

На правах рукописи

Сибгатуллина Гузель Валерьевна

**РЕДОКС-МЕТАБОЛИЗМ КАЛЛУСОВ ГРЕЧИХИ, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО
МОРФОГЕННОЙ СПОСОБНОСТИ**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2011

Работа выполнена в лаборатории физиологии и генетики культивируемых клеток Учреждения Российской академии наук Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Румянцева Наталья Ивановна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Носов Александр Михайлович
(ИФР РАН, г. Москва)

доктор биологических наук, профессор
Каримова Фатима Габдуллазяновна
(КИББ КазНЦ РАН, г. Казань)

Ведущая организация: Казанский (Приволжский) Федеральный
Университет, биолого-почвенный факультет,
г. Казань

Защита состоится **26 декабря 2011 г.** в **13⁰⁰** часов на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Учреждении Российской академии наук Казанском институте биохимии и биофизики КазНЦ РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я № 30, тел/факс (843)2927347.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Казанского научного центра РАН.

Автореферат разослан 25 ноября 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



А.Б. Иванова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. 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 (Siminis et al., 1994; Konieczny et al., 2008). Одним из связующих звеньев, определяющих участие окислительного стресса в регуляции процессов дифференцировки и морфогенеза у растений, является перекись водорода. Эта молекула играет роль вторичного посредника, вовлеченного в регуляцию экспрессии определенных генов, имеющих в промоторах ARE (antioxidant responsive element) (Rushmore et al., 1991; Polidoros, Scandalios, 1999). Кроме того, мишенями перекиси водорода являются тиоловые группы цистеина, входящие в активные центры многих белков, в том числе участвующих в сигналинге и контроле практически всех аспектов жизни, включая энергетический метаболизм, структуру цитоскелета, транспорт, пролиферацию, дифференциацию и программируемую клеточную смерть (Jones, 2008). Высказано предположение, 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), повышенное образование которых индуцируется условиями культивирования *in vitro* (Cassels, Curry, 2001; Gaspar et al., 1998). Как правило, неморфогенные, гормонезависимые, полностью потерявшие способность к образованию меристем каллусы имеют высокую оводненность, рыхлую структуру и большую по сравнению с морфогенными каллусами пролиферативную активность. Для них характерна генетическая нестабильность, выражающаяся в увеличении полиплоидных и анеуплоидных клеток. Подобные неморфогенные каллусы рассматриваются как опухолевые клетки растений (Матвеева и др., 2001). Gaspar et al. (2002) указывают, что повышенное содержание перекиси водорода в опухолевых клетках как животных, так и растений может являться следствием аномального метаболизма, и в то же время необходимым фактором его поддержания. При изучении влияния салициловой кислоты на каллусные культуры гречихи татарской было показано, что для неморфогенной культуры характерно более высокое содержание внутриклеточной перекиси водорода, чем для морфогенной (Галеева, 2003). Следовательно, можно предположить, что культуры, имеющие разную способность к морфогенезу, могут характеризоваться различным содержанием АФК, в частности, H_2O_2 , и обладать различной активностью антиоксидантных ферментов, а также различным содержанием неферментативных антиоксидантов. Такие культуры должны отличаться по чувствительности к агентам, индуцирующим окислительный стресс.

Тем не менее, работы, в которых бы проводился сравнительный анализ редокс-метаболизма культур, обладающих разной морфогенной способностью, практически отсутствуют. Отчасти это связано с отсутствием удобных моделей. Ранее было установлено, что морфогенные каллусы гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. способны к длительному сохранению регенерационной способности и неморфогенные клоны в них выщепляются исключительно редко (Румянцева, др., 1998). Тем не менее, неморфогенные клоны можно отобрать и культивировать отдельно. При этом морфогенная культура не теряет регенерационной активности. Напротив, морфогенные каллусы

гречихи посевной *F. esculentum* Moench. не являются стабильными культурами и с течением времени культивирования теряют регенерационную способность (Румянцева и др., 1989; Лукина, 1999). Снижение морфогенной активности, изменение морфологии и увеличение хромосомной вариабельности наблюдается в них постепенно. Как правило, после нескольких лет культивирования каллусы гречихи посевной становятся полностью неморфогенными. Эти культуры могут быть использованы как модели для изучения редокс-метаболизма каллусов, отличающихся по способности к морфогенезу.

Цель и задачи исследований. Цель работы заключалась в выявлении особенностей редокс-метаболизма каллусов гречихи, отличающихся по морфогенной способности.

Реализация цели связывалась с решением следующих задач:

1. Получить морфогенные каллусы гречихи посевной и изучить изменение их морфогенетических характеристик, содержания внутриклеточной перекиси водорода и активности антиоксидантных ферментов при длительном культивировании.

2. Получить морфогенные каллусы гречихи татарской и отобрать в них возникшие спонтанно неморфогенные клоны. Провести сравнительный анализ содержания перекиси водорода и основного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) - малонового диальдегида (МДА), а также активности антиоксидантных ферментов (каталазы, супероксиддисмутазы (СОД) и аскорбатпероксидазы (АПО)) в клетках морфогенных и полученных из них неморфогенных каллусов гречихи татарской.

3. Изучить локализацию перекиси водорода в морфогенных и неморфогенных каллусах гречихи татарской с помощью метода электронной микроскопии.

4. Изучить действие специфического ингибитора каталазы 3-амино-1,2,4-триазола на ростовую активность, содержание перекиси водорода и МДА, а также активность антиоксидантных ферментов (каталазы, АПО, глутатионредуктазы) и неферментативных антиоксидантов (фенолов, глутатиона) клеток морфогенной и неморфогенной культуры гречихи татарской.

Научная новизна работы. Нами впервые было показано, что неморфогенные каллусы двух видов гречихи, полученные либо в результате длительного культивирования (гречиха посевная), либо периодически выщепляющиеся в виде клонов на стабильном морфогенном каллусе вне зависимости от длительности культивирования (гречиха татарская), характеризуются увеличением содержания перекиси водорода по сравнению с исходными морфогенными культурами.

Впервые проведен сравнительный анализ содержания перекиси водорода и МДА, а также активности антиоксидантных ферментов (каталазы, СОД и АПО) в клетках морфогенных и полученных из них неморфогенных каллусов гречихи татарской. Выявлено, что в парах морфогенный каллус – полученный из него неморфогенный каллус существует определенная закономерность: неморфогенный каллус характеризуется значительно более высоким содержанием перекиси водорода и МДА, высокой активностью СОД и АПО и низкой активностью каталазы по сравнению с морфогенными культурами. В морфогенных культурах содержится в 3 раза больше фенолов, чем в неморфогенных. Соотношение восстановленной формы глутатиона к окисленной (GSH/GSSG) в морфогенных каллусах всегда было выше, чем в неморфогенных.

Электронномикроскопическое изучение цитохимической реакции перекиси водорода с хлористым церием показало, что, перекись водорода в клетках как морфогенного, так и неморфогенного каллуса гречихи татарской локализована в клеточных стенках и межклетниках. Несмотря на высокое содержание перекиси водорода в клетках неморфогенного каллуса, ее локализации в вакуоли, на тонопласте и органеллах обнаружено не было, что может свидетельствовать об отсутствии сильного окислительного стресса в клетках неморфогенного каллуса.

Показано, что неморфогенные культуры более чувствительны к ингибитору каталазы - 3-амино-1,2,4-триазолу (АТ). АПО является основным ферментом, компенсирующим ингибирование активности каталазы АТ. Несмотря на то, что применение АТ вызывает окислительный стресс и запуск защитных реакций в обоих типах каллусов - защитные механизмы в неморфогенном каллусе оказываются малоэффективными, в результате чего в клетках накапливаются высокие концентрации перекиси водорода и МДА, и клетки погибают.

Получена линия морфогенного каллуса, отличающаяся от исходной по морфологии, размеру клеток, пролиферативной активности и обладающая устойчивостью к действию АТ. Если в исходной линии защита от окислительного стресса, в значительной степени, обусловлена активацией АПО, то в устойчивой линии АПО не активируется и, следовательно, задействован другой механизм компенсации.

Научно-практическая значимость работы. Полученные результаты об особенностях содержания перекиси водорода и МДА, а также активности антиоксидантных ферментов в каллусах, различающихся по способности к морфогенезу, могут представлять интерес для специалистов, занимающихся изучением процессов морфогенеза *in vitro*, а также биотехнологов. Данные, полученные при исследовании влияния индуктора окислительного стресса АТ на каллусные клетки, могут помочь в понимании механизмов устойчивости культивируемых клеток растений и нативных растений к стрессовым условиям. Полученные представления о разной чувствительности морфогенных и неморфогенных культур к индуктору окислительного стресса 3-амино-1,2,4-триазолу могут быть использованы в разработке приемов, позволяющих осуществлять селекцию линий на устойчивость к окислительному стрессу, а также как селективный фактор, удаляющий полиплоидные, генетически нестабильные клетки с целью увеличения морфогенной способности культуры. Результаты данной работы могут найти применение в биохимических исследованиях, а также использоваться в учебном процессе при подготовке и чтении курсов лекций на кафедрах биохимии, физиологии и биотехнологии растений в ВУЗах.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Исследования проводились в соответствии с планами НИР КИББ КазНЦ РАН (номер гос. регистрации 01201001657), частично поддержаны грантами РФФИ 05-04-49433-а, 09-04-97039_p_Поволжье_а, НИОКР РТ № 03-3.6-29. Данные с использованием электронной микроскопии получены в сотрудничестве с м.н.с. КИББ КазНЦ РАН к.б.н. Костюковой Ю.А. ВЭЖХ-спектры фенолов были получены совместно с н.с. КИББ КазНЦ РАН к.б.н. Акуловым А.Н. и н.с. КИББ

КазНЦ РАН к.б.н. Тарасовой Н.Б. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на 10-ой и 11-ой Пушкинской школах-конференциях молодых учёных (2006, 2007); Школе-семинаре молодых ученых УНЦ РАН и Волго-Уральского региона по физико-химической биологии и биотехнологии (Уфа, 2007), XIV Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем» (Яльчик, 2007); VI и VII съездах общества физиологов растений России (Сыктывкар, 2007; Нижний Новгород, 2011); итоговой конференции Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН (Казань, 2007); I Всероссийском конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия-2008» Биология: традиции и инновации в XXI веке (Казань, 2008), 13th annual Symposium for Biology Students of Europe «SymBioSE 2009» (Kazan, 2009); IX Международной конференции «Биология клеток растений in vitro и биотехнология» (Звенигород, 2008); 11th International Symposium on Buckwheat (Orel, 2010), Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов (Казань, 2011).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 22 научные работы; среди них 7 статей в сборниках, 3 статьи в центральных российских научных журналах, одна принята к печати.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста; состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, оригинальных результатов исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы. В работе представлено 4 таблицы и 28 рисунков. Список литературы включает 366 источников, в том числе 45 - отечественных.

