

Проведенный анализ спектров двумерного гель-электрофореза внутриклеточных белков морфогенного и неморфогенного каллусов показал, что хотя обе культуры существенно не отличаются по общему количеству белковых пятен, в морфогенном каллусе уровень экспрессии многих белков выше. Также были обнаружены белки, характерные для каждой культуры.

INTRACELLULAR PROTEOME CHANGES ASSOCIATED WITH THE LOSS OF MORPHOGENIC CAPACITY IN TATARY BUCKWHEAT CELL CULTURE

*N. A. Nikonorova, L. R. Khaertdinova, A. N. Akulov
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan*

Summary. Long-term cultivation leads to gradual loss of morphogenic capacity of cells and to the complete inability to morphogenesis. Non-morphogenic cultures had high rates of growth and low protein concentration. 2D gel electrophoresis of intracellular proteins had revealed some proteins which were specific for both morphogenic and non-morphogenic calli.

ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОГЕННОЙ ЛИНИИ КАЛЛУСА, УСТОЙЧИВОЙ К ДЕЙСТВИЮ ИНГИБИТОРА КАТАЛАЗЫ

Г. В. Сибгатуллина, Л. Р. Хаертдинова

Казанский институт биохимии и биофизики
Казанского научного центра РАН, Казань

kam-guz@yandex.ru

Устойчивость культивируемых клеток растений к окислительному стрессу может служить фактором, обуславливающим стабильность их регенерационного потенциала, поскольку работами последнего десятилетия показано, что редокс-статус играет существенную роль в регуляции морфогенеза растений [12]. Высказано предположение [6], что потеря регенерационной способности в каллусах и суспензиях при длительном культивировании может быть связана с негативным влиянием на генетический аппарат клеток активных форм кислорода (АФК), образование которых индуцируется условиями культивирования *in vitro*. Ранее нами было установлено, что морфогенные каллусы гречихи татарской

способны к длительному сохранению регенерационного потенциала [3]. Кроме того, было показано, что морфогенные каллусы гречихи татарской по сравнению с неморфогенными каллусами характеризуются высокой активностью каталазы, низкой активностью супероксиддисмутазы и низким содержанием внутриклеточной перекиси водорода и продукта перекисного окисления липидов малонового диальдегида [1]. Известно, что 3-амино-1,2,4-триазол (АТ) — специфический ингибитор каталазы — часто используют для индукции окислительного стресса, как на целых растениях, так и на культивируемых клетках [8; 11]. АТ быстро проникает в клетки [5] и инактивирует каталазу, вызывая увеличение внутриклеточного содержания перекиси водорода [6]. В связи с этим представляло интерес изучить устойчивость двух типов каллуса к действию специфического ингибитора каталазы — 3-амино-1,2,4-триазола.

В работе использовали морфогенный каллус линии 1-8 и полученный из него под действием АТ каллус линии 1-8 АТ. Содержание перекиси водорода определяли спектрофотометрически согласно Bellincampi с соавт. [5]. Для определения активности каталазы использовали спектрофотометрический метод, предложенный H.Aebi с соавт. [4]. За накоплением продукта перекисного окисления липидов — малонового диальдегида (МДА) — следили по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [6]. Активность аскорбатпероксидазы определяли как описано S.Verma и R.Dubey [14]. Определение жизнеспособности клеток проводили при помощи красителя голубого Эванса [7]. Определение содержания растворимых полифенолов проводили по методу Folin-Ciocalteu в модификации V.Singleton и J.Rossi [13]. Антиоксидантную активность фенолов определяли по методу, предложенному T. Morishita [10] — в нашей модификации.

Было установлено, что при культивировании морфогенного каллуса на среде с добавлением 2 мМ АТ в течение 14 суток происходит снижение митотического индекса в 2–3 раза и прироста биомассы каллуса почти в 2 раза по сравнению с контролем. Доля жизнеспособных клеток в морфогенном каллусе через две недели культивирования составляла 53 % в контроле и 50 % на среде с АТ уменьшалась в 1,3 раза. После культивирования на среде с АТ каллус переносили на среду без ингибитора и пассивировали еще 14 суток. В этом случае прирост биомассы морфогенного каллуса составил только 15 % от контроля. Помимо этого, мы наблюдали снижение частоты образования проэмбриональных клеточных комплексов (ПЭКК) в морфогенном каллусе.

