

УДК 577.21

УЧАСТИЕ ОКСИДА АЗОТА В РЕГУЛЯЦИИ РОСТОВОЙ АКТИВНОСТИ НЕМОРФОГЕННОГО КАЛЛУСА ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ

Г.В. Сибгатуллина, А.Н. Акулов, О.В. Горшков, Н.И. Румянцева

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань, 420111, Россия

Аннотация

Исследована роль оксида азота (NO) в регуляции генов клеточного цикла циклина D3;1 (*CYCD3;1*) и циклинзависимой киназы A1;1 (*CDKA1;1*) в каллусе гречихи татарской с высокой ростовой активностью. Максимальный уровень экспрессии гена *CYCD3;1* был отмечен через сутки после пересадки каллуса на свежую среду культивирования, он совпадал с пиком содержания NO и предшествовал пику митотической активности. Экспериментальное увеличение или снижение содержания внутриклеточного NO оказывало влияние на митотическую активность каллусной культуры. При этом добавление в среду культивирования донора NO – нитропруссид натрия – вызывало увеличение уровня экспрессии *CYCD3;1* и митотического индекса каллуса, тогда как добавление скарвенджера NO – 2-(4-карбоксифенил)-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксида (сРТЮ) – приводило к снижению уровня как экспрессии *CYCD3;1*, так и митотической активности. В случае *CDKA1;1* в обоих вариантах воздействия обнаружено снижение уровня экспрессии гена. При этом показано, что и нитропруссид натрия, и сРТЮ вызывают снижение содержания H₂O₂ в клетках каллуса. Таким образом, установлено, что NO может быть вовлечен в регуляцию экспрессии не только гена *CYCD3;1*, но и *CDKA1;1*. Предполагается, что регуляторный эффект NO на экспрессию *CDKA1;1* может быть опосредован изменением редокс-статуса клеток.

Ключевые слова: оксид азота, циклин D3;1, циклинзависимая киназа A1;1, нитропруссид натрия, скарвенджер NO (сРТЮ), пролиферация, каллус

Введение

Активные формы кислорода (АФК) и активные формы азота (АФА) представляют собой ключевые молекулы, обеспечивающие динамичность сигнальных систем клеток растений [1, 2]. Тем не менее, несмотря на их участие во многих аспектах клеточной биологии, понимание регуляции окислительного и особенно нитрозативного сигналинга все еще остается неполным [3].

Установлено, что АФК и АФА координированно регулируют защитные реакции растений на развитие как биотического, так и абиотического стресса [2]. Изучено совместное участие оксида азота и АФК в реакции гиперчувствительности, для которой показан не только окислительный, но и нитрозативный взрыв [4, 5]. Установлено, что при солевом стрессе происходит активация и H₂O₂-индуцируемых, и NO-индуцируемых генов, причем большая их часть перекрывается [6].

Данные последнего десятилетия показывают, что АФА наравне с АФК играют важную роль в регуляции клеточного цикла [7, 8]. Так, исследования экспрессии генов клеточного цикла показали, что NO оказывает активирующее действие на транскрипцию циклина D3;1 (*CYCD3;1*) в клетках томатов и арабидопсиса [8, 9], а АФК вызывает увеличение транскрипционной активности циклинзависимой киназы А (*CDKA1;1*) в суспензионной культуре люцерны [10].

Классическими триггерами клеточного цикла являются гормоны и сахара [11]. В работах Т. Пастернака с соавторами [12, 13] было выявлено, что окислительный стресс и ауксин действуют синергично, индуцируя деления в тканях и протопластах *Arabidopsis thaliana* и протопластах люцерны. Н. Корреа-Арагунде с соавторами [14] пришли к заключению, что NO участвует в распространении ауксинового сигнала, индуцируя экспрессию *CYCD3;1* и, следовательно, активируя клеточный цикл. Авторами было установлено, что при увеличении концентрации ауксина или NO снижается уровень транскриптов KRP2, кодирующего специфический ингибитор активности CDK, но увеличивается уровень экспрессии циклина D3;1, который, связываясь с циклинзависимой киназой A1, регулирует переход от G1- к S-фазе. Усиление транскрипционной активности *CYCD3;1* было отмечено также в ответ на цитокининовый сигнал, причем в передаче сигнала участвует NO [9]. Необходимо заметить, что как ауксин [15], так и цитокинин [16] способны вызывать увеличение внутриклеточного содержания NO. Относительно мало известно о возможном механизме действия NO на регуляцию клеточного цикла. Установлено, что NO может изменять пути передачи сигнала через модификацию содержания вторичных посредников, таких как цГМФ, цАДФ-рибоза или Ca^{2+} [5, 17, 18]. Взаимодействие АФК- и АФА-сигнальных путей в растениях к настоящему моменту также малоизучено, но активно обсуждается (см., например, [2, 6, 19]).

Очевидно, что клеточный цикл находится под контролем большого числа различных факторов, что усложняет исследование механизмов его регуляции. Культивируемые клетки растений, различающиеся по морфогенной способности, пролиферативной активности и гормонозависимости, представляют собой удобную модель для исследования механизмов регуляции клеточного цикла.