1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве **объекта исследований** использовали каллусные культуры, полученные из незрелых зародышей двух видов гречихи: татарской *Fagopyrum tataricum* (L.). Gaertn. и посевной *F. esculentum* Moench. Плоды гречихи стерилизовали в 40% растворе гипохлорита натрия в течение 15 минут, с последующим трехкратным промыванием дистиллированной водой. Зародыши вычленили в асептических условиях с помощью препаровальных игл, переносили на питательную среду RX (Румянцева и др., 1989) и культивировали в темноте, при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Каллусные культуры были получены в 2005г. Для проведения исследований были отобраны 2 линии морфогенного каллуса гречихи посевной и 4 линии морфогенного каллуса гречихи татарской, в которых удалось получить неморфогенные клоны (в дальнейшем выращиваемые как самостоятельные линии неморфогенного каллуса). Все культуры поддерживали на одной среде (RX) в одинаковых условиях. Неморфогенные каллусы пересаживали через каждые 2 недели, а морфогенные – через каждые 4 недели. Для **определения морфогенной способности** каллусные культуры переносили на безгормональную среду MS (Murashige, Skoog, 1962) и культивировали на свету (5000 Лк) в условиях 16/8 часового фотопериода и температуры $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Отмечали способность образовывать соматические зародыши. Водный **раствор 3-амино-1,2,4-триазола** – ингибитора каталазы, добавляли к среде RX, простерилизовав его через мембранный фильтр Millipore с диаметром пор 0,22

мкм. О **характере роста** каллусной культуры судили по приросту свежей массы ткани за определенные периоды времени. Сухой вес определяли в соответствии с ГОСТ 16932-93. Содержание белка в образце определяли с помощью реактива Бредфорд (Bradford, 1976).

Для приготовления **цитогенетических препаратов** зафиксированные кусочки каллуса окрашивали 2%-ным пропионовым орсеином («Sigma», США). Давленные препараты хромосом анализировали с помощью микроскопа Jenamed («Carl Zeiss», Германия), фотографировали, используя цифровую камеру Nikon CoolPix («Nikon», Индонезия). При определении митотического индекса учитывали не менее 5000 клеток на точку фиксации. Подсчет хромосомных чисел проводили не менее, чем на 150 метафазных пластинках с хорошим разбросом хромосом.

Содержание перекиси водорода определяли спектрофотометрически согласно Bellincampi et al. (2000). Для определения **активности каталазы** использовали спектрофотометрический метод, предложенный Aeby et al. (1984). **Активность супероксиддисмутазы** определяли, как описано у Полесской с соавт. (2004). **Активность аскорбатпероксидазы** определяли как описано Verma, Dubey (2003). **Активность глутатионпероксидазы** определяли по методу, описанному Верлан (2008). За накоплением продукта ПОЛ – МДА – следили по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (Kumar, Knowles, 1993). Измерения проводили на спектрофотометре Lambda 25 («Perkin Elmer», США) при длине волны 532 нм, а также при длине волны 600 нм для корректировки неспецифического поглощения (Hodges et al., 1999). **Общее содержание фенольных соединений** оценивали по методу Folin, Ciocalteu (1927). **Антиоксидантную активность фенолов** определяли спектрофотометрическим методом, основанным на использовании свободного стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозила (ДФПГ) (Brand-Williams et al., 1995). **Содержание восстановленного и окисленного глутатиона** определяли по методу Zang, Kirkham (1996). **Жизнеспособность** клеток оценивали по модифицированному методу Castro-Concha et al. (2006) и Baker, Mock (1994). Для **электронной микроскопии** кусочки ткани фиксировали 2.5%-ным глутаровым альдегидом на фосфатном буфере с постфиксацией в 1%-ном OsO₄. Далее ткань обезвоживали в ряде этанолов с постепенным повышением концентрации, ацетоне, оксипропилене и заключали в смесь эпоксидных смол. Полученные с помощью ультрамикротомы LKB («LKB», Швеция) ультратонкие срезы монтировали на никелевые сеточки, контрастировали солями тяжелых металлов и просматривали на электронном микроскопе Jeol 1200SX (Япония). **Цитохимическую локализацию перекиси водорода** проводили по методу Bestwick et al. (1997) с использованием хлористого церия, который образует с перекисью водорода электронно-плотный преципитат пергидроксида церия Ce(OH)₂OОН, который хорошо можно визуализировать на уровне трансмиссионной электронной микроскопии.

Представлены данные как минимум трех независимых опытов, состоящих из 3-6 аналитических повторностей, экспериментальный материал обработан статистически (Готов, 1982; Лакин, 1990, а также с помощью программы Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»). На рисунках и в таблицах приведены среднеарифметические значения показателей, в качестве разброса экспериментальных данных указаны среднеарифметические и стандартные ошибки.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Изменение морфо-цитогенетических и биохимических характеристик каллусов гречихи посевной при длительном культивировании

Оценку изменения морфо-цитогенетических характеристик, внутриклеточного содержания перекиси водорода и активности антиоксидантных ферментов в ходе длительного культивирования проводили на двух морфогенных каллусах гречихи посевной (линия 2-5 и 1-10 плотноглобулярного морфотипа). Первичный морфо-цитогенетический анализ, а также оценку регенерационной способности выполняли через 4 мес культивирования каллусов. Результаты цитогенетического анализа показали, что морфогенные каллусы представлены, в основном, диплоидными клетками с 16 хромосомами: их доля составляла 80-83% (рис.1). При этом частота соматического эмбриогенеза составляла до 17 соматических зародышей на 1 г сырого веса каллусной ткани.

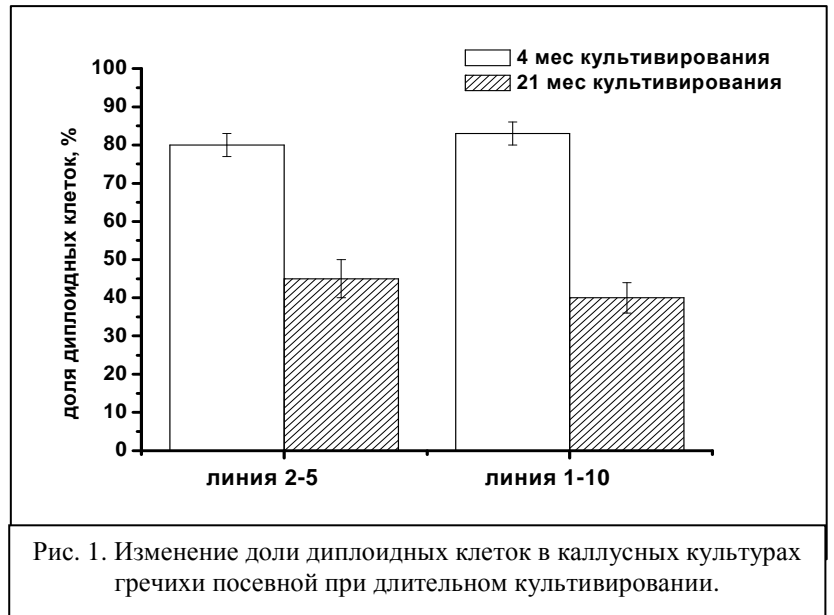
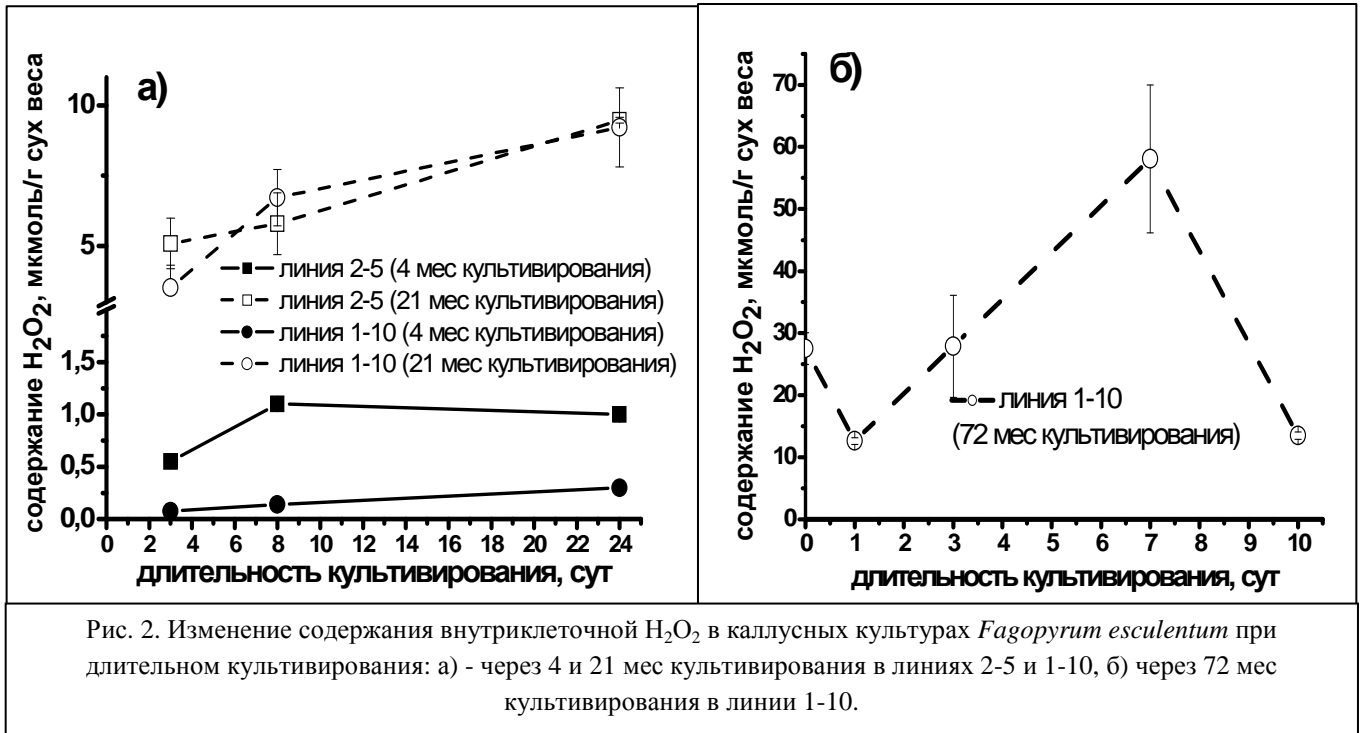


Рис. 1. Изменение доли диплоидных клеток в каллусных культурах гречихи посевной при длительном культивировании.

Через 21 мес культивирования было отмечено снижение морфогенной способности: образование соматических зародышей происходило с небольшой частотой – 1-2 соматических зародыша на 1 г сырого веса, и их развитие ограничивалось ранними стадиями.

Было установлено, что снижение регенерационного потенциала коррелирует со снижением доли диплоидных клеток (40-45%); при этом было отмечено увеличение содержания внутриклеточной перекиси водорода (рис. 2а). Следует отметить, что через 21 мес культивирования мы не наблюдали значительных изменений в морфологии каллуса. Через 72 мес культивирования линия 1-10 полностью изменила свою морфологию и была описана как рыхлая. При этом содержание перекиси водорода в ее клетках значительно увеличилось по сравнению с ранее полученными данными (на 7 сут было отмечено значение 58 мкмоль/г сух веса) (рис. 2б).

