

## Различная реакция каллусных линий лиственницы на окислительный стресс, индуцируемый паракватом

Е. Ю. Гарник, Ю. М. Константинов, В. Н. Шмаков

Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук  
Ул. Лермонтова, 132, Иркутск, 664033, Российская Федерация

*Изучено влияние низких (0,1—100 нМ) концентраций параквата на ростовые характеристики восьми каллусных линий лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и трех каллусных линий лиственницы даурской (*Larix gmelinii* Rupr. Rupr.). Линии с наибольшей скоростью роста в контрольных условиях были наиболее чувствительными к действию используемых концентраций параквата. Показано, что культивирование клеток *in vitro* в присутствии низких концентраций параквата позволяет дифференцировать каллусные линии лиственницы по признаку устойчивости к окислительному стрессу.*

**Введение.** Гербицид паракват (1,1'-диметил-4,4'-дипиридилийдихлорид) традиционно используется в качестве стресс-индуцирующего агента при изучении реакции живых систем на окислительный стресс [1]. В растительной клетке молекула параквата восстанавливается фотосистемой I либо элементами электронно-транспортной цепи митохондрий, а затем самопроизвольно окисляется, передавая электрон на молекулу кислорода, что приводит к образованию супероксидного радикала. Повышенное образование супероксидных радикалов вызывает развитие окислительного стресса [1, 2].

Клеточные механизмы устойчивости растений к окислительному стрессу до сих пор изучены недостаточно [1, 3]. В последние годы [4—6] для изучения этих вопросов все чаще используют культуры растительных клеток, дающие возможность работать с более простым и однородным материалом в контролируемых условиях [7]. Однако задача оценки степени чувствительности культуры клеток к окислительному стрессу не проста, поскольку эта чувствительность часто зависит от метаболической активности клеток [8]. В случае же каллус-

ных линий в отличие от целых растений и органов уровень метаболической активности может сильно различаться от линии к линии вследствие таких специфических особенностей культур *in vitro*, как повышение частоты мутационных событий при дифференцировке клеток в ходе каллусообразования, соматоклональная вариабельность, миксоплоидия клеточной популяции [9].

Цель настоящей работы состояла в разработке метода, который позволил бы оценить базовую составляющую чувствительности растительной клетки к окислительному стрессу, определяющуюся в большей степени генетическими, чем физиологическими параметрами, и дифференцировать каллусные линии лиственницы по степени такой чувствительности.

**Материалы и методы.** В экспериментах использовали восемь каллусных линий лиственницы сибирской и три каллусные линии лиственницы даурской. Девять из 11 использованных линий получены из зародышей разных семян лиственниц сибирской и даурской. Две линии — 2а и 9а — представляли собой соматоклональные производные линий 2 и 9, отличающихся от исходных линий скоростью роста и цветом каллуса (таблица).

На момент начала описываемых экспериментов линии 1—9 поддерживали в культуре в течение

## Индивидуальные характеристики каллусных линий сибирской и даурской лиственниц и их реакция на присутствие параквата

Линия	Цвет каллуса	Абсолютный прирост в контроле, нг	Концентрация параквата, нМ	Наименьшая концентрация параквата, угнетающая рост, нМ	Относительный прирост на среде, содержащей 10 нМ параквата, %
2*	Темно-зеленый	113±13	0,1; 1,0; 10,0	—	141±11***
3*	Желтый	119±20	0,1; 1,0; 10,0	—	105±18
4*	Зеленый	126±21	0,1; 1,0; 10,0	0,1	61±9***
5*	Желтый	137±14	0,1; 1,0; 10,0	—	93±13
6*	Зеленый	173±19	0,1; 1,0; 10,0	1,0	71±8***
7*	Желто-зеленый	199±21	0,1; 1,0; 10,0	0,1	64±13***
8*	Темно-зеленый	215±14	0,1; 1,0; 10,0	10,0	68±7***
9*	Светло-зеленый	342±34	0,1; 1,0; 10,0	0,1	50±4***
1**	Желто-зеленый	106±11	10,0; 50,0; 100,0	10,0	71±1***
2а*	Светло-зеленый	718±27	10,0; 50,0; 100,0	50,0	104±4
9а*	Темно-зеленый	171±9	10,0; 50,0; 100,0	—	76±13

Примечание. Представлены средние арифметические из 8—12 повторностей по каждому эксперименту и их стандартные ошибки. Повторностью считали каллус, выращенный в отдельном флаконе. Каллусные линии лиственниц \*сибирской и \*\*даурской. \*\*\*Достоверные различия с контролем при уровне вероятности  $p < 0,005$ .

