaliana* L. (Heun): клетки экотипа Columbia из 14-дневных проростков, две трансгенные по синтезу белка HSP101 культуры арабидопсиса расы Nössern, предоставленные Е. Виерлингом (Университет Аризоны, США): линия, где HSP101 синтезируется конститутивно (S), и линия, трансформированная пустым вектором (V). Культуры клеток выращивали 8 дней в темноте при температуре 26 °C в среде Мурасиге-Скуга с 3% сахарозы, 0,5 мг/мл пиридоксина, 0,5 мг/мл тиамина и 0,1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). В трансгенных линиях по синтезу HSP101 последовательность кДНК гена HSP101 *A. thaliana* экотипа Columbia находится под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты в смысловой и антисмысловой ориентации [15].

Химическую обработку клеток проводили путем добавления концентрированного раствора NaF. Клетки вместе с культуральной средой инкубировали в пробирках 3, 6 и 24 ч на минитермошейкере TS-100 (BioSan, Латвия) или в колбах на водяном термошейкере Elpan 357 (Elpan, Польша).

Выживаемость клеток арабидопсиса экотипа Columbia определяли по восстановлению 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ). Культуру клеток ресуспендировали в фосфатном буфере и окрашивали 0,05%-м ТТХ в течение 3 ч при комнатной температуре в темноте.

Формазан экстрагировали 95%-м этанолом в течение 15 мин при температуре 60 °С. Далее раствор формазана фотометрировали при длине волны 490 нм на фотоэлектроколориметре КФК-2-УХЛ 4.2 (АО «Загорский оптико-механический завод», Россия), экстинкцию рассчитывали на 1 г сырого веса [16].

ОТ-ПЦР-анализ был выполнен следующим образом: выделяли суммарную РНК с использованием набора SV Total RNA Isolation System (Promega, США). Синтез первой цепи кДНК проводили с 1 мкг тотальной РНК, 20 рМ праймера oligo(dT)₁₈ и набора REVERTA (фирма «АмплиСенс», Россия). Далее 50 нг кДНК в качестве матрицы и 10 рМ каждого из геноспецифичных праймеров амплифицировали с помощью набора AmpliSense-200-1 (фирма «АмплиСенс», Россия) на амплификаторе Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf, Германия). Праймеры для HSP101 (At1g74310), HSP60 (At3g23990), HSP17.6C-CII (At5g56120) и ACT2 (At3g18780) выбирали с помощью программы VectorNTI, используя кДНК последовательности нужных генов¹. Схема амплификации: предварительный прогрев 3 мин при температуре 95 °С, циклы (95 °С – 40 с, 58 °С – 60 с, 72 °С – 90 с) и конечный прогрев 10 мин при температуре 72 °С. Количество циклов подбирали по результатам амплификации кДНК каждого гена для определения линейной области увеличения концентрации продукта амплификации. ПЦР-продукты разделяли в 1,5%-м агарозном геле. Результаты документировали с помощью УФ-трансиллюминатора ChemiDocXRS+ (Bio-Rad, США).

Выделение белка проводили путем ресуспендирования клеток в буфере с рН 7,4–7,6 следующего состава: 0,1 М Трис-НСl, 1 мМ β-меркаптоэтанол, 3 мМ додецилсульфат натрия (ДСН), посредством фиксирования жидким азотом и измельчения в ступке с кварцевым песком. Клеточные компоненты удаляли центрифугированием (15 000 g, 15 мин), белок осаждали 3-кратным объемом ацетона. Осадок белка трижды промывали ацетоном и растворяли в буфере для образца (0,625 М Трис-НСl, 8 мМ ДСН, 0,1 М β-меркаптоэтанол, 10% глицерин, 0,001% бромфеноловый синий, рН 6,8). Концентрацию белка определяли по методу О.Х. Лоури с соавторами [17]. После разделения белков путем ДСН-электрофореза в 14%-м полиакриламидном геле проводили иммуноблоттинг с антителами против HSP60 (SPA-807; StressGen, США), HSP101 и HSP17.6 (оба предоставлены Е. Вьерлингом, Университет Аризоны, США).

Микроскопический анализ клеток арабидопсиса расы Nössern проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver Z1 (Zeiss, Германия) с цифровой монохромной камерой AxioCam MRm3 (Carl Zeiss MicroImaging, Германия) и пакетом программного обеспечения для захвата и анализа изображений AxioVision Rel.4.6. Количество живых и мертвых клеток оценивали с помощью флуоресцентных красителей: 50 мкМ флуоресцеин диацетата (FDA) и 5 мкг/мл пропидий йодида (PI) соответственно. Красители добавляли в среду к клеткам суспензионной культуры и инкубировали в течение 3 мин при комнатной температуре. Далее исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа. Для статистического обобщения данных производили минимум 10 снимков каждой пробы. Результаты выражали в относительных единицах.