Таким образом, было установлено, что в культивируемых клетках гречихи посевной снижение морфогенной способности коррелирует с полиплоидизацией клеток и увеличением внутриклеточного содержания перекиси водорода. При этом, активность антиоксидантных ферментов не обнаруживала четкой корреляции с морфогенной способностью каллусных культур (данные представлены в диссертации).



Тем не менее, следует признать, что использованная нами система (длительно культивируемые каллусы, в которых наблюдается увеличение хромосомной вариабельности и снижение регенерационной способности с увеличением времени культивирования) является неудобной для проведения биохимических исследований, поскольку генетическая нестабильность морфогенных культур не позволяет проводить большие по объему повторяющиеся эксперименты и, соответственно, затрудняет или делает некорректной их интерпретацию.

В связи с этим важно было не только использовать стабильные морфогенные линии, но также отобрать пары морфогенный каллус – полученный из него неморфогенный каллус, чтобы нивелировать возможные различия между каллусами, полученными из разных эксплантов. Исходя из этого, дальнейшие исследования мы проводили на каллусных культурах гречихи татарской.

2.2. Сравнение морфо-цитогенетических характеристик клеток морфогенных и полученных из них неморфогенных каллусов гречихи татарской

Морфогенные каллусы гречихи татарской в отличие от культур гречихи посевной сохраняют морфологические, морфогенетические и цитогенетические характеристики до 10 лет культивирования (Румянцева с соавт., 1998). Они имеют гетерогенный морфотип: состоят из проэмбриональных клеточных комплексов (ПЭКК) и «мягкого» каллуса, формирующегося при разрыхлении ПЭКК и образованного неделяющимися, но метаболически активными клетками. Из одного ПЭКК можно получить, как правило, несколько соматических зародышей. Неморфогенные каллусы возникают в этой культуре в виде отдельных очагов и крайне редко (один раз на 30-40 пассажей). Только что образованные клоны неморфогенного каллуса, составляющие несколько мм в диаметре, отличались от морфогенной родительской культуры размерами клеток, а также значительно большим числом хромосом (рис. 3). На цитологическом препарате (рис.3) различимы

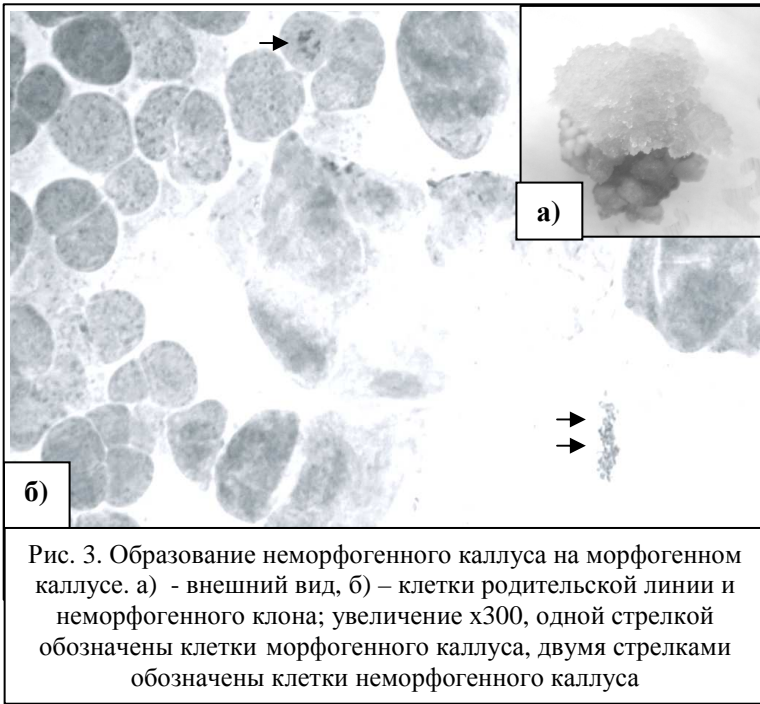


Рис. 3. Образование неморфогенного каллуса на морфогенном каллусе. а) - внешний вид, б) – клетки родительской линии и неморфогенного клона; увеличение $\times 300$, одной стрелкой обозначены клетки морфогенного каллуса, двумя стрелками обозначены клетки неморфогенного каллуса

мелкие эуплоидные клетки морфогенного каллуса с плотной цитоплазмой и крупные, сильно вакуолизированные полиплоидные клетки неморфогенного каллуса. Следует отметить, что по данным электронной микроскопии клетки ПЭКК морфогенного каллуса имеют округлое ядро (рис. 4а), тогда как клетки неморфогенного каллуса имеют крупные ядра сильно лопастной формы (рис. 4б). При формировании рыхлого каллуса на морфогенном каллусе гречихи татарской возможно отобрать новообразованный каллус от родительской культуры и пассировать отдельно. При этом морфогенный каллус не теряет регенерационного потенциала, что

предоставляет возможность провести сравнительный анализ родительской морфогенной линии и возникающего из нее неморфогенного каллуса. Нами были отселектированы 4 неморфогенные линии каллусов из 4 различных линий морфогенного каллуса гречихи татарской (морфогенные каллусные линии 1-8, 1-5, 1-10, 2-6 и неморфогенные каллусные линии 1-8р, 1-5р, 1-10р, 2-6р).

Цитогенетический анализ морфогенных культур и возникших из них неморфогенных каллусов показал различия в хромосомных числах уже на ранних этапах образования. Модальный класс пloidности во всех исследованных морфогенных каллусах был представлен диплоидными клетками: доля их составляла 95 – 98% (рис.5). Все исследованные неморфогенные культуры, в основном, состояли из полиплоидных и анеуплоидных клеток: доля клеток с диплоидным набором составляла не более 6%. Мы также наблюдали различия в пролиферативной активности морфогенных и неморфогенных каллусов. Неморфогенные каллусы имели один пик митотической активности в начале культурального цикла (в неморфогенных линиях 1-8р и 2-6р – на 2-е сут культивирования, в неморфогенных линиях 1-5р и 1-10р - на 3-и), и доля делящихся клеток составляла от 3 до 4,26% в зависимости от линии. Для морфогенных каллусов наблюдали несколько пиков пролиферативной активности, что, вероятно, связано с процессами реинициации ПЭКК, и

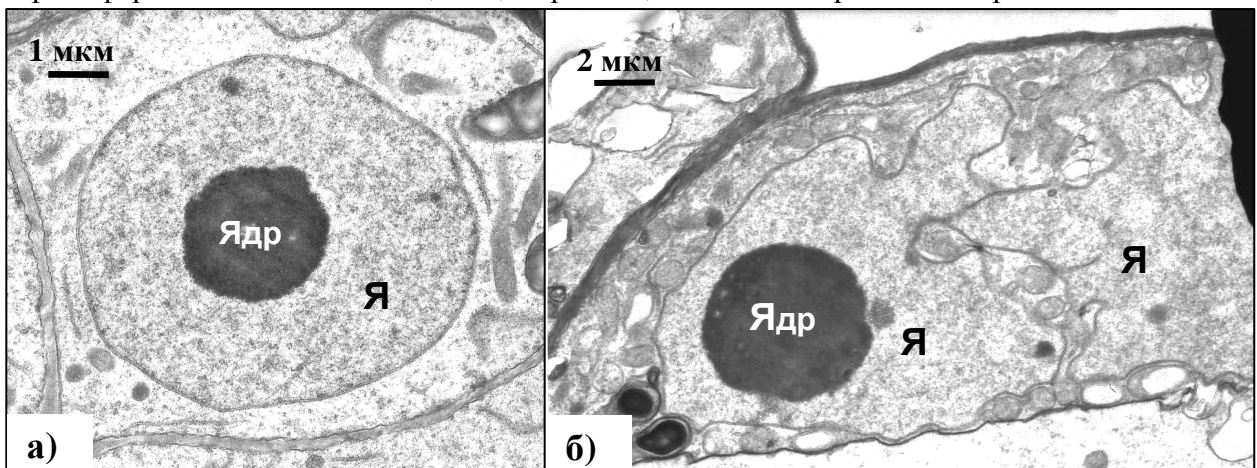
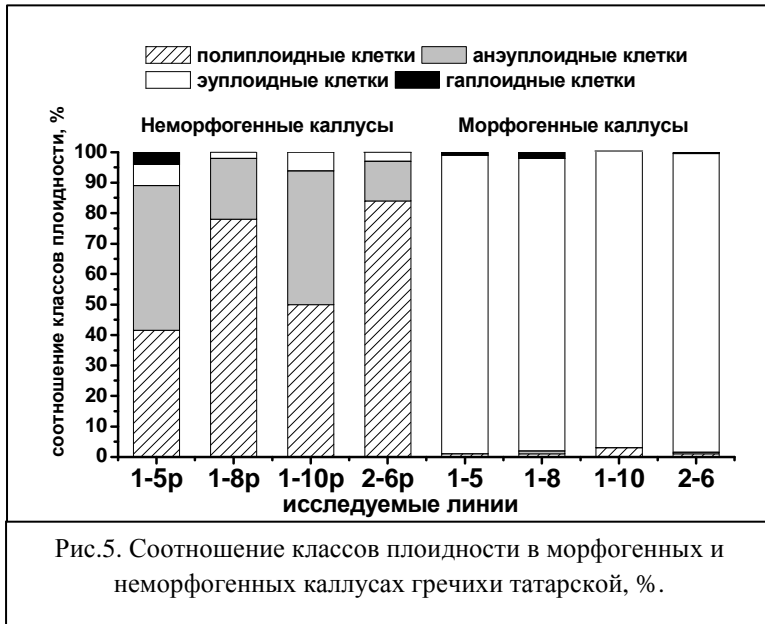


Рис. 4. Электронно-микроскопические фотографии ядер каллусных культур гречихи татарской. а) морфогенный каллус, б) неморфогенный каллус. (Я- ядро, Ядр- ядрышко)

максимальное значение митотической активности составляло 2,37%. Были отмечены различия в приросте биомассы каллусных культур с различной способностью к морфогенезу: для неморфогенных каллусов отмечалось быстрое увеличение биомассы, к 14 суткам культивирования

достигающее пятикратного увеличения от исходного. Морфогенные каллусы нарастали значительно медленнее и через две недели лишь удваивали свою биомассу.