Ранее нами было установлено, что неморфогенные каллусы гречихи татарской отличаются от морфогенных каллусов, из которых они получены, более высоким уровнем митотического индекса и большим приростом биомассы. Неморфогенные каллусы имели один пик митотической активности, при этом доля делящихся клеток составляла от 3% до 4.26% в зависимости от линии. Прирост их биомассы превышал в 5 раз прирост биомассы морфогенного каллуса. Вместе с тем для неморфогенного каллуса характерно повышенное по сравнению с морфогенными линиями содержание пероксида водорода (в 1.5–15 раз в зависимости от линии) [20, 21]. На основании полученных результатов было сделано предположение, что АФК могут участвовать в регуляции роста неморфогенных каллусов гречихи. Нам также представлялось важным оценить вовлеченность NO в регуляцию пролиферативной активности каллусных культур, характеризующихся высокой скоростью роста, и возможность его взаимодействия с АФК.

Цель настоящей работы заключалась в изучении роли NO в регуляции генов клеточного цикла *CYCD3;1* и *CDKA1;1* в неморфогенном каллусе гречихи татарской с высокой пролиферативной активностью.

Материалы и методы

В работе использовали неморфогенный каллус гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn., состоящий из паренхимоподобных клеток и отличающийся высоким индексом роста. Каллусные культуры поддерживали в термостате при температуре $(26 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ в темноте на каллусогенной среде RX [22], содержащей минеральные соли среды Гамборга В5 [23] с добавлением 2 мг/л тиамин, 1 мг/л пиридоксин, 1 мг/л никотиновой кислоты, 2 г/л гидролизата казеина, 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, 0.5 мг/л индолилуксусной кислоты, 0.5 мг/л нафтилуксусной кислоты, 0.2 мг/л кинетин. Каллусы пересаживали через каждые две недели.

Источник образования NO (нитропруссид натрия) и сквенджер NO (2-(4-карбоксифенил)-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксид (сРТИО)) добавляли в среду культивирования через стерильный ультрафильтр диаметром пор 0.22 мкм (Millipore, США). На основе литературных данных [17, 24, 25] и результатов предварительных экспериментов была выбрана концентрация нитропруссида натрия – 200 мкМ, сРТИО – 50 мкМ. Параметры снимали через 1 сут после переноса каллуса на среды с модуляторами.

Для построения кривых роста использовали стандартную методику [26].

Для приготовления цитогенетических препаратов и подсчета митотического индекса каллус выдерживали в фиксаторе Кларка 4–6 ч. Затем материал отмывали от фиксатора 96%-ным этанолом и хранили до исследования в 70%-ном этаноле. Окрашивание хромосом проводили 2%-ным пропионовым орсеином (Serva, Германия). Препараты изучали с помощью микроскопа Jenamed (Carl Zeiss, Германия). При определении митотического индекса учитывали не менее 5000 клеток на точку фиксации.

Содержание пероксида водорода определяли спектрофотометрически согласно Д. Беллинчампи с соавторами [27].

Содержание оксида азота определяли с помощью реактива Грисса по методу Б. Чжоу с соавторами [17] и с использованием набора Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit (BioVision, США).

Образцы тотальной РНК неморфогенного каллуса получали с использованием коммерческого набора SV Total RNA Isolation System (Promega, США) согласно инструкции фирмы-изготовителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с праймером олиго(dT)18 согласно рекомендациям фирмы-изготовителя обратной транскриптазы RevertAid™ M-MuLV (Fermentas, Литва). Качество экстрагированной РНК контролировали с помощью электрофореза в 0.8%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия (10 мг/мл). Образцы РНК хранили при -20°C .

Реакцию обратной транскрипции проводили со случайными праймерами согласно рекомендациям фирмы-изготовителя обратной транскриптазы RevertAid™ M-MuLV (Fermentas, Литва) после предварительного выравнивания

концентрации РНК между образцами с использованием NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США).

Для контроля эффективности ПЦР-РВ и адекватности получаемых результатов эксперимент сопровождали постановкой реакций, в которых матрицей служила остаточная ДНК, содержащаяся в препаратах РНК без стадии обратной транскрипции.

Выявление продуктов амплификации в режиме реального времени проводили с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green I.

Постановку ПЦР в реальном времени проводили в объеме 10 мкл на программируемом амплификаторе iQ iCycler (Bio-Rad, США) в режиме: 1 цикл – 95 °С, 2 мин; 40 циклов – 95 °С, 15 с, 55 °С, 5 с, 60 °С, 1 мин. Относительный уровень экспрессии (R) каждого гена в соответствующих образцах определяли исходя из значений порогового цикла (Ct) и эффективности амплификации (E) с использованием метода М. Пфаффла [28]. Значения Ct для целевых генов были нормализованы относительно референсных генов. В качестве последних были использованы гены, кодирующие бета-тубулин и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу.