Все эксперименты проведены в 3–8 биологических повторностях. Полученные данные подвергали статистическому анализу: рассчитаны средние арифметические значения и их стандартные отклонения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Устойчивость растений к фторидам очень разнообразна [3, 18]. Некоторые растения могут выделять фтор в виде фторацетата и винилфторида, а такие растения, как чай, шпинат, капуста, салат, являются гипераккумуляторами фтора и могут накапливать без вреда для себя до 20–30 раз большие концентрации фтора, чем другие растения [4]. Галофит *Salicornia brachiata* Roxb. относительно устойчив к NaF в концентрации 50–100 мМ [19]. В то же время 2,5 мМ NaF подавлял рост каллуса листовницы сибирской [20]. Стоит также отметить, что низкие концентрации фторида натрия стимулировали рост корней и побегов. Так, П. Пант и П. Бхиравамурти показали, что в ответ на 1 мМ NaF происходило увеличение роста корней пшеницы и побегов горчицы, а у нута – обоих этих показателей. Применение более высоких концентраций фторида натрия вызывало угнетение роста побегов и корней у всех изученных в данной работе видов [18].

В настоящей работе изучали влияние фторида натрия в концентрации 20 мМ на выживаемость культуры клеток *A. thaliana*. Клетки арабидопсиса экотипа Columbia инкубировали с NaF в течение 0, 3, 6 и 24 ч, затем определяли жизнеспособность по восстановлению ТТХ. Присутствие NaF привело к снижению жизнеспособности клеток в зависимости от времени обработки. Инкубация клеток в течение 24 ч с 20 мМ NaF снизила количество живых клеток до 34% относительно контроля (рис. 1).

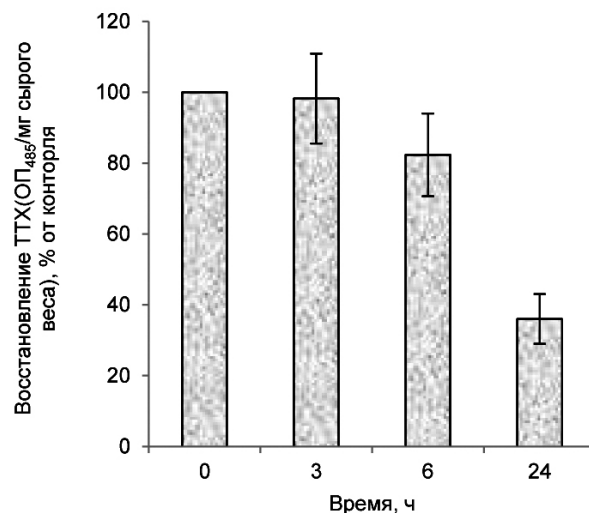


Рис. 1. Влияние NaF на жизнеспособность культуры клеток *A. thaliana*. Культуру клеток инкубировали с 20 мМ NaF. Восстановление трифенилтетразолий хлорида определяли через 0 (контрольные образцы), 3, 6 и 24 ч инкубации при температуре 26 °С. Данные выражены в процентах от контроля

Fig. 1. NaF effect on viability of *A. thaliana* cell culture. Cell culture was incubated with 20 mM NaF. Reduction of TTC was measured immediately (control samples) and after incubation for 3, 6 and 24 h at 26 °C. Data are expressed as percentage relative to the control samples

¹The Arabidopsis Information Resource [Электронный ресурс]. URL: <https://www.arabidopsis.org/> (28.08.2023).

Таким образом, обработка в концентрации NaF 20 мМ приводит к сильному снижению жизнеспособности клеток *A. thaliana*. Эти данные подтверждают ранее полученные результаты [21], где было показано, что инкубация с 10 мМ NaF приводила к подавлению роста, однако на жизнеспособность практически не влияла, а увеличение концентрации до 20 мМ приводило к гибели культуры клеток *A. thaliana*. Что касается других видов растений, было показано, что концентрации 5 и 10 мМ NaF также вызывали значительное ингибирование роста побегов и корней таких растений, как нут, ячмень, редис, рожь, пшеница, люпин, подсолнечник, огурец, люцерна и томат [8].