2.3. Содержание перекиси водорода и МДА в клетках каллусов гречихи татарской с различной морфогенной активностью

Исследование внутриклеточного содержания перекиси водорода выявило различия как между морфогенными и неморфогенными каллусами, так и между линиями со сходной морфогенной

способностью. Было установлено, что для всех исследованных линий неморфогенных каллусов характерно повышенное содержание перекиси водорода по сравнению с родительскими морфогенными линиями, которое составляло от 1,5 до 15 раз в различных линиях (на рис.6 представлена динамика содержания перекиси водорода и МДА в морфогенной линии 1-8 и неморфогенной линии 1-8р как типичного случая; данные для других линий представлены в диссертации). Исследование уровня ПОЛ в клетках каллусов показало, что наибольшее содержание МДА также характерно для неморфогенных каллусов (рис.3б). Причем максимальные значения в неморфогенных каллусах составляли до 10 – 13 мкмоль/г сух веса, тогда как в морфогенных каллусах

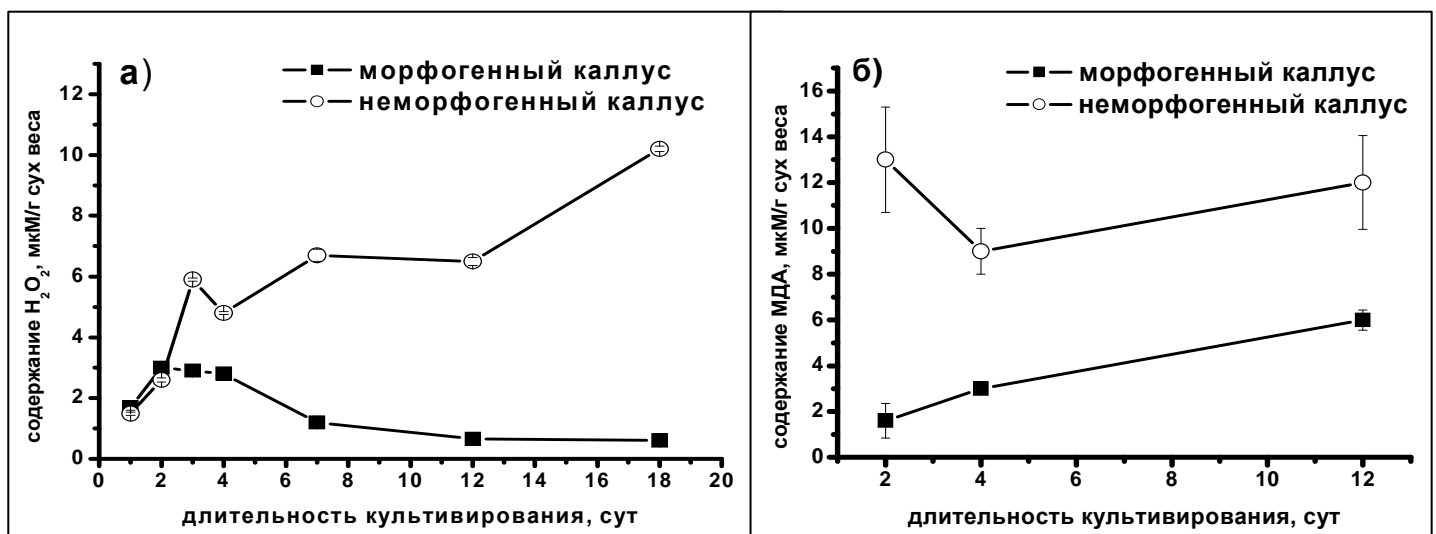


Рис.6. Содержание перекиси водорода (а) и МДА (б) в клетках линий каллусов гречихи татарской. 1 – морфогенный каллус (линия 1-8) и 2 – неморфогенный каллус (линия 1-8р).

количество МДА не превышало 6 мкмоль/г сух веса. Следует отметить, что увеличение содержания МДА в клетках неморфогенного каллуса не было связано со старением культуры и наблюдалось уже на 2-е сутки пассажа. В морфогенных каллусах содержание МДА возрастало ближе ко второй половине пассажа, что можно объяснить увеличением доли «мягкого» каллуса. Поскольку морфогенный каллус гречихи татарской представляет собой сложную систему, состоящую из ПЭКК – структур, из которых происходит образование соматических зародышей и «мягкого» каллуса, нами было проведено исследование содержания перекиси водорода и МДА отдельно в клетках ПЭКК и «мягкого» каллуса (табл. 1). Обнаруженное нами в клетках «мягкого» каллуса увеличение содержания МДА по сравнению с клетками ПЭКК (в 2,7 раза) в отсутствие увеличения содержания перекиси водорода, может свидетельствовать о развитии процессов старения, как показано ранее для стареющих клеток листьев (Aguera et al., 2010). Кроме того, ультраструктурное изучение показало, что клетки «мягкого» каллуса в основном имеют ядра вытянутой или неправильной лопастной формы с большими гетерохроматиновыми глыбками, что характерно для стареющих клеток или клеток, подвергнутых действию стресса (Hafeez et al., 1984; Ciessen, Faun, 1988; Poljuha et al., 2003; Li et al., 2008). Очень редко среди них удается обнаружить клетки с большими ядрами сильно лопастной формы, которые характерны для клеток неморфогенного каллуса. Поскольку старение клеток сопряжено с окислительным стрессом и увеличением уровня ПОЛ, продукты которого могут быть мутагенами и оказывать влияние как на цитоскелет, так и на клеточное деление, следствием этого может быть образование отдельных полиплоидных клеток в «мягком» каллусе. Можно предположить, что в крайне редких случаях такие клетки способны переходить к делению, в результате чего и образуются полиплоидные нестабильные рыхлые клоны неморфогенного каллуса. Лопастная форма ядра, обнаруженная нами в неморфогенных каллусах гречихи татарской, была

выявлена в неморфогенных каллусах свеклы (Häsler et al., 2003) и подорожника (Makowczynska et al., 2005).

Таким образом, было установлено, что в неморфогенных каллусах наблюдается повышенное содержание внутриклеточной

Таблица 1. Содержание перекиси водорода и МДА в различных популяциях клеток морфогенного каллуса гречихи татарской линии 1-8.		
Исследуемый параметр \ Популяция клеток	ПЭКК	«мягкий» каллус
Содержание H ₂ O ₂ , мкмоль/г сух веса	4,9±0,73	5±0,61
Количество МДА, мкмоль/г сух веса	4±0,33	11,3±1

перекиси водорода и изменение хромосомного набора в сторону полиплоидизации. Известно, что полиплоидные растения имеют измененную экспрессию генов и метаболизм по сравнению со своими диплоидными аналогами (Pathirana, Eason, 2006). Изменение экспрессии генов в полиплоидных клетках может быть вызвано как увеличением дозы гена (Osborn et al., 2003), так и изменением числа регуляторов, например, факторов транскрипции (Guo, Birchler, 1994; Birchler et al., 2001), а также сигнальных молекул. Многие работы последних лет показывают, что перекись водорода может выполнять регуляторную роль в клеточном сигналинге (Gechev, Hille, 2005; Dat et al., 2000), участвует в регуляции клеточного цикла (Burhans, Heintz, 2009), программируемой клеточной смерти

(Breusegem, Dat, 2006), регуляции морфогенеза (Cui et al., 1999; Joo et al., 2001). Можно предположить, что наблюдаемое нами увеличение содержания внутриклеточной перекиси водорода может являться необходимым условием для управления полиплоидным геномом неморфогенных каллусов, а также усиливать пролиферацию и рост его клеток.

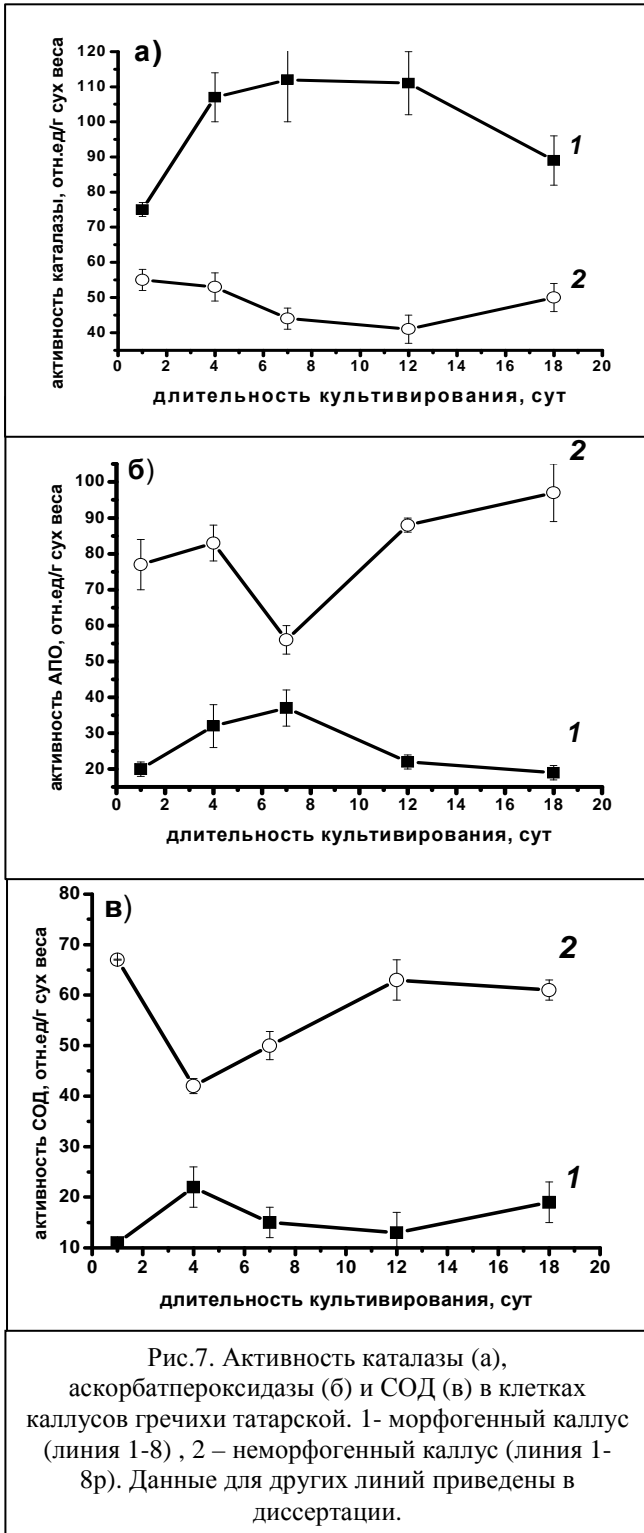
Проведенное нами электронномикроскопическое изучение локализации H_2O_2 с помощью хлористого церия показало, что в морфогенном и неморфогенных каллусах H_2O_2 локализована в клеточных стенках и в межклетниках. В литературе имеются данные, что отложение преципитата пергидроксида церия на тонопласте может наблюдаться в условиях, когда клетка испытывает значительный окислительный стресс и ее антиоксидантная активность снижена, например, при солевом стрессе (Wi et al., 2006) или действии тяжелых металлов (Romero-Puertas et al., 2004). Однако в наших экспериментах, несмотря на то, что неморфогенные культуры аккумулируют значительно больше H_2O_2 , мы не наблюдали локализации пергидроксида церия в вакуоли, на тонопласте и органеллах, что может свидетельствовать об отсутствии сильного окислительного стресса в клетках неморфогенного каллуса.