Все олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в НПФ «Литех» (г. Москва, Россия). Для амплификации генов, кодирующих циклин D3;1 и циклинзависимую киназу A1;1 гречихи татарской, исходя из первичных последовательностей κДНК соответствующих генов, полученных в ходе выполнения проекта РФФИ № 13-04-97136, нами были подобраны следующие праймеры:

CycD3-1(F): 5'-GGATGCTAAAAGTCAACTCGT-3'

CycD3-1(R): 5'-CAACAAGCTGAATCGTCCAT-3'

CDKA1(F): 5'-AAGGTTGAGAAGATAGGGGAG-3'

CDKA1(R): 5'-ACGAAACCAATGTCCTTGAA-3'

Tub2(F) 5'-TCGTA CTCTCCTTCCT-3'

Tub2(R) 5'-ACGTATGGATGAAATGGAG-3'

GAPDH3(F) 5'-ACTTGAGATTATCCGGGAAGC-3'

GAPDH3(R) 5'-GCTCCCGTGTGGTAGACTTG-3'

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета статистического анализа программы Microsoft Office Excel 2007. Представлены данные трех независимых опытов с 3–5 биологическими повторностями в каждом в виде среднее значение ± стандартная ошибка среднего значения при доверительной вероятности 95%.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования мы оценивали содержание NO в клетках каллуса. Анализ полученных данных показал, что значения содержания NO колебались в течение пассажа от 0.4 до 0.8 мкМ/г сухого веса (рис. 1, а), но максимальное значение наблюдали через сутки после переноса каллуса на свежую среду. На 2-е сутки отмечали резкое снижение, а затем плавное уменьшение содержания NO в клетках каллуса. Исследование пролиферативной активности показало, что в течение пассажа в каллусе наблюдается один пик митотической активности – через сутки после пересадки культуры на свежую среду, далее митотическая активность каллуса снижается (рис. 1, б). При сопоставлении

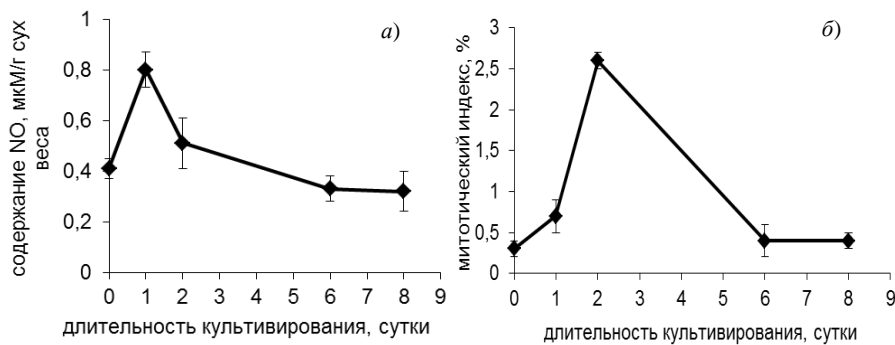


Рис. 1. Динамика содержания внутриклеточного NO (а) и митотической активности (б) клеток неморфогенного каллуса гречихи татарской в течение культурального цикла

данных по содержанию внутриклеточного NO с динамикой митотического индекса (МИ) выявили, что пик содержания NO предшествует пику МИ (рис. 1).

На следующем этапе работы мы изучали уровень экспрессии генов *CYCD3;1* и *CDKA1;1* в процессе культивирования каллуса. Было установлено, что уровень экспрессии исследуемых генов различается в течение пассажа. Экспрессия *CDKA1;1* с 1-х по 6-е сутки культивирования изменяется мало, значительное снижение уровня экспрессии отмечается только на 8-е сутки (рис. 2, а). Максимальный уровень экспрессии *CYCD3;1* наблюдали через сутки после переноса каллуса на свежую среду культивирования, но уже со 2-х суток пассажа уровень экспрессии гена снижался, достигая минимума к 8-м суткам культивирования (рис. 2, б). При этом пик экспрессии *CYCD3;1* предшествует пику митотической активности (рис. 1, б, 2, б). Известно, что активность *CYCD3;1* максимальна при переходе от G1- к S-стадии клеточного цикла, в дальнейшем его экспрессия снижается [29], что согласуется с полученными нами результатами. Кроме того, нами была отмечена корреляция между уровнем экспрессии *CYCD3;1* и внутриклеточным содержанием NO. Классическими триггерами клеточного цикла являются гормоны и сахара [11]. Логично предположить, что наблюдаемое увеличение экспрессии генов *CDKA1;1* и *CYCD3;1* через сутки после пересадки было вызвано поступлением экзогенных гормонов и углеводов из свежей среды культивирования. Считается, что циклины D-типа обеспечивают согласованность продвижения по клеточному циклу с сигналами окружающей среды (в первую очередь с наличием и доступностью питательных веществ), делая возможным рост и дифференцировку клеток в благоприятных условиях [30]. Показано, что экспрессия *CYCD2* и *CYCD3* чувствительна к присутствию сахарозы. При этом экспрессия *CYCD3*, в отличие от *CYCD2*, реагирует также на наличие гормонов [31]. Была показана зависимость экспрессии *CYCD3* от цитокинина, брассиностероидов и ауксина [32]. В частности, показано, что *AtCYCD3;1* активируется в ответ на цитокинины, а его сверхэкспрессия приводит к образованию каллуса и регенерации побегов из эксплантов в отсутствие экзогенного цитокинина [31]. Мутация по гену *CYCD3;1* приводит к снижению ответов на цитокинин, таких как регенерация побегов из каллуса [33]. Для активации экспрессии CDKA также необходимы гормоны, в первую очередь ауксин [34]. Ауксин также играет важную роль в сборке активного CDKA-ассоциированного