восьми пассажей, соматоклональные варианты 2а и 9а — в течение шести пассажей.

Культуры поддерживали на агаризованной среде следующего состава: минеральные соли по Мурасиге и Скугу [10] — половинный состав, сахара — 30 г/л, мезо-инозитол — 80 мг/л, тиамин — 1,0 мг/л, НУК — 1,0 мг/л, БАП — 0,2 мг/л, паракват — от 0,1 до 100 нМ. Культуру поддерживали в освещенном термостатируемом боксе при температуре 25 °С при интенсивности освещения 1000 лк и периоде светового дня 16 ч. Продолжительность одного цикла субкультивирования каллусов составляла 21 сут.

Массу конечного прироста определяли как разницу свежей массы каллуса в конце субкультивирования и его начальной свежей массы, учтенной при закладке опыта и выравненной для всех повторностей каждого эксперимента. Относительный прирост вычисляли как выраженное в процентах отношение свежей массы конечного прироста каллуса на среде, содержащей паракват, к средней свежей массе прироста каллуса в контрольных условиях.

Каждый эксперимент проводили в 10—12 повторностях. Повторностью считали каллус, растущий в отдельном флаконе с питательной средой. Результаты обрабатывали методами параметрической статистики. Определяли средние, ошибки средних, стандартные отклонения и ошибки стан-

дартных отклонений. Достоверность различий результатов оценивали, используя критерий Стьюдента, различия считали достоверными при уровне вероятности  $p < 0,05$ . Для выявления связи между степенью угнетения роста каллуса на среде с паракватом и скоростью его роста в контрольных условиях вычисляли коэффициент корреляции [12].

Результаты и обсуждение. Цель начальных экспериментов состояла в подборе такой концентрации параквата, действие которой было бы наиболее различным для разных каллусных линий.

В первой серии экспериментов каллусы восьми линий лиственницы выращивали на средах, содержащих паракват в концентрациях 0,1; 1 или 10 нМ (рис. 1).

Наименьшая из использованного ряда концентрация, вызывающая угнетение роста каллусов, составляла 0,1 нМ — для трех из восьми линий, 1 нМ — для одной линии, 10 нМ — для одной линии (таблица). Угнетение роста на этой среде составило от 25 (линия 9) до 41 % (линия 4), на среде, содержащей 1 нМ параквата, — 35 %, 10 нМ параквата — 32 % (рис. 1).

Концентрация 0,1 нМ достоверно замедляла рост каллусов для трех из восьми исследованных линий, 1 нМ — для четырех, 10 нМ — для пяти линий из восьми. Для трех из восьми линий (линии 2, 3, 5) ни одна из использованных концентраций параквата не угнетала роста каллусов (рис. 1).