2.4. Активность антиоксидантных ферментов в клетках морфогенных и неморфогенных каллусов гречихи татарской

Содержание перекиси водорода в клетке регулируется как ферментативными, так и неферментативными антиоксидантными системами. Каталаза и АПО относятся к основным антиоксидантным ферментам клеток, как животных, так и растений. СОД вносит вклад в образование перекиси водорода. Исходя из этого, мы исследовали активность каталазы, АПО и СОД в клетках морфогенных и неморфогенных каллусов гречихи татарской. Было установлено, что активность антиоксидантных ферментов в клетках каллусов с различной способностью к морфогенезу значительно варьирует. Тем не менее, в парах «исходный морфогенный каллус – отобранный из него неморфогенный каллус» отмечалась следующая закономерность. В клетках морфогенных каллусов активность каталазы была выше по сравнению с клетками неморфогенных каллусов (рис.7а), тогда как АПО, наоборот, имела большую активность в клетках неморфогенных каллусов (рис.7б). Активность СОД была выше в среднем в 2,5 раза в клетках неморфогенных каллусов по сравнению с родительскими линиями (рис.7в). В зависимости от линии эта величина варьировала от 2 до 3,5 раз.

Следует отметить, что недостаток активности каталазы часто компенсируется возрастанием активности АПО (Yi et al., 1997; Kingston-Smith et al., 1999). Наблюдаемое нами значительное увеличение активности АПО в клетках неморфогенного каллуса по сравнению с морфогенным, вероятнее всего, является механизмом компенсации недостатка активности каталазы. Увеличение активности АПО может регулироваться через редокс-зависимое фосфорилирование по остаткам тирозина (Петрова, 2008). Тем не менее, содержание H_2O_2 в клетках неморфогенных каллусов значительно выше по сравнению с морфогенными каллусами. Можно предположить, что вклад в генерацию H_2O_2 вносит СОД, активность которой в неморфогенных каллусах выше по сравнению с морфогенными каллусами. Интересно отметить, что существует гипотеза, получившая в настоящее время достаточное экспериментальное подтверждение, что клетки неморфогенных, потерявших

способность к формированию меристем, каллусных культур имеют цитолого-биохимические характеристики, сближающие их с опухолевыми клетками животных (Gaspar et al., 1998; Gaspar et al. 2002). Авторы отмечают, что привыкшие неорганогенные культуры находятся в условиях постоянного окислительного стресса, так же как опухолевые клетки животных; при этом и те и другие активно пролиферируют. Полученные нами результаты показывают, что клетки



неморфогенных каллусов гречихи татарской имеют более высокие концентрации внутриклеточной перекиси водорода и МДА по сравнению с морфогенными каллусами, но активнее делятся и наращивают биомассу. Исходя из этого, можно предположить, что клетки неморфогенных каллусов гречихи татарской находятся в состоянии мягкого окислительного стресса, не оказывающего разрушающее действие на клетки, но активирующего их пролиферацию. Возможность активации сигнальных путей, стимулирующих пролиферацию в условиях мягкого окислительного стресса была показана на клетках животных (Oberley, 1981; Mesquita et al., 2010).

2.5. Чувствительность морфогенных и неморфогенных каллусов гречихи татарской к действию ингибитора каталазы 3-амино-1,2,4-триазола

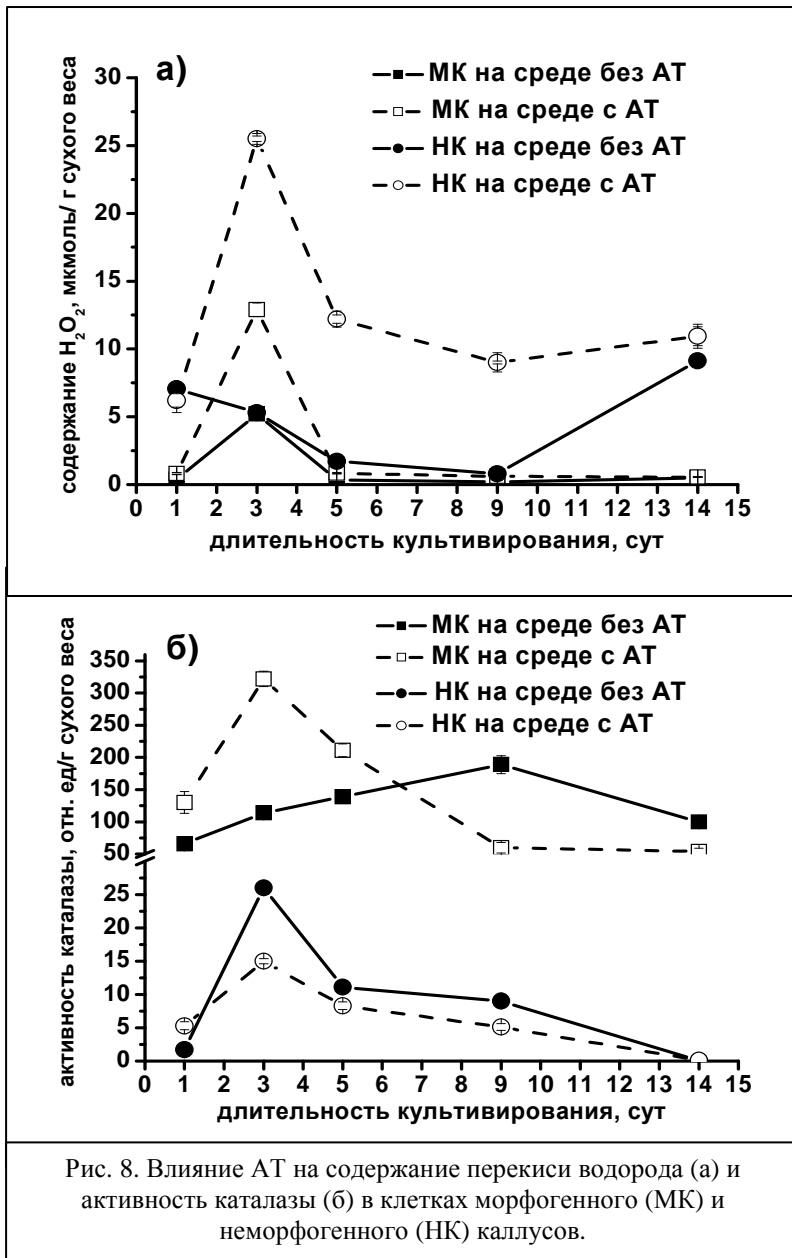
Apriori можно было предположить, что различный внутриклеточный уровень содержания перекиси водорода и активности антиоксидантных ферментов в клетках морфогенных и неморфогенных культур может влиять на их чувствительность к индукторам окислительного стресса. С одной стороны, клетки, способные существовать в условиях повышенного содержания АФК, могут использовать АФК для поддержания своего метаболизма (Gaspar et al., 1998; Halliwell, 2003). Например, раковые клетки находятся в постоянном прооксидантном состоянии, поскольку активация многих онкогенов усиливает образование АФК (Bartkova et al., 2006), но АФК необходимы для

изменения контроля клеточного цикла и неограниченной пролиферации, а также изменения

энергетического метаболизма. Однако с другой стороны, ощутимые концентрации АФК ингибируют рост раковых клеток через стимулирование проапоптозных сигналов (Benhar et al., 2001), делая раковые клетки гиперчувствительными к стрессорам. Это может объясняться тем, что в отличие от нормальных клеток раковые клетки животных имеют внутриклеточные концентрации H_2O_2 , приближающиеся к токсичным, поэтому дальнейшее увеличение концентрации H_2O_2 при определенных воздействиях переключает их развитие на путь апоптоза (Klebanoff, 1995). В связи с этим, представляло интерес изучить реакцию клеток каллусов с различной способностью к морфогенезу на индукцию окислительного стресса и выяснить, какие механизмы адаптации к окислительному стрессу существуют в морфогенных и неморфогенных культурах гречихи татарской. Ранее было показано, что неморфогенные каллусы гречихи татарской более чувствительны к действию салициловой кислоты и сделано предположение о неэффективности работы их антиоксидантных систем (Галеева, 2003; Максютова с соавт., 2005). Нами в качестве индуктора

окислительного стресса был использован специфический ингибитор каталазы АТ. Известно, что АТ часто используется для индукции окислительного стресса, как в интактных растениях, так и в культивируемых клетках (Amory et al., 1992; Prasad et al., 1994, Gechev et al., 2002), поскольку снижение активности каталазы должно вызывать увеличение уровня перекиси водорода в клетках.

Опыты по воздействию АТ на каллусные культуры были проведены на линии 1-8 морфогенного каллуса и полученной из него неморфогенной каллусной линии 1-8р. Было установлено, что при культивировании морфогенного каллуса на среде с добавлением 2 мМ АТ происходит снижение митотического индекса в 2-3 раза и прироста биомассы каллуса почти в 2 раза по сравнению с контролем. Неморфогенный каллус на среде с АТ переставал делиться уже через 3 сут и прирост его биомассы составил всего 5% от контроля. Если жизнеспособность клеток в морфогенном каллусе через 2 нед культивирования на



среде с АТ уменьшалась в 1,3 раза, то в неморфогенном каллусе она была в 7 раз ниже, чем в контроле. После культивирования на среде с АТ каллус переносили на среду без ингибитора и пассировали еще 14 сут. В этом случае прирост биомассы морфогенного каллуса составил только 15% от контроля, тогда как неморфогенный каллус не нарастал совсем. Помимо этого, мы наблюдали снижение частоты образования ПЭКК в морфогенном каллусе.