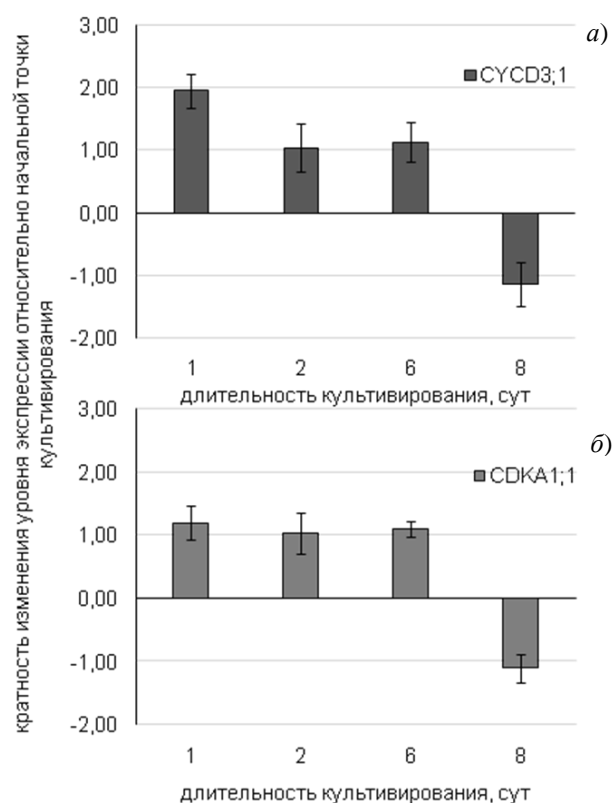


Рис. 2. Изменение уровня экспрессии генов *CDKA1;1* (а) и *CYCD3;1* (б) в течение культурального цикла каллуса гречихи татарской

комплекса [35]. Однако для активации киназы необходим цитокинин [36]. Следует отметить, что гормоны способны воздействовать также и на содержание внутриклеточного NO [37]. Показано участие NO в ауксиновом ответе [15], также установлено, что генерация NO быстро индуцируется в ответ на добавление цитокининов в клеточных культурах арабидопсиса, петрушки и табака [16].

Далее исследовали влияние модуляторов внутриклеточного содержания NO на экспрессию *CYCD3;1* и *CDKA1;1* и пролиферативную активность неморфогенного каллуса. Для изменения внутриклеточного содержания NO использовали донор NO – нитропруссид натрия (SNP) – и сквенджер NO – 2-(4-карбоксифенил)-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксид (сРТИО)). Было установлено, что нитропруссид натрия вызывает достоверное увеличение внутриклеточного содержания NO в каллусе (более чем на 100%), тогда как сРТИО снижает содержание внутриклеточного NO (на 50%) (рис. 3, а). Кроме изменения внутриклеточного уровня NO, SNP и сРТИО вызывали изменение митотического индекса каллуса. Нитропруссид натрия увеличивал митотический индекс в 2,5 раза, тогда как сРТИО снижал митотическую активность клеток каллуса в 2 раза (рис. 3, б).

Было отмечено изменение профиля экспрессии генов клеточного цикла при изменении эндогенного содержания NO. Увеличение уровня экспрессии *CYCD3;1* отмечали при применении источника NO – нитропруссида натрия (рис. 3, в). В случае применения сРТИО наблюдали снижение уровня экспрессии