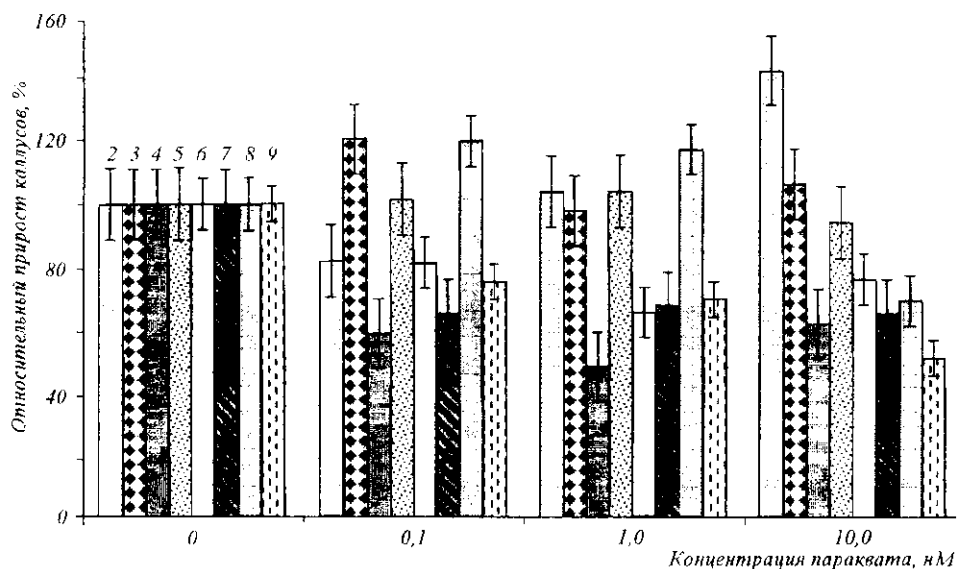


Рис. 1. Относительный прирост каллусных линий лиственницы на средах, содержащих паракват в концентрациях 0,1, 1 и 10 нМ (Цифры над столбиками — номера линий)

Для одной из исследованных линий наблюдали увеличение прироста каллуса в присутствии параквата: на среде, содержащей 10 нМ параквата, прирост каллусов линии 2 составлял 141 % по сравнению с приростом в контрольных условиях (рис. 1).

Во второй серии экспериментов каллусы трех линий (1, 2а и 9а) выращивали на средах, содержащих паракват в более высоких концентрациях: 10, 50 и 100 нМ (рис. 2).

Концентрация параквата 10 нМ достоверно угнетала рост каллусов для одной из трех исследованных линий (линия 1), 50 нМ — для двух (линии 1 и 2а), 100 нМ — для двух из трех линий (линии 1 и 2а). Наименьшая концентрация параквата, угнетающая рост, составляла 10 нМ для каллусов линии 1 и 50 нМ — для каллусов линии 2а. Ни одна из использованных концентраций параквата не угнетала роста каллусов линии 9а. В экспериментах данной серии случаев стимуляции роста каллусов в присутствии параквата не наблюдали (рис. 2).

По результатам описанных экспериментов для оценки различий между каллусными линиями по чувствительности к окислительному стрессу была выбрана концентрация параквата 10 нМ, позволяющая выявлять наиболее тонкие различия.

В двух сериях экспериментов 11 каллусных линий — три линии лиственницы даурской и восемь линий лиственницы сибирской — тестировали на средах, содержащих паракват в концентрации 10 нМ (таблица). Все три линии даурской лиственницы были чувствительными к присутствию пара-

квата в данной концентрации, уменьшение прироста составило от 29 до 35 %. Из восьми исследованных линий лиственницы сибирской четыре не были чувствительными к этой концентрации параквата, для одной наблюдали увеличение прироста на 41 %, для трех — уменьшение прироста на 32—50 % (таблица).

Сравнивая влияние параквата на рост каллусов линий, различающихся по скорости роста, мы обнаружили связь между степенью угнетения роста каллуса на среде с паракватом и скоростью его роста в контрольных условиях: наиболее быстрорастущие линии оказались наиболее чувствительными к действию используемой концентрации параквата (рис. 3). Коэффициент корреляции между этими параметрами составил  $-0,6$ . Однако для одной из 11 исследованных нами линий (линия 2а) на среде с 10 нМ параквата отмечен значительно более высокий прирост, чем следовало бы ожидать исходя из обнаруженной зависимости (рис. 3). По нашему мнению, данная линия может представлять интерес с точки зрения изучения молекулярных механизмов устойчивости лиственницы к окислительному стрессу.