Как видно на рис. 8а, увеличение содержания перекиси водорода в морфогенном каллусе наблюдали только на третьи сутки культивирования, особенно резкое в присутствии АТ (более чем в 9 раз). В неморфогенном каллусе содержание перекиси водорода было высоким на 1-3 сутки культивирования и к концу пассажа - на 14 сутки культивирования, при этом на среде с АТ значительно большее увеличение содержания перекиси водорода (в 2-10 раз) отмечали, начиная с третьих суток культивирования и до конца пассажа. Важно отметить, что подавление активности каталазы по сравнению с контролем (рис. 8б) в морфогенном каллусе наблюдали на 9-14 сутки культивирования каллуса, в то время как в неморфогенном каллусе – уже после трех суток

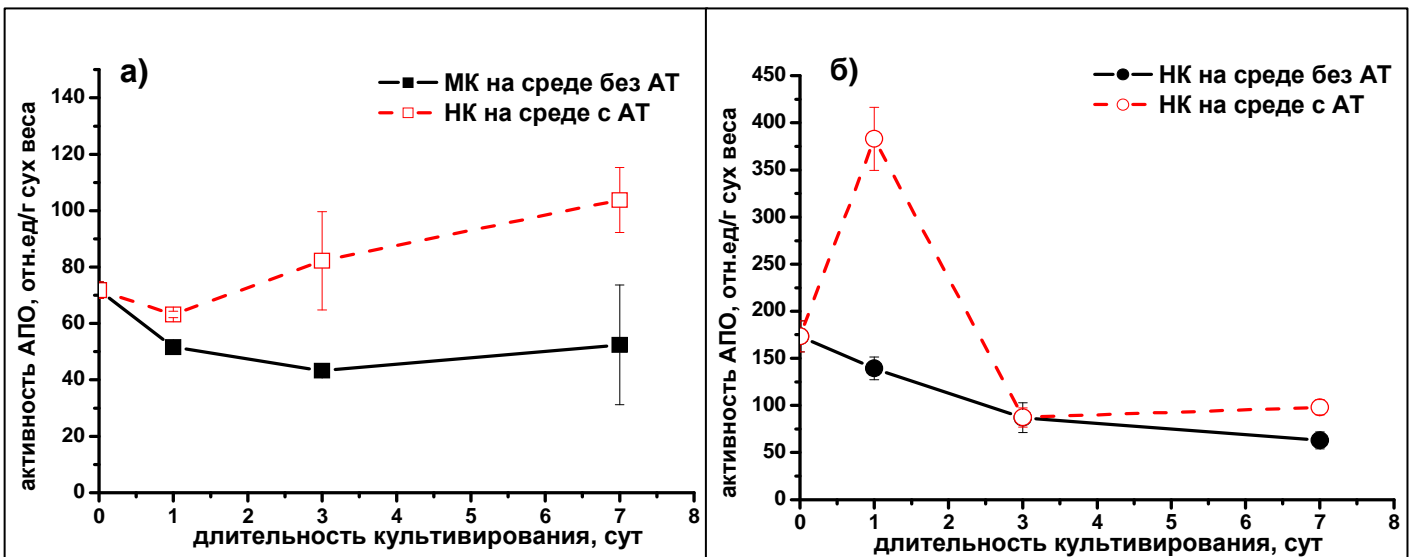


Рис. 9. Влияние АТ на активность аскорбатпероксидазы (АПО) в клетках морфогенного (а) и неморфогенного (б) каллусов гречихи татарской. МК – морфогенный каллус, НК – неморфогенный каллус.

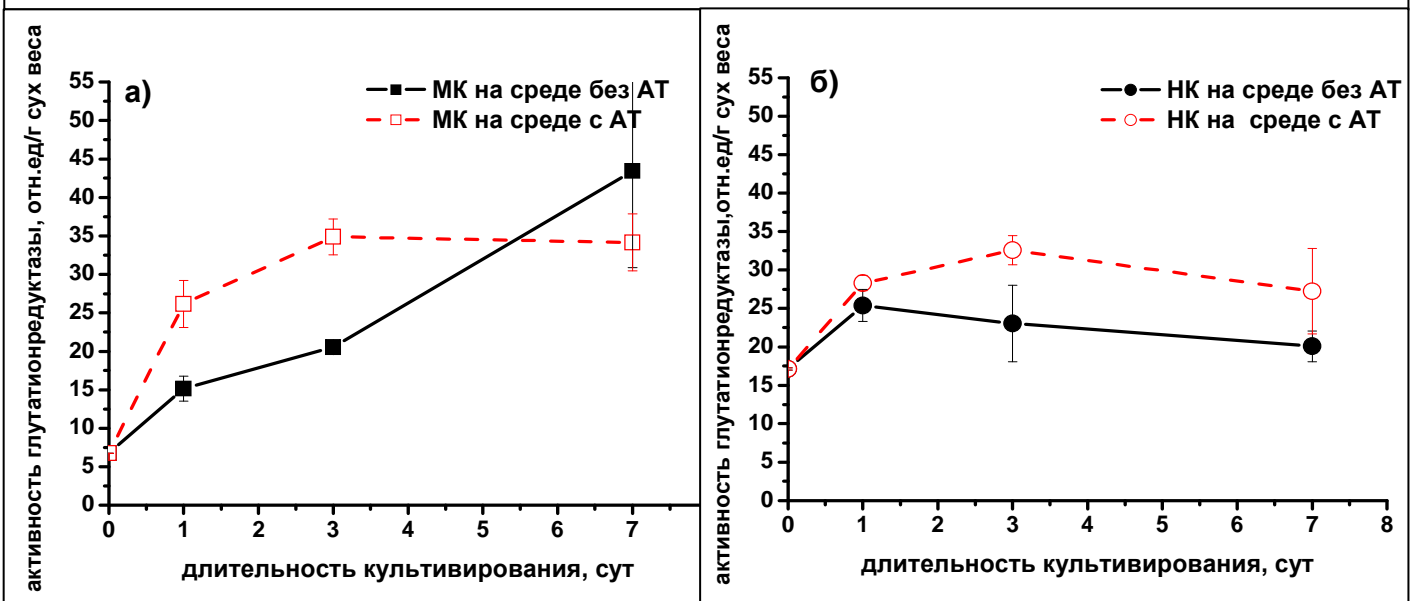
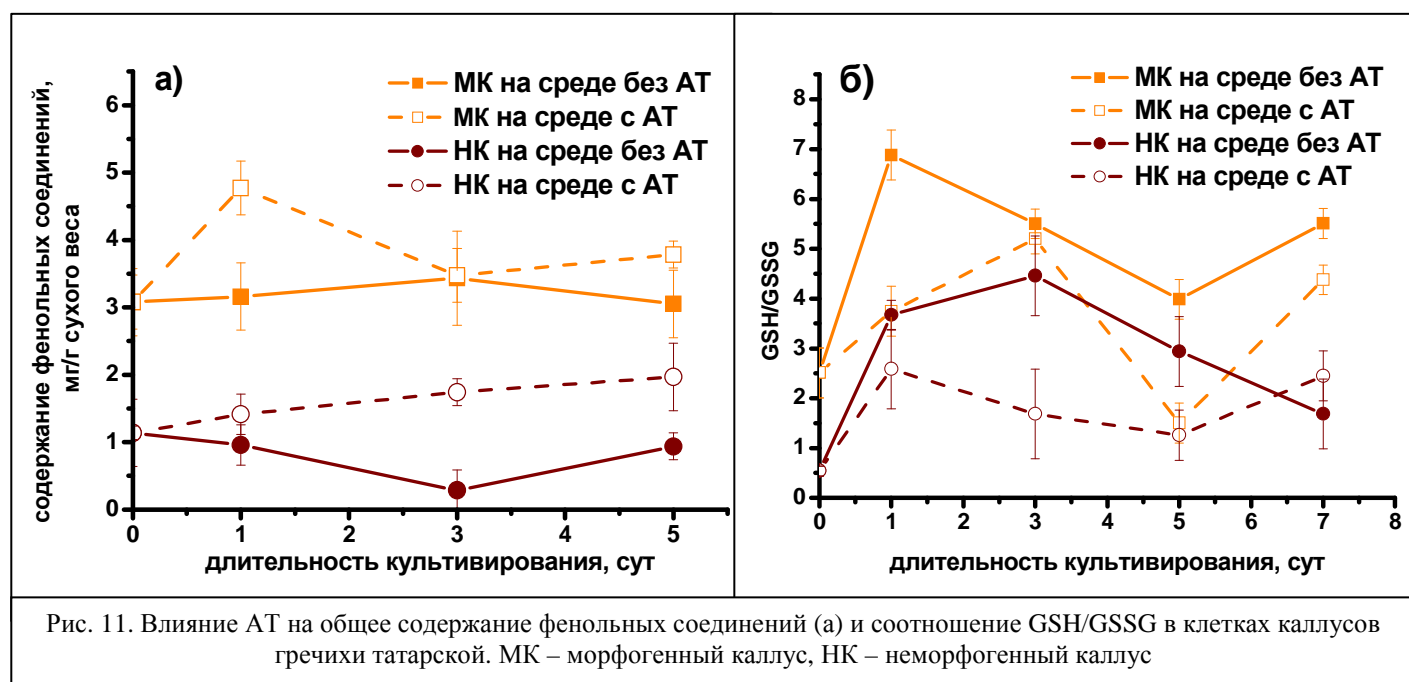


Рис. 10. Влияние АТ на активность глутатионредуктазы в клетках морфогенного (а) и неморфогенного (б) каллусов гречихи татарской. МК – морфогенный каллус, НК – неморфогенный каллус.

культивирования и до конца пассажа (рис. 8б). Также было обнаружено увеличение содержания МДА по сравнению с контролем, как в морфогенном каллусе, так и в неморфогенном каллусе при культивировании на среде с АТ. При этом, содержание МДА в клетках морфогенного каллуса увеличивалось максимально до 10 мкмоль/г сух веса, тогда как в неморфогенном каллусе до 28 мкмоль/г сух веса. Таким образом, результаты наших исследований показывают, что гибель клеток неморфогенного каллуса могла быть вызвана окислительным стрессом, индуцированным действием АТ.

Исследование ферментативных и неферментативных антиоксидантных систем показало, что неморфогенный каллус, так же как и морфогенный, реагирует на стресс, вызванный добавлением в среду культивирования ингибитора каталазы АТ, запуском защитных механизмов. Обращает на себя



внимание значительное увеличение активности АПО в неморфогенном каллусе при выращивании на среде с АТ (рис.9б). Это наблюдение еще раз подтверждает, что АПО является основным компенсаторным механизмом защиты при недостатке активности каталазы. Тем не менее, этот ответ в клетках неморфогенного каллуса характеризуется кратковременностью, что не может обеспечить высокой эффективности в устранении перекиси водорода. Активность глутатионредуктазы в клетках неморфогенного каллуса также увеличивается, но незначительно по сравнению с морфогенным (рис.10). В функционировании неферментативной антиоксидантной системы неморфогенного каллуса также наблюдаются изменения при действии АТ. Увеличение содержания фенольных соединений при выращивании неморфогенного каллуса на среде с АТ сопровождается увеличением их антиоксидантной активности, однако общее содержание фенолов остается более низким по сравнению с морфогенным каллусом (рис.11а). Обработка АТ приводит в обеих культурах к снижению как общего содержания глутатиона, так и показателя GSH/GSSG (рис.11б), что свидетельствует о развитии стресса в обеих культурах. Тем не менее, в клетках неморфогенного каллуса при действии АТ ингибирование системы глутатиона выражено более сильно. Таким

образом, запускаемые неморфогенным каллусом защитные механизмы оказываются малоэффективными, в результате чего в клетках накапливаются высокие концентрации перекиси водорода и МДА и клетки погибают.