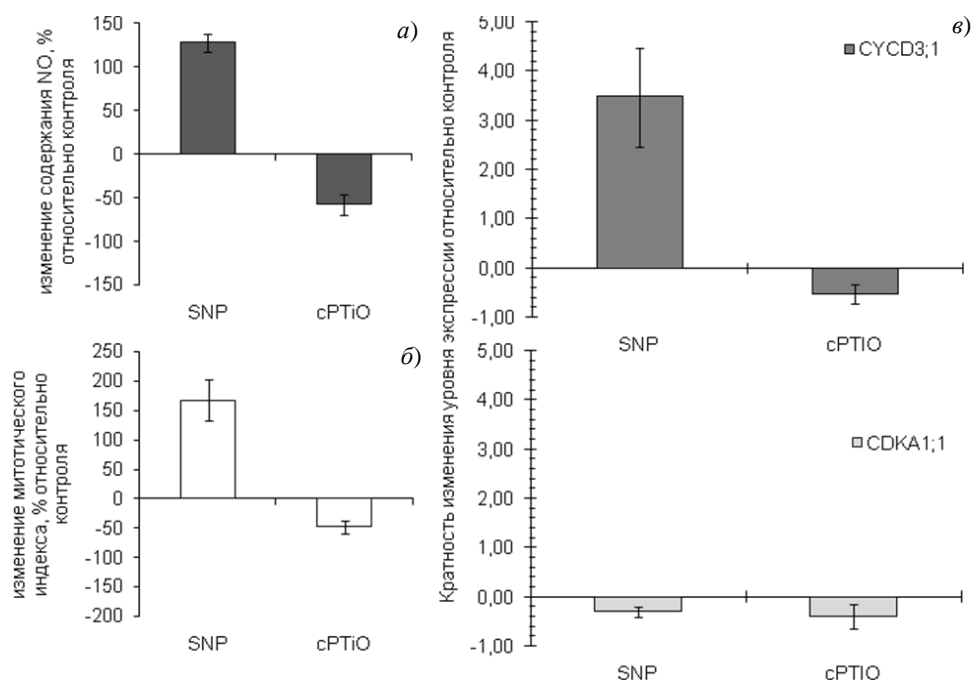


Рис. 3. Влияние модуляторов внутриклеточного содержания NO – нитропруссид натрия (SNP) и сРТЮ – на внутриклеточное содержание NO (а), митотический индекс (б), уровень экспрессии *CYCD3;1* и *CDKA1;1* (в). Длительность культивирования – 1 сут

CYCD3;1 (рис. 3, в). Полученные результаты согласуются с известными данными. Так, Н. Корреа-Арагунде [8] описано участие NO в регуляции экспрессии *CYCD3;1* в клетках корней томатов с использованием тех же самых модуляторов внутриклеточного содержания NO. Помимо изменения уровня экспрессии гена *CYCD3;1* было отмечено стимулирующее действие нитропруссид натрия на формирование боковых корней; использование сРТЮ вызывало снижение числа боковых корней. Нами установлены стимулирующий эффект SNP и ингибирующее действие сРТЮ на деление клеток каллусных культур.

Необходимо отметить, что при воздействии обоих модуляторов эндогенного содержания NO было обнаружено снижение уровня экспрессии *CDKA1;1* (рис. 3, г), коррелирующее со снижением внутриклеточного содержания H_2O_2 (рис. 4). В литературе есть сведения о том, что H_2O_2 может оказывать влияние на внутриклеточное содержание NO. Так, П. Ван с соавторами [38] показано участие H_2O_2 в индукции образования NO, которое может происходить при АБК-индуцированной активации MAP-киназы 6. Х.-Л. Лум с соавторами [39] было сделано предположение, что H_2O_2 -опосредованное изменение содержания кальция в клетке влияет на активность NO-синтазы, тем самым изменяя внутриклеточное содержание NO. Оказывает ли NO какое-либо влияние на образование АФК, пока не известно. Есть данные о том, что NO изменяет активность аконитазы, фермента, катализирующего изомеризацию цитрата в изоцитрат [40]. Инактивация этого фермента снижает энергетический метаболизм клеток, что может вызвать редукцию электронного тока через дыхательную цепь митохондрий и последующее снижение образования АФК. Нами также отмечено снижение

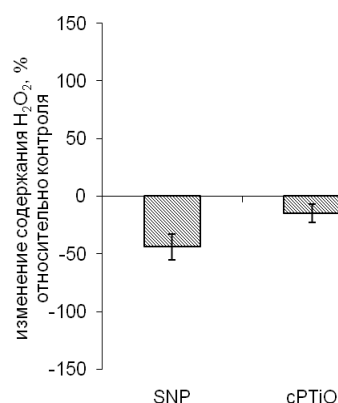


Рис. 4. Влияние модуляторов эндогенного содержания NO на содержание пероксида водорода в клетках неморфогенного каллуса гречихи татарской

внутриклеточного содержания H₂O₂ как при увеличении, так и при снижении внутриклеточного содержания NO.

В литературе имеется мало данных о влиянии NO на экспрессию генов *CDKA*, но есть данные о вовлечении АФК в их регуляцию. Так, А. Фехер с соавторами [10] исследовали влияние CuSO₄ (индуктора мягкого окислительного стресса) и DPI (ингибитор НАДФН-оксидазы) на активацию клеточного цикла в клетках суспензионной культуры люцерны. Стресс усиливал активность *CDKA1* в течение 24–48 ч после пересадки, данный эффект снимался одновременным использованием CuSO₄ и DPI. Использование только DPI приводило к небольшому уменьшению активности *CDKA1*, но при этом также наблюдали торможение деления клеток, отмечаемое по уменьшению скорости роста культур [10]. Нами не установлена корреляция между пролиферативной активностью каллуса и уровнем экспрессии *CDKA1*. Следует отметить, что мы не оценивали активность *CDKA1*, но отмечали корреляцию между снижением содержания H₂O₂ и снижением уровня экспрессии *CDKA1;1*. Исходя из литературных данных и полученных нами результатов, можно сделать вывод, что АФК могут участвовать в регуляции как экспрессии, так и активности *CDKA1*.