В естественных условиях обитания растения зачастую одновременно подвергаются не одному стрессовому фактору, а двум и более. Далее было изучено влияние на экспрессию БТШ совместного действия повышенной температуры и NaF. БТШ синтезируются при мягком тепловом стрессе и защищают клетки от более высоких повреждающих температур. У растений белку HSP101 принадлежит одна из главных ролей в развитии термотолерантности [13, 14]. Показана защитная роль синтезируемых БТШ при воздействии таких стрессовых факторов, как аноксия [22], окислительный стресс, тяжелые металлы [23]. Также искусственное изменение уровня БТШ усиливало устойчивость растений к засолению, осмотическому стрессу [24] и к инфекции патогенными микроорганизмами [22, 23, 25].

Для тепловой индукции БТШ достаточно кратковременного инкубирования клеток в условиях повышенной температуры [13], поэтому для того чтобы изучить влияние фторида натрия на экспрессию генов БТШ, клетки *A. thaliana* инкубировали с 20 мМ NaF при температурах 26 и 37 °C в течение 2 ч и отбирали пробы для ОТ-ПЦР-анализа (рис. 2).

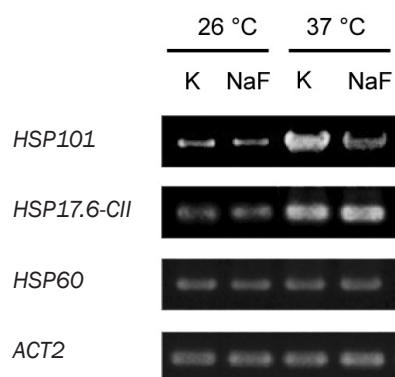


Рис. 2. Влияние NaF на экспрессию генов белков теплового шока в клетках *A. thaliana* в условиях мягкого теплового стресса. Представлены результаты ОТ-ПЦР генов *HSP101*, *HSP60* и *HSP17.6-CII*. Клетки инкубировали при температурах 26 и 37 °C 2 ч в отсутствие (контроль) или в присутствии 20 мМ NaF

Fig 2. Effect of NaF on *A. thaliana* cells HSPs gene expression at mild heat stress. Results of RT-PCR *HSP101*, *HSP60* and *HSP17.6-CII* genes are shown. Cells were incubated at 26 or 37 °C 2 h in the absence (control) or presence of 20 mM NaF

Как видно из рис. 2, при температуре 26 °C экспрессия генов *HSP101* и *HSP17.6-CII* была незначительной или вообще не наблюдалась. Обработка NaF не влияла на экспрессию генов БТШ при температуре 26 °C. Однако мягкий тепловой стресс (37 °C) заметно индуцировал экспрессию всех исследуемых генов, кроме *HSP60*. NaF в условиях теплового стресса подавлял тепловую индукцию гена *HSP101*, но не влиял на увеличение экспрессии низкомолекулярного БТШ *HSP17.6-CII*. Экспрессия контрольного гена «домашнего хозяйства» *ACT2* не менялась во всех пробах.

Для проверки предположения о защитной роли *HSP101* при действии NaF использовали клетки дикого типа расы Columbia (WT), а также трансгенной линии арабидопсиса (раса Nössern), трансформированной вектором с геном *HSP101 A. thaliana* (линия S), и линии, трансформированной пустым вектором (линия V). Необходимо было подтвердить, что в линии S синтез белка *HSP101* происходит конститутивно и не зависит от тепловой обработки. Влияние теплового стресса на культуру клеток анализировали с помощью вестерн-блоттинга с антителами против *HSP101*, *HSP60*, *HSP17.6-CII*. Клетки инкубировали в течение 2 ч при температурах 26 и 37 °C и отбирали пробы для выделения белка и последующего иммуноблоттинга (рис. 3).

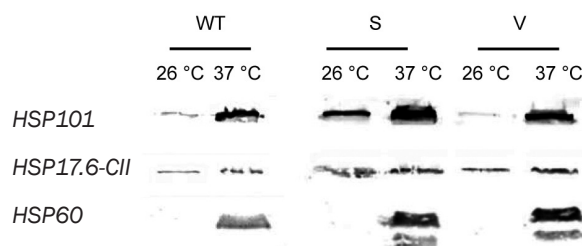


Рис. 3. Синтез белков теплового шока в клетках трансгенных линий *A. thaliana* в условиях мягкого теплового стресса. Представлен иммуноблоттинг с антителами против *HSP101*, *HSP60* и *HSP17.6* (класс II). Клетки инкубировали при температурах 26 или 37 °C в течение 2 ч. WT – клетки дикого типа; S – клетки линии с конститутивным синтезом *HSP101*; V – клетки линии, трансформированной пустым вектором