2.6. Характеристика морфогенного каллуса гречихи татарской, полученного при действии АТ

Для того, чтобы изучить последствия окислительного стресса, вызванного АТ на морфогенную активность каллуса, мы переносили каллусы на среду без ингибитора и культивировали их в течение нескольких пассажей. Несмотря на то, что 1 и 2 пассажи характеризовались слабым ростом культуры, вследствие значительной гибели клеток, мы не наблюдали выщепления рыхлых неморфогенных клонов, как, например, это было показано ранее после воздействия колхицина (Мухитов, Румянцева, 2002). После переноса морфогенного каллуса со среды с ингибитором на среду без АТ на 4-ом пассаже мы наблюдали выщепление каллуса, отличающегося от исходной культуры желтой окраской и более мелкими ПЭКК. Этот каллус в дальнейшем культивировали как линию 1-8АТ на среде РХ без ингибитора. Отличительной цитологической особенностью клеток линии 1-8АТ было уменьшение размеров клеток по сравнению с исходной линией морфогенного каллуса. Образующиеся соматические зародыши в этой линии, также как и ПЭКК, а митотическая активность ниже по сравнению с исходной линией морфогенного каллуса. На среде с АТ линия 1-8АТ 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. Следует отметить, что клетки линии исходного морфогенного каллуса погибали на втором пассаже с АТ. Устойчивость к АТ сохранялась в линии 1-8АТ на среде без ингибитора более 45 пассажей. Было установлено, что по сравнению с исходным морфогенным каллусом линия 1-8АТ имела значительно меньшую активность каталазы, которая была сравнима с активностью каталазы неморфогенного каллуса, полученного из того же морфогенного каллуса, что и 1-8АТ. Тем не менее, содержание перекиси водорода было сопоставимо в клетках исходной и полученной линий. Исследование содержания другого индикатора развития окислительного стресса в клетках - МДА показало, что его уровень был значительно ниже в линии 1-8АТ по сравнению с исходным каллусом (0.9 ± 0.17 в линии 1-8 АТ и 3.2 ± 0.7 в линии 1-8 в расчете на мкмоль/г сухого веса), что указывает на сохранение оптимального баланса АФК в клетках линии 1-8АТ. Низкий уровень внутриклеточной перекиси водорода в линии 1-8АТ, вероятно, обеспечивается другими ферментативными или неферментативными антиоксидантами. Тем не менее, активность АПО, другого фермента, вносящего вклад в устранение перекиси водорода, в линии 1-8АТ в ходе пассажа существенно не отличалась от родительской линии.

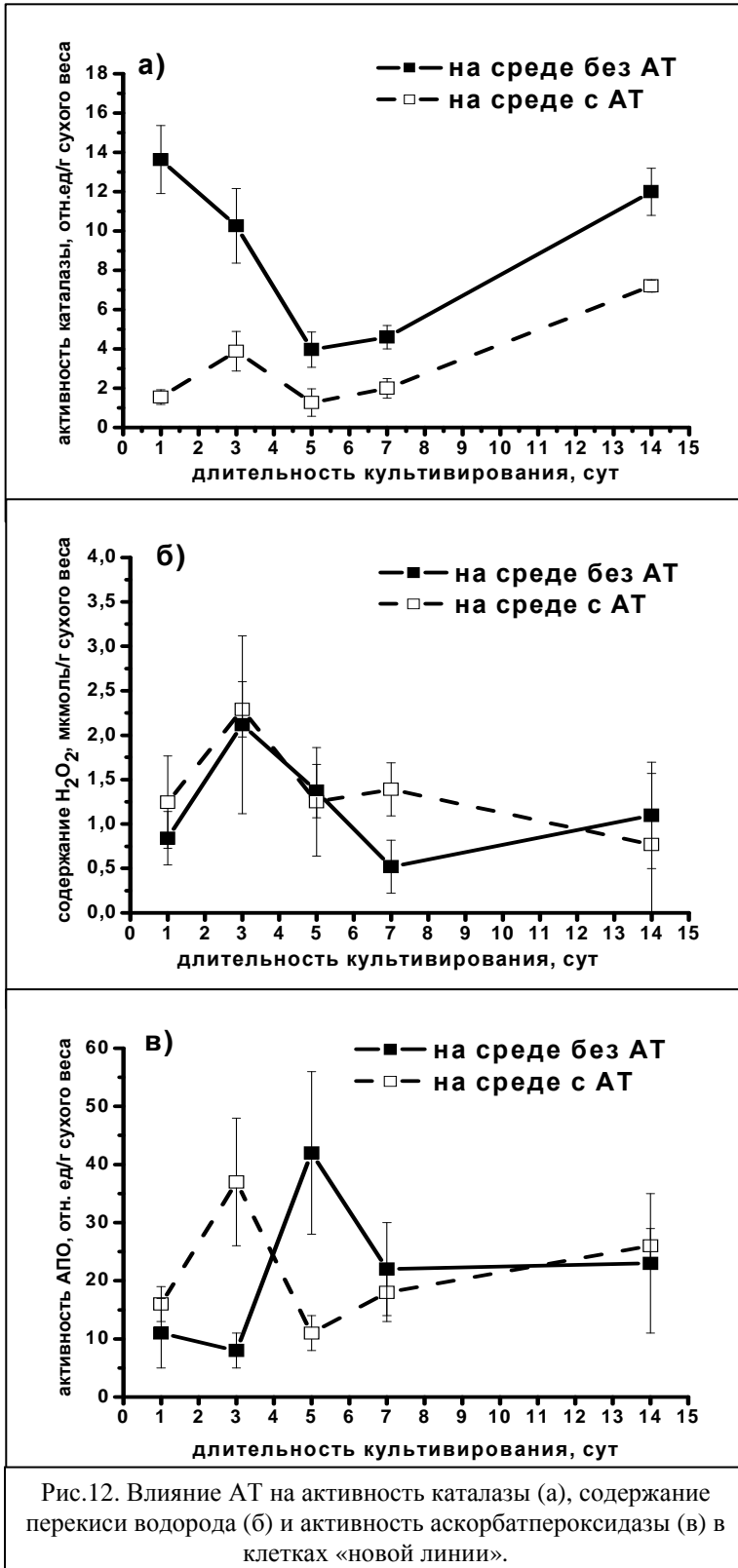
Можно было предположить, что устойчивость к АТ в 1-8АТ была связана с изменением гена каталазы. Для проверки данного предположения каллус линии 1-8АТ был высажен на среду с ингибитором каталазы. Нами было установлено, что АТ ингибирует активность каталазы в клетках

устойчивой линии (рис. 12а). При этом, несмотря на снижение активности каталазы по сравнению с контролем, повышения содержания перекиси водорода в клетках линии 1-8АТ на среде с АТ не происходило (рис. 12б). Рядом авторов было отмечено (Yi et al., 1997; Bayliak et al., 2007), что ингибирование активности каталазы с помощью АТ приводит к компенсаторной активации других антиоксидантных ферментов, в частности, АПО и глутатионредуктазы. Тем не менее, мы не

наблюдали повышения активности АПО в клетках линии 1-8АТ на среде с ингибитором (рис.12в).

Известно, что клеточный цикл (деление клеток) и растяжение клеточных стенок находятся под ауксиновым контролем (Perrot-Rechenmann, 2010). Мы полагаем, что в 1-8АТ произошли изменения в синтезе или метаболизме ауксина; с этим могут быть связаны меньшие размеры клеток и снижение митотической активности. Низкая активность каталазы на фоне низкого содержания внутриклеточной перекиси водорода также могут свидетельствовать о снижении общей метаболической активности в 1-8АТ. В этом случае «приходная» часть H_2O_2 , образующаяся в ходе окислительно-восстановительных реакций также должна быть меньшей по сравнению с более активно пролиферирующими культурами, поэтому ингибирование активности «низкой» каталазы аминотриазолом компенсируется значительно меньшей активацией других компенсаторных механизмов (например, синтезом фенолов) по сравнению с морфогенным каллусом.

Таким образом, показано, что в линии 1-8АТ, устойчивой к действию специфического ингибитора каталазы - АТ, каталаза была чувствительна к действию этого ингибитора. При этом подавление активности каталазы при действии АТ 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 1-8АТ. Выяснение этих механизмов в ходе дальнейших исследований представляет важность для понимания механизмов адаптации клеток растений к стрессовым воздействиям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что морфогенные культуры разных видов растений могут иметь разную морфологию (например, изучаемые нами морфогенные каллусы гречихи посевной и татарской морфологически различны), неморфогенные, полностью потерявшие способность к образованию меристем, каллусные культуры различных видов растений, как правило, отличаются рыхлой структурой, высокой скоростью роста, генетически нестабильны и имеют измененный метаболизм (Yeoman, Forche, 1980; Satoh, 1998; Kim et al., 2006). Нами впервые было показано, что неморфогенные каллусы двух видов гречихи, полученные либо в результате длительного культивирования (гречиха посевная), либо периодически выщепляющиеся в виде клонов на стабильном морфогенном каллусе вне зависимости от длительности культивирования (гречиха татарская), характеризуются увеличением содержания перекиси водорода по сравнению с исходными морфогенными культурами. Ранее было установлено, что в неморфогенных каллусах гречихи татарской активность растворимой пероксидазы выше, а активность ионно-связанной с клеточной стенкой пероксидазы значительно ниже, чем в морфогенном (Румянцева и др., 1997). Выявлено, что тиоловая глутатионпероксидаза 1-цис пероксиредоксин экспрессируется только в клетках морфогенных каллусов *F.tataricum* и отсутствует в неморфогенных (Акулов и др., 2010). Проведенные нами исследования показали, что неморфогенные каллусы *F.tataricum* отличаются высокой активностью СОД и АПО и низкой активностью каталазы по сравнению с морфогенными культурами. Содержание фенолов в морфогенном каллусе и соотношение восстановленной формы глутатиона к окисленной всегда выше, чем в неморфогенном каллусе. Все эти данные свидетельствуют о серьезных изменениях в редокс-метаболизме неморфогенных культур. Перестройки в редокс-метаболизме клеток ведут к изменению сигналинга и клеточной регуляции. В нашем случае, это согласуется с ранее полученными данными о более низком уровне Ca²⁺- и цАМФ-зависимого фосфорилирования внутриклеточных и внеклеточных белков в клетках неморфогенных каллусов по сравнению с морфогенными, а также различии между культурами как по количеству фосфорилируемых по остаткам тирозина белков, так и по степени их фосфорилирования (Румянцева и др., 2010).

Ранее была выявлена большая чувствительность неморфогенных каллусов *F.tataricum* к действию колхицина (Мухитов, 2000; Мухитов, Румянцева, 2002) и салициловой кислоты (Максютова и др., 2005), которая выражалась в быстрой гибели культуры после стрессового воздействия. Нами было показано аналогичное действие на эти культуры ингибитора каталазы АТ. В то же время было установлено, что в неморфогенном каллусе на среде с АТ происходит активация как ферментативных, так и неферментативных антиоксидантных систем, однако она является

малоэффективной и культура погибает от окислительного стресса. Следовательно, неморфогенные культуры гречихи татарской характеризуются не только измененным редокс-метаболизмом, но и меньшей способностью адаптироваться к различным стрессорам по сравнению с морфогенными культурами. Тогда как в морфогенных каллусах возможны переключения между различными путями защиты. Как было нами показано, в морфогенных каллусах (как в родительском, так и полученном из него устойчивом к АТ) АТ ингибирует активность каталазы, но не вызывает увеличения внутриклеточного содержания перекиси водорода. При этом если для родительской линии защита от окислительного стресса при ингибировании каталазы, в первую очередь, обусловлена значительной активацией АПО, то в устойчивом к АТ каллусе АПО при ингибировании каталазы не активируется и, следовательно, задействован другой механизм компенсации.