Таким образом, установлено, что экспериментальное изменение внутриклеточного содержания NO приводит к изменению внутриклеточного уровня пероксида водорода. Является ли наблюдаемый нами эффект последствием изменения содержания NO или связан с неспецифичностью действия использованных модуляторов, пока не ясно. Однако возможность влияния именно NO на уровень внутриклеточного пероксида водорода обсуждается в [2]. В связи с этим можно говорить, что NO может быть вовлечен в регуляцию экспрессии не только гена *CYCD3;1*, но и *CDKA1;1*, и регуляторный эффект NO на экспрессию *CDKA1;1* может быть опосредован изменением редокс-статуса клеток.

Литература

1. Neill S.J., Desikan R., Hancock J.T. Nitric oxide signalling in plants // *New Phytol.* – 2003. – V. 159, No 1. – P. 11–35. – doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00804.x.

2. *Molassiotis A., Fotopoulos V.* Oxidative and nitrosative signaling in plants: Two branches in the same tree? // *Plant Signaling Behav.* – 2011. – V. 6, No 2. – P. 210–214. – doi: 10.4161/psb.6.2.14878.
3. *Livanos P., Apostolakos P., Galatis B.* Plant cell division: ROS homeostasis is required // *Plant Signaling Behav.* – 2012. – V. 7, No 7. – P. 771–778. – doi: 10.4161/psb.20530.
4. *Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C.* Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance // *Nature.* – 1998. – V. 394, No 6693. – P. 585–588.
5. *Durner J., Wendehenne D., Klessig D.F.* Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1998. – V. 95, No 17. – P. 10328–10333.
6. *Tanou G., Molassiotis A., Diamantidis G.* Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity // *Environ. Exp. Bot.* – 2009. – V. 65, No 2–3. – P. 270–281. – doi: 10.1016/j.envexpbot.2008.09.005.
7. *Ötvös K., Pasternak T., Miskolczi P., Domoki M., Dorjgotov D., Bottka S., Dudits D., Fehér A.* Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures: NO in cell division // *Plant J.* – 2005. – V. 43, No 6. – P. 849–860. – doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02494.x.
8. *Correa-Aragunde N., Graziano M., Chevalier C., Lamattina L.* Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato // *J. Exp. Bot.* – 2006. – V. 57, No 3. – P. 581–588.
9. *Shen Q., Wang Y-T., Tian H., Guo F-Q.* Nitric oxide mediates cytokinin functions in cell proliferation and meristem maintenance in *Arabidopsis* // *Mol. Plant.* – 2013. – V. 6, No 4. – P. 1214–1225. – doi: 10.1093/mp/sss148.
10. *Feher A., Ötvös K., Pasternak T., Pettkó-Szandtner A.* The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the cell cycle activation (G_0 -to- G_1 transition) of plant cells // *Plant Signaling Behav.* – 2008. – V. 3, No 10. – P. 823–826. – doi: 10.1007/s10725-006-9152-0.
11. *Inzé D., De Veylder L.* Cell cycle regulation in plant development // *Annu. Rev. Genet.* – 2006. – V. 40, No 1. – P. 77–105. – doi: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090431.
12. *Pasternak T., Potters G., Caubergs R., Jansen M.A.* Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level // *J. Exp. Bot.* – 2005. – V. 56, No 418. – P. 1991–2001. – doi: 10.1093/jxb/eri196.
13. *Pasternak T.P., Ötvös K., Domoki M., Fehér A.* Linked activation of cell division and oxidative stress defense in alfalfa leaf protoplast-derived cells is dependent on exogenous auxin // *Plant Growth Regul.* – 2007. – V. 51, No 2. – P. 109–117. – doi: 10.1007/s10725-006-9152-0.
14. *Correa-Aragunde N., Graziano M., Lamattina L.* Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato // *Planta.* – 2004. – V. 218, No 6. – P. 900–905. – doi: 10.1007/s00425-003-1172-7.
15. *Pagnussat G.C., Simontacchi M., Puntarulo S., Lamattina L.* Nitric oxide is required for root organogenesis // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 129, No 3. – P. 954–956. – doi: 10.1104/pp.004036.
16. *Tun N.N., Holk A., Scherer G.F.* Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin // *FEBS Lett.* – 2001. – V. 509, No 2. – P. 174–176. – doi: 10.1016/S0014-5793(01)03164-7.
17. *Zhou B., Guo Z., Xing J., Huang B.* Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis* // *J. Exp. Bot.* – 2005. – V. 56, No 422. – P. 3223–3228. – doi: 10.1093/jxb/eri319.