Fig. 3. *A. thaliana* transgenic cell lines HSPs synthesis at mild heat stress. Immunoblots with antibodies against *HSP101*, *HSP60* and *HSP17.6* (class II) are shown. Cells were incubated at 26 or 37 °C for 2 h. WT – wild type cells; S – cells with constitutive *HSP101* level; V – cells transformed with empty vector

Результаты показали значительное повышение уровня БТШ в культуре клеток дикого типа *A. thaliana* (WT) в условиях мягкого теплового стресса. Влияние теплового стресса на клетки, содержащие контрольный вектор (линия V), было в точности таким же, как и у дикого типа. Как и ожидалось, в линии S в отсутствие теплового воздействия наблюдался значительный уровень синтеза *HSP101* в контрольных условиях, а при мягком тепловом стрессе он несколько увеличивался за счет индукции синтеза собственного белка. Синтез *HSP60* практически не менялся при любых условиях эксперимента. Синтез *HSP17.6-CII* увеличивался при

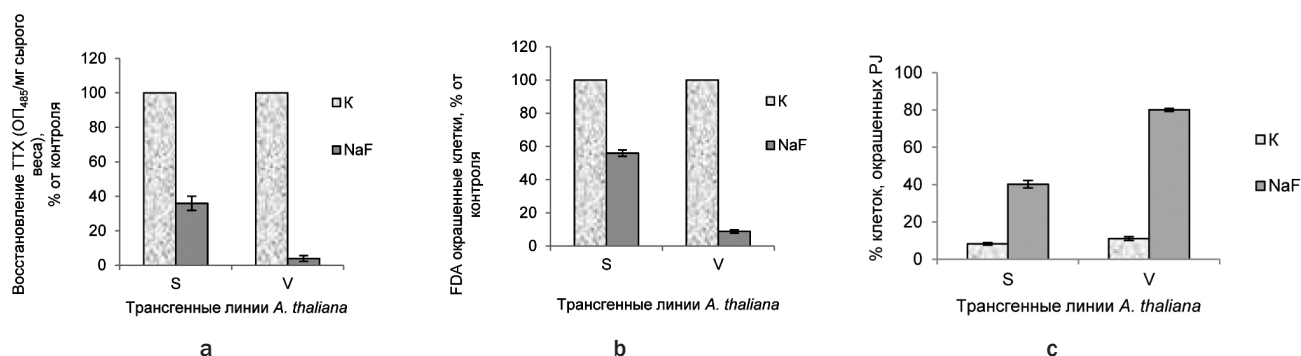


Рис. 4. Влияние конститутивного синтеза HSP101 на жизнеспособность клеток *A. thaliana* при обработке NaF. Клетки трансгенных линий инкубировали с 20 мМ NaF при температуре 26 °С в течение 24 ч. S – клетки линии с конститутивным синтезом HSP101; V – клетки линии, трансформированной пустым вектором. Жизнеспособность определяли с помощью восстановления ТТХ (а), окрашивания FDA (б) и PI (с). Данные выражены в процентах от контроля по каждой линии отдельно

Fig. 4. Effect of HSP101 constitutive synthesis on *A. thaliana* cells viability. Transgenic cell lines were incubated with 20 mM NaF at 26 °C for 24 h. S – cells with constitutive HSP101 level, V – cells transformed with empty vector. Viability of cells was measured by reduction of TTC (a), FDA staining (b) and PI staining (c). Data are expressed as percentage relative to the control samples separately for each line

инкубации при температуре 37°C как в трансгенных линиях, так и в культуре клеток дикого типа.

Подтвердив наличие конститутивного синтеза белка HSP101 в линии S, а также убедившись в том, что линия V по синтезу этого белка аналогична дикому типу и может быть использована в качестве контрольной, необходимо было выяснить, как конститутивная экспрессия гена *HSP101* повлияет на устойчивость *A. thaliana* к действию фторида натрия. Для этого линии, трансформированные *HSP101* (S) и пустым вектором (V), инкубировали с 20 мМ NaF в течение 24 ч и определяли мертвые и жизнеспособные клетки (рис. 4).