Полученные нами результаты, а также данные литературных источников позволяют предполагать, что окислительный стресс (повышенное содержание АФК, в частности перекиси водорода) может быть, во-первых, одной из причин появления полиплоидных неморфогенных клеток, во-вторых, регулятором измененного метаболизма и сигналинга в неморфогенных культурах, а, в-третьих, фактором, усиление которого вызывает смерть клеток неморфогенных каллусов. Эта ситуация близка к той, которая описана для опухолевых клеток животных, в которых прооксидантный редокс-статус необходим, с одной стороны, для индукции неоплазии и поддержания опухолевого роста, но, с другой стороны, является мишенью для раковой терапии (Schumacker, 2006).

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что неморфогенные каллусы гречихи, независимо от способа их получения и видовой принадлежности - в результате постепенной потери морфогенной способности при длительном культивировании (гречиха посевная) или спонтанном выщеплении неморфогенных клонов на морфогенном каллусе вне зависимости от длительности культивирования (гречиха татарская) - характеризуются увеличением содержания перекиси водорода по сравнению с исходными морфогенными культурами.
2. Впервые показано, что в клетках морфогенных и полученных из них неморфогенных каллусов гречихи татарской существует определенная закономерность: неморфогенные каллусы характеризуются значительно более высоким содержанием перекиси водорода и малонового диальдегида, высокой активностью супероксиддисмутазы и аскорбатпероксидазы и низкой активностью каталазы по сравнению с морфогенными культурами. Содержание фенолов и соотношение восстановленной формы глутатиона к окисленной в морфогенных каллусах всегда выше, чем в неморфогенных.
3. Электронномикроскопическое изучение цитохимической реакции перекиси водорода с хлористым церием показало, что, перекись водорода в клетках как морфогенного, так и неморфогенного каллуса гречихи татарской локализована в клеточных стенках и межклетниках. Несмотря на высокое содержание перекиси водорода в клетках неморфогенного каллуса, ее локализации в вакуоли, на тонопласте и органеллах обнаружено не было, что может

свидетельствовать об отсутствии сильного окислительного стресса в клетках неморфогенного каллуса.

4. Показано, что культивирование каллусных культур на среде с ингибитором каталазы 3-амино-1,2,4-триазолом вызывает гибель значительной части клеток неморфогенного каллуса, подавляет рост и снижает жизнеспособность клеток морфогенного каллуса.

5. Выявлено, что в обоих типах каллуса на среде с 3-амино-1,2,4-триазолом происходит активация как ферментативных, так и неферментативных антиоксидантных систем. Однако в случае неморфогенного каллуса она, вероятно, является малоэффективной и культура погибает от окислительного стресса. Следовательно, неморфогенные культуры гречихи татарской характеризуются не только измененным редокс-метаболизмом, но и меньшей способностью адаптироваться к окислительному стрессу по сравнению с морфогенными культурами.

6. Воздействие 3-амино-1,2,4-триазола на морфогенную культуру привело к образованию морфогенного каллуса, отличающегося от исходного по морфологии, размеру клеток, пролиферативной активности и обладающего устойчивостью к действию данного ингибитора. В отличие от исходного каллуса, активность аскорбатпероксидазы в устойчивом каллусе при действии 3-амино-1,2,4-триазола не увеличивается, следовательно, в его клетках задействован другой механизм компенсации.

ОСНОВНЫЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. Камалова (Сибгатуллина), Г.В. Сравнение редокс-статуса клеток морфогенных и полученных из них неморфогенных каллусов гречихи татарской / Г.В. Камалова (Сибгатуллина), А.Н.Акулов, Н.И. Румянцева // Биохимия. – 2009. – Т.74, вып. 6. – С. 842-852.
2. Камалова (Сибгатуллина), Г.В. Изменение морфо-цитогенетических и биохимических характеристик культивируемых клеток гречихи посевной при длительном культивировании / Г.В. Камалова (Сибгатуллина), Л.Р.Нигматуллина, Н.И. Румянцева // Ученые записки Казанского государственного университета. – 2009. – Т. 151, книга 4. - С. 103-112.
3. Камалова (Сибгатуллина), Г.В. Двумерный гелеэлектрофорез, проводимый в неденатурирующих условиях, как эффективный метод исследования спектров антиоксидантных ферментов у растений / Г.В. Камалова (Сибгатуллина), А.Н. Акулов, Н.И. Румянцева // Аграрная Россия. – 2009. – Спец. выпуск. – С. 86.
4. Получение и характеристика устойчивой к аминотриазолу линии морфогенного каллуса *Fagopyrum tataricum* / Г.В. Сибгатуллина, Н. И. Румянцева, Л. Р. Хаертдинова и др. // Физиология растений. – 2012. - Т. 59 (принята к печати).

Работы, опубликованные в материалах конференций и др. изданиях

5. Динамика содержания перекиси водорода и активности антиоксидантных ферментов в ходе пассажа каллусных культур гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. с различной морфогенной способностью / А.Н. Акулов, Г.В. Камалова (Сибгатуллина), А.Р. Мухитов и др. //

- Вестник Харьковского государственного аграрного университета. – 2005. - Серия Биология. - Вып. 1 (6). – С. 69-74.
6. Миргалеева, Р.Г. Влияние ингибитора каталазы 3-амино-1,2,4-триазола на рост и содержание H_2O_2 в клетках морфогенного каллуса гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. / Р.Г. Миргалеева, **Г.В. Камалова (Сибгатуллина)**, Н.И. Румянцева // Сб. статей / КГУ - Казань, 2006 г. – С.12-14.
 7. **Камалова (Сибгатуллина), Г.В.** Действие ингибитора каталазы 3-амино-1,2,4-триазола на ростовые параметры и содержание H_2O_2 в клетках морфогенного каллуса гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. / **Г.В. Камалова (Сибгатуллина)**, А.Н. Акулов, Н.И. Румянцева // Сб. тез. / Ростов-на-Дону, 2006. – С. 98.
 8. **Камалова (Сибгатуллина), Г.В.** Антиоксидантные ферменты в каллусах гречихи с различной способностью к морфогенезу / **Г.В. Камалова (Сибгатуллина)**, А.Н.Акулов, Н.И. Румянцева // Сб. статей / Изд-во КГУ. – Казань, 2007. - С.141-145.
 9. **Камалова (Сибгатуллина), Г.В.** Изменение активности и спектров антиоксидантных ферментов в ходе каллусогенеза и эмбриоидогенеза. / **Г.В. Камалова (Сибгатуллина)**, А.Н. Акулов, Н.И. Румянцева // Сб. мат. / Уфа, 2007. - С.57.
 10. **Камалова (Сибгатуллина), Г.В.** Сравнение уровня окислительного стресса в различных компартментах морфогенного каллуса гречихи татарской / **Г.В. Камалова (Сибгатуллина)**, А.Н. Акулов, Н.И. Румянцева // Сб. тез. / Пушино, 2007. - С.143.
 11. **Камалова (Сибгатуллина), Г.В.** Сравнение хромосомной изменчивости, содержания внутриклеточной H_2O_2 и активности антиоксидантных ферментов в каллусах двух видов гречихи / **Г.В. Камалова (Сибгатуллина)**, А.Н. Акулов, Н.И. Румянцева // Сб. тез. / Сыктывкар, 2007. - С.170.
 12. **Камалова (Сибгатуллина), Г.В.** Влияние ингибитора каталазы 3-амино-1,2,4-триазола на окислительный статус клеток морфогенного каллуса гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. / **Г.В. Камалова (Сибгатуллина)**, А.Н.Акулов, Н.И. Румянцева // Сб. мат. / Изд-во СО РАН - Новосибирск, 2007. - С. 322-326.
 13. Нигматуллина, Л.Р. Влияние длительного культивирования на регенерационную способность, генетическую вариабельность и окислительный статус клеток каллусов гречихи посевной / Л.Р. Нигматуллина, **Г.В. Камалова (Сибгатуллина)**, Н.И. Румянцева // Сб. статей / Изд-во КГУ - Казань, 2008. – С. 80-83.
 14. Нигматуллина, Л.Р. Генетическая вариабельность и изменение редокс-статуса клеток каллусов гречихи посевной при длительном культивировании / Л.Р. Нигматуллина, Н.И. Румянцева, **Г.В.Камалова (Сибгатуллина)** // Сб. статей / Изд-во КГУ - Казань, 2008. - С. 22-25.
 15. **Камалова (Сибгатуллина), Г.В.** Адаптация к окислительному стрессу *in vitro* каллусных культур гречихи татарской с различной способностью к морфогенезу / **Г.В. Камалова (Сибгатуллина)**, А.Н. Акулов, Н.И. Румянцева // Сб. тез. / Звенигород, 2008. - С.160.
 16. Нигматуллина, Л.Р. Влияние длительного культивирования на регенерационную способность, генетическую вариабельность и окислительный статус клеток каллусов гречихи посевной / Л.Р.

- Нигматуллина, **Г.В. Камалова (Сибгатуллина)**, Н.И. Румянцева // Сб. трудов / Изд-во КГУ - Казань, 2008. – С. 63.
17. Nigmatullina, L.N. The sensitivity of tatar buckwheat cell cultures to oxidative stress induction by 3-amino-1,2,4-triazole / **G.V. Sibgatullina**, N.I. Romyantseva // Abstr. of the 13th annual Symposium for Biology Students of Europe «SymBioSE 2009» / Kazan state university - Kazan, 2009. - P. 86.
18. **Камалова (Сибгатуллина), Г.В.** Образование устойчивой к аминотриазолу линии морфогенного каллуса *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. / **Г.В. Камалова (Сибгатуллина)**, А.Н. Акулов, Н.И. Румянцева // Сб. тез. / Ялта, 2009. – С.33.
19. Нигматуллина, Л.Р. Воздействие 3-амино-1,2,4-триазола на культивируемые клетки *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. / Л.Р. Нигматуллина, **Г.В. Сибгатуллина**, Н.И. Румянцева // Сб. мат. / Иркутск, 2009. - С.321-324.
20. **Sibgatullina, G.** The alteration of morphological, cytogenetical and biochemical characteristics of common buckwheat calli during long-term culture / **G. Sibgatullina**, L. Nigmatullina, N. Romyantseva // Proceedings of the 11th International Symposium on Buckwheat / Orel, 2010. – P. 246 – 252.
21. **Сибгатуллина, Г.В.** Влияние ингибитора каталазы 3-амино-1,2,4-триазола на динамику антиоксидантных систем каллусов гречихи татарской с различной морфогенной активностью / **Г.В. Сибгатуллина**, Л.Р. Хаертдинова, Н.И. Румянцева // Мат. докл. / Нижний Новгород, 2011. - часть II, С. 630-631.
22. Изучение цитохимической локализации пероксида водорода в каллусных культурах гречихи татарской / Ю.А. Костюкова, Н.И. Румянцева, Л.Р.Хаертдинова, **Г.В. Сибгатуллина** // Мат. докл. / Нижний Новгород, 2011. - часть I, С. 368 – 369.