18. *Pagnussat G.C., Lanteri M.L., Lombardo M.C., Lamattina L.* Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development // *Plant Physiol.* – 2004. – V. 135, No 1. – P. 279–286. – doi: 10.1104/pp.103.038554.
19. *del Rio L.A.* ROS and RNS in plant physiology: An overview // *J. Exp. Bot.* – 2015. – V. 66, No 10. – P. 2827–2837. – doi: 10.1093/jxb/erv099.
20. *Sibgatullina G.V., Rumyantseva N.I., Khaertdinova L.R., Akulov A.N., Tarasova N.B., Gumerova E.A.* Establishment and characterization of the line of *Fagopyrum tataricum* morphogenic callus tolerant to aminotriazole // *Russ. J. Plant Physiol.* – 2012. – V. 59, No 5. – P. 662–669. – doi: 10.1134/S1021443712050172.
21. *Kamalova G.V., Akulov A.N., Rumyantseva N.I.* Comparison of redox state of cells of tatar buckwheat morphogenic calluses and non-morphogenic calluses obtained from them // *Biochemistry (Moscow)*. – 2009. – V. 74, No 6. – P. 686–694. – doi: 10.1134/S0006297909060145.
22. *Румянцева Н.И., Валиева А.И., Саохвалова Н.А., Мухитов А.Р., Агеева М.В., Лозовая В.В.* Особенности лигнификации клеточных стенок каллусов гречихи, различающихся по способности к морфогенезу // *Цитология*. – 1998. – Т. 40, № 10. – С. 835–843.
23. *Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima R.* Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell Res.* – 1968. – V. 50, No 1. – P. 151–158. – doi: 10.1016/0014-4827(68)90403-5.
24. *Pfeiffer S., Leopold E., Hemmens B., Schmidt K., Werner E.R., Mayer B.* Interference of carboxy-ПТИО with nitric oxide-and peroxynitrite-mediated reactions // *Free Radicals Biol. Med.* – 1997. – V. 22, No 5. – P. 787–794. – doi: 10.1016/S0891-5849(96)00407-8.
25. *Kumari A., Sheokand S., Swaraj K.* Nitric oxide induced alleviation of toxic effects of short term and long term Cd stress on growth, oxidative metabolism and Cd accumulation in Chickpea // *Braz. J. Plant Physiol.* – 2010. – V. 22, No 4. – P. 271–284. – doi: 10.1590/S1677-04202010000400007.
26. *Ралдугина Г.Н., Кузнецов В.В.* Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. – М.: Изд-во Бином. Лаб. Знаний, 2012. – 487 с.
27. *Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F., De Lorenzo G.* Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated *rolB* gene expression in tobacco leaf explants // *Plant Physiol.* – 2000. – V. 122, No 4. – P. 1379–1386.
28. *Pfaffl M.W.* A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29, No 9. – P. 2002–2007.
29. *Koroleva O.A., Tomlinson M., Parinyapong P., Sakvarelidze L., Leader D., Shaw P., Doonan J.H.* *CycD1*, a putative g1 cyclin from *Antirrhinum majus*, accelerates the cell cycle in cultured tobacco BY-2 cells by enhancing both G1/S entry and progression through S and G2 PHASES // *Plant Cell.* – 2004. – V. 16, No 9. – P. 2364–2379. – doi: 10.1105/tpc.104.023754.
30. *Oakenfull E.A., Riou-Khamlichi C., Murray J.A.H.* Plant D-type cyclins and the control of G1 progression // *Philos. Trans. R. Soc., B.* – 2002. – V. 357, No 1422. – P. 749–760. – doi: 10.1098/rstb.2002.1085.
31. *Riou-Khamlichi C., Huntley R., Jacqmard A., Murray J.A.H.* Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin // *Science*. – 1999. – V. 283. – P. 1541–1544. – doi: 10.1126/science.283.5407.1541.
32. *Dewitte W., Murray J.A.H.* The plant cell cycle // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2003. – V. 54, No 1. – P. 235–264. – doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134836.

33. Dewitte W., Scofield S., Alcasabas A.A., Maughan S.C., Menges M., Braun N., Collins C. Nieuwland J., Prinsen E., Sundareshan V., Murray J.A.H. Arabidopsis CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2007. – V. 104, No 36. – P. 14537–14542. – doi: 10.1073/pnas.0704166104.
34. Doerner P., Celenza J. How are plant growth regulators involved in cell cycle control? // Plant hormone research / By ed. K. Palme, J. Schell. – Berlin: Springer, 2000. – P. 1–27.
35. Harashima H., Kato K., Shinmyo A., Sekine M. Auxin is required for the assembly of A-type cyclin-dependent kinase complexes in tobacco cell suspension culture // J. Plant Physiol. – 2007. – V. 164, No 9. – P. 1103–1112. – doi: 10.1016/j.jplph.2007.01.005.
36. Zhang K., Letham D.S., John P.C. Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase // Planta. – 1996. – V. 200, No 1. – P. 2–12.
37. Erdei L., Kolbert Z. Nitric oxide as a potent signalling molecule in plants // Acta Biol. Szeged. – 2008. – V. 52, No 1. – P. 1–5.
38. Wang P., Du Y., Li Y., Ren D., Song C-P. Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis* // Plant Cell. – 2010. – V. 22, No 9. – P. 2981–2998. – doi: 10.1105/tpc.109.072959.
39. Lum H.K., Butt Y.K.C., Lo S.C.L. Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*Phaseolus aureus*) // Nitric Oxide. – 2002. – V. 6, No 2. – P. 205–213. – doi: 10.1006/niox.2001.0395.
40. Navarre D.A., Wendehenne D., Durner J., Noad R., Klessig D.F. Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase // Plant Physiol. – 2000. – V. 122, No 2. – P. 573–582. – doi: 10.1104/pp.122.2.573.