В зависимости от размеров клеточных агрегатов и для более полной достоверности результатов определение жизнеспособности проводили с использованием 3-х методов. Выживаемость агрегированной культуры *A. thaliana* устанавливали по способности живых клеток восстанавливать ТТХ (рис. 4, а). Жизнеспособность мелкоклеточных трансгенных культур клеток определяли по окрашиванию живых клеток флуоресцентным красителем флуоресцеин диацетатом (FDA) (рис. 4, б) и по окрашиванию мертвых клеток с помощью флуоресцентного красителя пропидий йодида (PI) (рис. 4, с). Как видно из рис. 4, а, при использовании метода восстановления ТТХ процент живых клеток у всех трансгенных линий снижался при действии NaF. Однако жизнеспособность у линии V снижалась гораздо сильнее (на 98%), чем у линии S (на 64%). Окрашивание клеток FDA дало сходные результаты. Жизнеспособность клеток линии S при обработке NaF снизилась на 45%, а линии V – на 93%. Окрашивание мертвых клеток с помощью PI показало, что в линии V процент мертвых клеток при обработке NaF увеличился с 11 до 80%. Тогда как в линии S относительное количество нежизнеспособных клеток составило 40%.

Таким образом, конститутивная экспрессия гена *HSP101* в клетках способствует повышению их жизнеспособности почти на 50% при действии фторида натрия. Результаты, свидетельствующие о том, что повышение количества HSP101 увеличивает жизнеспособность клеток *A. thaliana*, согласуются с данными, полученными при использовании культуры клеток табака, на которых конститутивная экспрессия гена *HSP101 A. thaliana* повышала устойчивость к фториду калия [26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате данной работы показано, что обработка фторидом натрия в концентрации 20 мМ приводит к значительному снижению жизнеспособности у культуры клеток *A. thaliana*. В ответ на обработку 20 мМ NaF не было выявлено индукции экспрессии БТШ при нормальной температуре инкубирования, а также в условиях мягкого теплового стресса наблюдалось снижение экспрессии гена *HSP101*. Конститутивный синтез данного белка в клетках способствует повышению их жизнеспособности и устойчивости к действию фторида натрия. Подавление экспрессии БТШ фторидом натрия при мягком тепловом стрессе означает, что в естественной среде обитания в условиях потепления климата отрицательное воздействие антропогенного загрязнения фтором на растения будет увеличиваться, поскольку фтор подавляет защитные реакции растения.

Полученные данные свидетельствуют о важной роли HSP101 в устойчивости не только к тепловому стрессу, но и к химическим веществам. Искусственное повышение количества HSP101 методами генетики и селекции открывает широкие перспективы использования таких растений в санитарно-защитных зонах в районах с высоким загрязнением фторидами, а также в качестве фиторемигрантов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ипатова В.И., Габдулина Р.И. Интерактивный эффект алюминия и фтора в присутствии микроводоросли //

Экологические системы и приборы. 2022. N 7. С. 36-47.
<https://doi.org/10.25791/esip.7.2022.1309>. EDN: WAEWMX.