Как правило, при использовании параквата в качестве стресс-индуцирующего агента его концентрации рассчитывают так, чтобы резко затормозить рост контрольных растений или привести к их гибели. Обработку раствором параквата проводят в течение короткого времени, затем исследуют возникшие в тканях изменения [12—14]. Этот подход не дает представления о воздействии на клетку менее интенсивного окислительного стресса, харак-

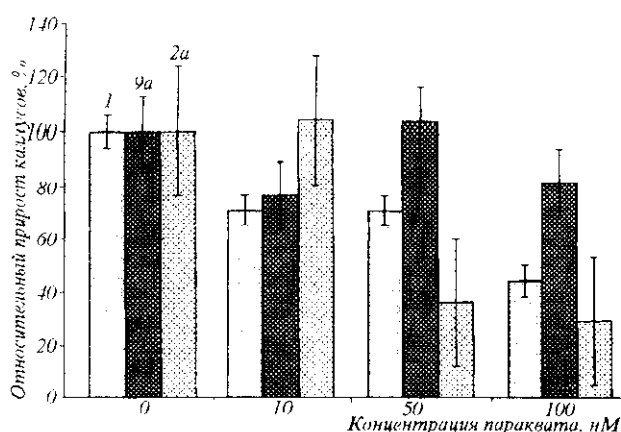


Рис. 2. Относительный прирост каллусных линий лиственницы на средах, содержащих паракват в концентрациях 10, 50 и 100 нМ (Цифры над столбиками — номера линий)

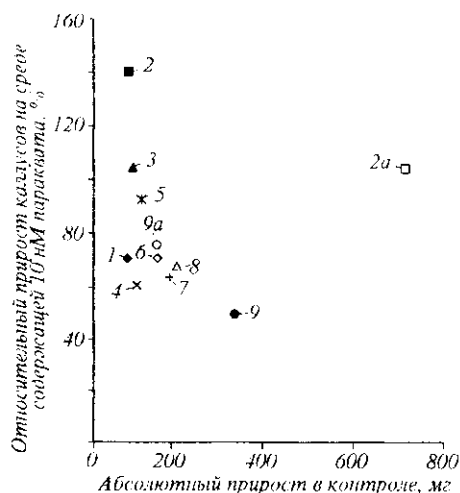


Рис. 3. Связь между относительным приростом каллусных линий на среде, содержащей 10 нМ параквата, и их абсолютным приростом в контрольных условиях. Цифры на графике обозначают номера линий, соответствующих приведенным в таблице

терного для естественных условий. Применяя высокие концентрации параквата, трудно или вообще невозможно исследовать внутривидовой полиморфизм в отношении устойчивости к окислительному стрессу.

Мы использовали значительно более низкие, чем принято, концентрации параквата. Тем не менее, при концентрации параквата 10 нМ наблю-

дилось угнетение роста у шести из 11 исследованных каллусных линий. Оказалось, что эта концентрация параквата заметно различается по действию на рост каллусных линий лиственниц: от существенного угнетения роста (шесть случаев из 11) и отсутствия выраженной реакции (четыре линии) до стимуляции роста (одна линия) (таблица). Такие различия в реакции на присутствие параквата позволяют сделать вывод о возможности оценки различий каллусных линий по их устойчивости к окислительному стрессу.

**Выводы.** Характер влияния низких концентраций параквата на рост каллусных линий лиственницы неодинаков для разных линий. При использовании концентрации параквата 10 нМ отмечена различная реакция исследованных каллусных линий: от угнетения роста либо отсутствия выраженной реакции до стимуляции роста. При этом линии с наибольшей скоростью роста в контрольных условиях проявляли наибольшую чувствительность к действию используемых концентраций параквата. Мы предположили, что существование каллусных линий, для которых вышеуказанная зависимость не соблюдается, представляет интерес с точки зрения исследования механизмов повышенной или пониженной устойчивости к окислительному стрессу. Таким образом, культивирование каллусов на средах, содержащих паракват в низких концентрациях, дает принципиальную возможность дифференцировать каллусные линии по их чувствительности к окислительному стрессу, предположительно определяющейся особенностями генотипа каждой каллусной линии.

Исследования выполнены при финансовой поддержке шестого Конкурса-экспертизы научных проектов молодых ученых РАН по фундаментальным и прикладным исследованиям (грант № 274) и гранта ИНТАС 2001—0358.