Интересно отметить, что на четвертом пассаже после переноса морфогенного каллуса со среды с ингибитором на среду без АТ мы наблюдали выщепление каллуса, отличающегося от родительской культуры желтой окраской и более мелкими ПЭКК. Этот каллус в дальнейшем культивировали как линию 1–8 АТ на среде RX без ингибитора. Немаловажно отметить, что и при культивировании на среде с АТ линия 1–8 АТ проявляла устойчивость к действию ингибитора: при переводе на среду с 2 мМ АТ прирост биомассы этой линии составлял 87 % от контроля на первом пассаже и 71 % на третьем пассаже. Снижение прироста биомассы культуры на среде с АТ, тем не менее, свидетельствует о том, что полученная линия не обладает полной устойчивостью к АТ. Нами было установлено, что АТ ингибирует активность каталазы в клетках линии 1–8 АТ. При этом, несмотря на снижение активности каталазы по сравнению с контролем, повышения содержания перекиси водорода в клетках линии 1–8 АТ на среде с АТ отмечено не было. Рядом авторов было отмечено, что ингибирование активности каталазы с помощью АТ приводит к компенсаторной активации других антиоксидантных ферментов, в частности, аскорбатпероксидазы [15] и глутатионредуктазы [9]. Тем не менее, мы не наблюдали повышения активности аскорбатпероксидазы в клетках линии 1–8 АТ на среде с ингибитором. Известно, что фенольные соединения гречихи татарской обладают высокой антиоксидантной активностью [10]. Важно отметить, что общее содержание фенолов в линии 1–8 АТ было меньше, чем в контроле, однако, при действии АТ на пятые сутки культивирования оно увеличивалось почти до уровня фенолов в исходной морфогенной линии. Тем не менее, на среде с 2 мМ АТ общая антиоксидантная активность фенолов в линии 1–8 АТ была почти на 50 % ниже, чем в исходной морфогенной линии.

Таким образом, показано, что в линии 1–8 АТ, устойчивой к действию специфического ингибитора каталазы — АТ, каталаза была чувствительна к действию этого ингибитора. При этом подавление активности каталазы аминотриазолом не вызывало увеличения содержания перекиси водорода в клетках, что может свидетельствовать о компенсаторном функционировании другого/других механизмов, способствующих разрушению перекиси водорода или снижению ее образования в линии 1–8 АТ. Поскольку устойчивость к АТ сохранялась на среде без ингибитора в течение 45 пассажей, это может свидетельствовать о мутантной природе отобранной линии.

Литература

1. Камалова Г. В., Акулов А. Н., Румянцева Н. И. Биохимия. 2009. Т. 74. С. 842–852.
2. Рогожин В. В., Курилюк Т. Т. Биохимия. 1996. Т. 61. С. 1432–1439.
3. Румянцева Н. И., Валиева А. И., Самохвалова Н. А., Мухитов А. Р., Агеева М. В., Лозовая В. В. Цитология. 1998. Т. 40. С. 835–843.
4. Aebi H. Methods in Enzymology. 1984. V. 105. P. 121–126.
5. Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G. Plant Physiology. 2000. V. 122. P. 1379–1385.
6. Benson E. E. In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant. 2000. V. 36. P. 163–170.
7. Castro-Concha L. A., Escobedo R. M., Miranda-Ham M. de L. Methods in Molecular Biology. 2006. V. 318. P. 71–76.
8. Ferguson I. B., Dunning S. J. Plant Science. 1986. V. 43. P. 7–11.
9. Kang K.-S., Lim C.-J., Hart T.-J., Kim J.-C., Jin C.-D. Journal of Plant Biology. 1999. V. 42. P. 187–193.
10. Morishita T., Yamaguchi H., Deg K. Plant Production Science. 2007. V. 10. P. 99–104.
11. Quershi M. K., Radeva V., Genko T., Minkov I., Hille J., Gechev T. S. Acta Physiol Plant. 2011. V. 33. P. 375–382.
12. Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J. Cell Physiol Biochem. 2001. V. 11. P. 173–186.
13. Singleton V. L., Rossi J. A. Am. J. Enol. Vitic. 1965. № 16. P. 144–158.
14. Verma S., Dubey R. S. Plant Science. 2003. V. 164. P. 645–655.
15. Yi K.-A., Hong Y.-N., Jin C.-D. J. Plant Biol. 1997. V. 40. P. 279–287.

CHARACTERISTIC OF THE MORPHOGENS CALLUS LINE RESISTANT TO THE CATALASE INHIBITOR

G. V. Sibgatullina, L. R. Khaertdinova

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan, Russia

Summary. It was shown that callus line 1–8 AT is resistant to the action of a specific inhibitor of catalase — 3-aminotriazole (AT), but catalase in this line is sensitive to this inhibitor. At the same time suppressing the activity of catalase not cause increase in the content of H_2O_2 in the cells, which may indicate a compensatory operation of another mechanism contributing to the destruction of H_2O_2 or reducing its formation in the 1–8 AT line. Since the resistance to AT remained in the medium without inhibitor for 45 passages, it may indicate the mutant nature of the selected line.

Работа поддержана грантом № 09-04-97039-р_поволжье_a