2. Zouari M., Elloumi N., Bellassoued K., Ben Ahmed C., Krayem M., Delmail D., et al. Enzymatic antioxidant responses and mineral status in roots and leaves of olive plants subjected to fluoride stress // *South African Journal of Botany*. 2017. Vol. 111. P. 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.03.039>.
3. Bhargava D., Bhardwaj N. Phytotoxicity of fluoride on a wheat variety *Triticum aestivum* var. Raj. 4083 and its bioaccumulation at the reproductive phase // *Asian Journal of Experimental Sciences*. 2011. Vol. 25, no. 1. P. 37–40. <https://doi.org/10.3390/app10196971>.
4. Jarosz Z., Pitura K. Fluoride toxicity limit – can the element exert a positive effect on plants? // *Sustainability*. 2021. Vol. 13, no. 21. P. 12065. <https://doi.org/10.3390/su132112065>.
5. Fornasiero R.B. Phytotoxic effects of fluorides // *Plant Science*. 2001. Vol. 161, no. 5. P. 979–985. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00499-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00499-X).
6. Kumar K., Giri A., Vivek P., Kalaiyaran T., Kumar B. Effects of fluoride on respiration and photosynthesis in plants: an overview // *Annals of Environmental Science and Toxicology*. 2017. Vol. 2, no. 1. P. 43–47. <https://doi.org/10.17352/aest.000011>.
7. Cai H., Dong Y., Li Y., Li D., Peng C., Zhang Z., et al. Physiological and cellular responses to fluoride stress in tea (*Camellia sinensis*) leaves // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2016. Vol. 38. P. 144. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2156-0>.
8. Sachan P., Lal N. Effect of sodium fluoride on germination, seedling growth and photosynthetic pigments in *Cicer arietinum* L. and *Hordeum vulgare* L. // *Ecology & Environmental Sciences*. 2018. Vol. 3, no. 4. P. 300–304. <https://doi.org/10.15406/mojes.2018.03.00103>.
9. Gao J., Liu C., Zhang J., Zhu S., Shen Y., Zhang R. Effect of fluoride on photosynthetic pigment content and antioxidant system of *Hydrilla verticillata* // *International Journal of Phytoremediation*. 2018. Vol. 20, no. 12. P. 1257–1263. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1319328>.
10. Mondal N.K. Effect of fluoride on photosynthesis, growth and accumulation of four widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in India // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2017. Vol. 144. P. 36–44. <https://doi.org/10.7717/peerj.13434>.
11. Singh S., Singh J., Singh N. Studies on the impact of fluoride toxicity on growth parameters of *Raphanus sativus* L. // *Indian Journal of Scientific Research*. 2013. Vol. 4, no. 1. P. 61–63.
12. Doley D., Hill R.J., Riese R.H. Environmental fluoride in Australasia: ecological effects, regulation and management // *Clean Air and Environmental Quality*. 2004. Vol. 38, no. 2. P. 35–55.
13. Rikhvanov E.G., Gamburg K.Z., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Fedoseeva I.V., Tauson E.L., et al. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in *Arabidopsis* cell culture // *Plant Journal*. 2007. Vol. 52, no. 4. P. 763–778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2007.03275.x>.
14. Qin F., Yu B., Li W. Heat shock protein 101 (HSP101) promotes flowering under nonstress conditions // *Plant Physiology*. 2021. Vol. 186, no. 1. P. 407–419. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab052>.
15. Queitsch C., Hong S.W., Vierling E., Lindquist S. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2000. Vol. 12, no. 4. P. 479–492. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.4.479>.
16. Еникеев А.Г., Высоцкая Е.Ф., Леонова Л.А. Об использовании 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида для оценки жизнеспособности культур растительных клеток // *Физиология растений*. 1995. Т. 42. N 3. С. 423–426.
17. Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *Journal of Biological Chemistry*. 1951. Vol. 193, no. 1. P. 265–275.
18. Pant P., Bhiravamurthy P. Effects of fluoride on early root and shoot growth of typical crop plants of India // *Fluoride*. 2008. Vol. 41, no. 1. P. 57–60.
19. Reddy M.P., Kaur M. Sodium fluoride induced growth and metabolic changes in *Salicornia brachiata* Roxb // *Water, Air, and Soil Pollution*. 2008. Vol. 188. P. 171–179. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9533-7>.
20. Матяшенко Г.В., Шмаков В.Н., Константинов Ю.М., Белоголова Г.А. Влияние экологических факторов на накопление фтора лиственницами (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr. и *L. sibirica* Ledeb.) в Восточной Сибири // *Экология*. 2005. N 6. С. 434–437. EDN: HSI PKV.
21. Пуляевская М.А., Варакина Н.Н., Гамбург К.З., Русалева Т.М., Степанов А.В., Войников В.К. [и др.]. Фторид натрия подавляет синтез БТШ в культуре клеток *Arabidopsis thaliana*, подвергнутых воздействию теплового стресса // *Физиология растений*. 2011. Т. 58. N 4. С. 533–541.
22. Ogawa D., Yamaguchi K., Nishiuchi T. High-level overexpression of the *Arabidopsis* HsfA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth // *Journal of Experimental Botany*. 2007. Vol. 58, no. 12. P. 3373–3383. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm184>.
23. Banti V., Mafessoni F., Loreti E., Alpi A., Perata P. The heat-inducible transcription factor HsfA2 enhances anoxia tolerance in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. 2010. Vol. 152, no. 3. P. 1471–1483. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149815>.
24. Saidi Y., Domini M., Choy F., Zryd J.P., Schwitzguebel J.P., Goloubinoff P. Activation of the heat shock response in plants by chlorophenols: transgenic *Physcomitrella patens* as a sensitive biosensor for organic pollutants // *Plant, Cell and Environment*. 2007. Vol. 30, no. 6. P. 753–763. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01664.x>.
25. Kanzaki H., Saitoh H., Ito A., Fujisawa S., Kamoun S., Katou S., et al. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana* // *Molecular Plant Pathology*. 2003. Vol. 4, no. 5. P. 383–391. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00186.x>.
26. Еникеев А.Г., Копытина Т.В., Семёнова Л.А., Шафикова Т.Н., Гаманец Л.В., Волкова О.Д. [и др.]. Культуры клеток табака, трансформированные геном hsp101, обладают повышенной устойчивостью к фториду калия // *Доклады Академии наук*. 2010. Т. 430. N 1. С. 137–138.