E. Yu. Garnik, Yu. M. Konstantinov, V. N. Smakov

The distinctions of paraquat induced oxidative stress sensitivity of larch callus lines

Summary

The effect of low paraquat concentrations on the growth properties of eight siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) and three dahurian larch (*Larix gmelinii* Rupr. Rupr.) callus lines was studied. It was found that the extent to which callus growth decrease does not depend on callus line growth rate in control conditions. The possibility have been shown to differentiate larch callus lines with their oxidative stress sensitivity. No differences were found among callus lines of siberian and dahurian larch species in their paraquat sensitivity. The approach described is advanced for use in physiological and molecular biological studies of cell tolerance to oxidative stress.

О. Ю. Гарнік, Ю. М. Константинов, В. М. Шмаков

Різна реакція калюсних ліній листв'яниці на окислювальний стрес, індукований паракватом

#### Резюме

Вивчено вплив низьких (0,1–100 нМ) концентрацій параквату на ростові характеристики восьми калюсних ліній листв'яниці сибірської (*Larix sibirica* Ledeb.) і трьох калюсних ліній листв'яниці даурської (*Larix gmelinii* Rupr. Rupr.). Лінії з найбільшою швидкістю росту за контрольних умов були найчутливішими до дії використаних концентрацій параквату. Показано, що культивування клітин *in vitro* в присутності низьких концентрацій параквату дозволяє диференціювати калюсні лінії листв'яниці за ознакою стійкості до окислювального стресу.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Bowler C., Van Montagu M., Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance // *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*—1992.—**43**.—P. 83–116.
2. Babor B. M. Superoxide: a two-edged sword // *Braz. J. Med. Biol. Res.*—1997.—**30**.—P. 141–155.
3. Allen R. D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants // *Plant Physiol.*—1995.—**107**.—P. 1049–1054.
4. Olmos E., Hernandez J. A., Sevilla F., Hellin E. Induction of antioxidant enzymes in the selection of a salt-tolerant cell line of *Pisum sativum* // *J. Plant Physiol.*—1994.—**144**.—P. 594–599.
5. Vazquez-Flota F. A., Lagola-Vagras V. M. A *Catharanthus roseus* salt tolerant line. I. Selection and characterization // *J. Plant Physiol.*—1994.—**144**.—P. 116–120.
6. Roy M., Ghosh B. Polyamines, both common and uncommon. Under heat stress in rice (*Oryza sativa*) callus // *Physiol. Plantarum.*—1996.—**98**.—P. 196–200.
7. Носов А. М. Культура клеток высших растений — уникальная система, модель, инструмент // *Физиология растений.*—1999.—**46**.—С. 837–844.
8. Закарян Н. Г., Айвазян Н. М., Карагезян К. Г. Сравнительный анализ активности супероксиддисмутазы в тканях высших позвоночных // *Докл. РАН.*—2002.—**382**, № 2.—С. 264–266.
9. Кунах В. А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования // *Физиология растений.*—1999.—**46**.—С. 919–929.
10. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue culture // *Physiol. Plant.*—1962.—**15**.—P. 473–497.
11. Лакін Г. Ф. Биометрия.—М.: Высш. школа, 1980.—293 с.
12. Bowler C., Slooten L., Vandenbranden S., De Rycke R., Botterman J., Sybesma C., Van Montagu M., Inze D. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants // *EMBO J.*—1991.—**10**.—P. 1723–1732.
13. Turcsanyi E., Suranyi G., Lehoczki E., Borbely G. Superoxide dismutase activity in response to paraquat resistance in *Coryza canadensis* (L.) Cronq. // *J. Plant Physiol.*—1994.—**144**.—P. 599–606.
14. Iturbe-Ormaetxe I., Escuredo P. R., Arrese-Igor C., Becana M. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat // *Plant Physiol.*—1998.—**116**.—P. 173–181.

УДК 576.535:581.1.04  
Надійшла до редакції 19.02.02