REFERENCES

1. Ipatova V.I., Gabdullina R.I. Interactive effect of aluminum and fluorine in the presence of microalgae. *Ekologicheskie sistemy i pribory*. 2022;(7):36-47. (In Russian).
<https://doi.org/10.25791/esip.7.2022.1309>. EDN: WAEWMX.
2. Zouari M., Elloumi N., Bellassoued K., Ben Ahmed C., Krayem M., Delmail D., et al. Enzymatic antioxidant responses and mineral status in roots and leaves of olive plants subjected to fluoride stress. *South African Journal of Botany*. 2017;111:44-49.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.03.039>.
3. Bhargava D., Bhardwaj N. Phytotoxicity of fluoride on a wheat variety *Triticum aestivum* var. Raj. 4083 and its bioaccumulation at the reproductive phase. *Asian Journal of Experimental Sciences*. 2011;25(1):37-40.
<https://doi.org/10.3390/app10196971>.
4. Jarosz Z., Pitura K. Fluoride toxicity limit – can the element exert a positive effect on plants? *Sustainability*. 2021;13(21):12065.
<https://doi.org/10.3390/su132112065>.
5. Fornasiero R.B. Phytotoxic effects of fluorides. *Plant Science*. 2001;161(5):979-985.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00499-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00499-X).
6. Kumar K., Giri A., Vivek P., Kalaiyaran T., Kumar B. Effects of fluoride on respiration and photosynthesis in plants: an overview. *Annals of Environmental Science and Toxicology*. 2017;2(1):43-47. <https://doi.org/10.17352/aest.000011>.
7. Cai H., Dong Y., Li Y., Peng C., Zhang Z., et al. Physiological and cellular responses to fluoride stress in tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2016;38:144.
<https://doi.org/10.1007/s11738-016-2156-0>.
8. Sachan P., Lal N. Effect of sodium fluoride on germination, seedling growth and photosynthetic pigments in *Cicer arietinum* L. and *Hordeum vulgare* L. *Ecology & Environmental Sciences*. 2018;3(4):300-304.
<https://doi.org/10.15406/mojes.2018.03.00103>.
9. Gao J., Liu C., Zhang J., Zhu S., Shen Y., Zhang R. Effect of fluoride on photosynthetic pigment content and antioxidant system of *Hydrilla verticillata*. *International Journal of Phytoremediation*. 2018;20(12):1257-1263.
<https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1319328>.
10. Mondal N.K. Effect of fluoride on photosynthesis, growth and accumulation of four widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2017;144:36-44.
<https://doi.org/10.7717/peerj.13434>.
11. Singh S., Singh J., Singh N. Studies on the impact of fluoride toxicity on growth parameters of *Raphanus sativus* L. *Indian Journal of Scientific Research*. 2013;4(1):61-63.
12. Doley D., Hill R.J., Riese R.H. Environmental fluoride in Australasia: ecological effects, regulation and management. *Clean Air and Environmental Quality*. 2004;38(2):35-55.
13. Rikhvanov E.G., Gamborg K.Z., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Fedoseeva I.V., Tauson E.L., et al. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in *Arabidopsis* cell culture. *Plant Journal*. 2007;52(4):763-778.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2007.03275.x>.
14. Qin F., Yu B., Li W. Heat shock protein 101 (HSP101) promotes flowering under nonstress conditions. *Plant Physiology*. 2021;186(1):407-419.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiab052>.
15. Queitsch C., Hong S.W., Vierling E., Lindquist S. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2000;12(4):479-492.
<https://doi.org/10.1105/tpc.12.4.479>.
16. Enikeev A.G., Vysotskaya E.F., Leonova L.A. On the use of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride to assess the integrity of plant cells. *Fiziologiya rastenii = Russian Journal of Plant Physiology*. 1995;42(3):423-426. (In Russian).
17. Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.L., Randell R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951;193(1):265-275.
18. Pant P., Bhiravamurthy P. Effects of fluoride on early root and shoot growth of typical crop plants of India. *Fluoride*. 2008;41(1):57-60.
19. Reddy M.P., Kaur M. Sodium fluoride induced growth and metabolic changes in *Salicornia brachiata* Roxb. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2008;188:171-179.
<https://doi.org/10.1007/s11270-007-9533-7>.
20. Matyashenko G.V., Belogolova G.A., Shmakov V.N., Konstantinov Y.M. Effect of ecological factors on the accumulation of fluorine by larches, *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr. and *L. sibirica* Ledeb., in Eastern Siberia. *Ekologiya*. 2005;(6):434-437. (In Russian). EDN: HSIPKV.
21. Pulyaevskaya M.A., Varakina N.N., Gamborg K.Z., Rusaleva T.M., Stepanov A.V., Voinikov V.K., et al. Sodium fluoride suppresses HSP synthesis in *Arabidopsis thaliana* cell culture subjected to heat stress. *Fiziologiya rastenii = Russian Journal of Plant Physiology*. 2011;58(4):533-541. (In Russian).
22. Ogawa D., Yamaguchi K., Nishiuchi T. High-level overexpression of the *Arabidopsis* HsfA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *Journal of Experimental Botany*. 2007;58(12):3373-3383.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erm184>.
23. Banti V., Mafessoni F., Loreti E., Alpi A., Perata P. The heat-inducible transcription factor HsfA2 enhances anoxia tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2010;152(3):1471-1483.
<https://doi.org/10.1104/pp.109.149815>.
24. Saidi Y., Domini M., Choy F., Zryd J.P., Schwitzguebel J.P., Goloubinoff P. Activation of the heat shock response in plants by chlorophenols: transgenic *Physcomitrella patens* as a sensitive biosensor for organic pollutants. *Plant, Cell and Environment*. 2007;30(6):753-763.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01664.x>.
25. Kanzaki H., Saitoh H., Ito A., Fujisawa S., Kamoun S., Katou S., et al. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology*. 2003;4(5):383-391.
<https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00186.x>.
26. Enikeev A.G., Kopytina T.V., Semenova L.A., Shafikova T.N., Gamanets L.V., Volkova O.D., et al. Tobacco cell cultures transformed with the hsp101 gene have increased resistance to potassium fluoride. *Doklady Akademii nauk*. 2010;430(1):137-138. (In Russian).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Горбылева Елена Леонидовна,
к.б.н., младший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
✉ dzubina@sifibr.irk.ru
[https://orcid.org/ 0000-0002-6858-380X](https://orcid.org/0000-0002-6858-380X)

Сафонова Мария Александровна,
к.б.н., преподаватель,
Байкальский гуманитарный институт,
664011, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 37,
Российская Федерация,
marjera@mail.ru
[https://orcid.org/ 0000-0001-9495-6246](https://orcid.org/0000-0001-9495-6246)

Степанов Алексей Владимирович,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
stepanov@sifibr.irk.ru
[https://orcid.org/ 0000-0002-0456-3690](https://orcid.org/0000-0002-0456-3690)

Рихванов Евгений Геннадьевич,
д.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
eugene@sifibr.irk.ru
[https://orcid.org/ 0000-0001-7758-4540](https://orcid.org/0000-0001-7758-4540)

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили окончательный
вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 30.01.2023.
Одобрена после рецензирования 24.05.2023.
Принята к публикации 31.08.2023.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Elena L. Gorbyleva,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry, SB RAS,
132, Lermontov St., 664033, Irkutsk,
Russian Federation,
✉ dzubina@sifibr.irk.ru
[https://orcid.org/ 0000-0002-6858-380X](https://orcid.org/0000-0002-6858-380X)

Mariya A. Safonova,
Cand. Sci. (Biology), lecturer,
Baikal Humanitarian Institute
37, K. Marx St., 664011, Irkutsk,
Russian Federation,
marjera@mail.ru
[https://orcid.org/ 0000-0001-9495-6246](https://orcid.org/0000-0001-9495-6246)

Alexey V. Stepanov,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry, SB RAS,
132, Lermontov St., 664033, Irkutsk,
Russian Federation,
stepanov@sifibr.irk.ru
[https://orcid.org/ 0000-0002-0456-3690](https://orcid.org/0000-0002-0456-3690)

Evgenii G. Rikhvanov,
Dr. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry, SB RAS,
132, Lermontov St., 664033, Irkutsk,
Russian Federation,
eugene@sifibr.irk.ru
[https://orcid.org/ 0000-0001-7758-4540](https://orcid.org/0000-0001-7758-4540)

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding
the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved by
all the co-authors.*

Information about the article

The article was submitted 30.01.2023.
Approved after reviewing 24.05.2023.
Accepted for publication 31.08.2023.