Поступила в редакцию
25.01.17

Сибгатуллина Гузель Валерьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории физиологии и генетики культивируемых клеток

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН
ул. Лобачевского, д. 2/31, г. Казань, 420111, Россия
E-mail: kam-guz@yandex.ru

Акулов Антон Николаевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии и генетики культивируемых клеток

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН
ул. Лобачевского, д. 2/31, г. Казань, 420111, Россия
E-mail: akulov_anton@mail.ru

Горшков Олег Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории механизмов роста растительных клеток

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН
ул. Лобачевского, д. 2/31, г. Казань, 420111, Россия
E-mail: o_gorshkov@mail.ru

Румянцева Наталья Ивановна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией физиологии и генетики культивируемых клеток

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН
ул. Лобачевского, д. 2/31, г. Казань, 420111, Россия
E-mail: nat_rumyantseva@mail.ru

**Nitric Oxide Involvement in Regulation of the Growth Activity
of Nonmorphogenic Tartary Buckwheat Callus**

G.V. Sibgatullina*, A.N. Akulov**, O.V. Gorshkov***, N.I. Rumyantseva****

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center,
Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111 RussiaE-mail: *kam-guz@yandex.ru, **akulov_anton@mail.ru, ***o_gorshkov@mail.ru,
****nat_rumyantseva@mail.ru

Received January 25, 2017

Abstract

The research presented in this paper is aimed to determine the role of nitric oxide (NO) in the regulation of cyclin D3;1 (*CYCD3;1*) and cyclin-dependent kinase A1;1 (*CDKA1;1*) expression. The non-morphogenic callus of Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) with high growth activity has been taken as the object of study. The methods of spectrophotometry and real-time PCR have been used.

In the first stage of the research, the dynamics of intracellular NO content and mitotic activity of callus cells have been compared. It has been noted that the peak of NO content precedes the peak of mitotic activity of the callus. It has been revealed that the maximum level of *CYCD3;1* expression observed the day after the callus transfer to a new medium coincides with the peak of NO content and precedes the peak of mitotic activity. The addition of NO donor sodium nitroprusside to the culture medium has caused an increase in the mitotic index and *CYCD3;1* expression, while the NO scavenger – 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) – has decreased *CYCD3;1* expression and the mitotic index. In both cases, a decrease in *CDKA1;1* expression has been found. Both sodium nitroprusside and cPTIO has had no strict specificity and influenced not only NO, but also H₂O₂ content. The possible mechanisms of interaction between reactive oxygen and nitrogen species signalling pathways have been discussed in this paper.

Based on the results of the study it has been concluded about the possibility of NO involvement in the regulation of not only *CYCD3;1* expression, but also *CDKA1;1* expression. It has been suggested that the regulatory effect of NO on *CDKA1;1* expression may be mediated by cellular redox state changes.

Keywords: nitric oxide, cyclin D3;1, cyclin-dependent kinase A1;1, sodium nitroprusside, NO scavenger (cPTIO), proliferation, callus

Figure Captions

- Fig. 1. The dynamics of intracellular NO content (a) and mitotic activity (b) of nonmorphogenic callus cells of Tartary buckwheat during the cultural cycle.
- Fig. 2. Changes in the level of *CDKA1;1* (a) and *CYCD3;1* (b) expression during the cultural cycle of Tartary buckwheat callus.
- Fig. 3. The influence of the intracellular NO content modulators (sodium nitroprusside (SNP) and cPTIO) on the intracellular NO content (a), mitotic index (b), level of *CYCD3;1* and *CDKA1;1* expression (c). Cultivation length – one day.
- Fig. 4. The effects of endogenous NO content modulators on the content of nonmorphogenic callus of Tartary buckwheat.

References

1. Neill S.J., Desikan R., Hancock J.T. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.*, 2003, vol. 159, no. 1, pp. 11–35. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00804.x.
2. Molassiotis A., Fotopoulos V. Oxidative and nitrosative signaling in plants: Two branches in the same tree?. *Plant Signaling Behav.*, 2011, vol. 6, no. 2, pp. 210–214. doi: 10.4161/psb.6.2.14878.
3. Livanos P., Apostolakis P., Galatis B. Plant cell division: ROS homeostasis is required. *Plant Signaling Behav.*, 2012, vol. 7, no. 7, pp. 771–778. doi: 10.4161/psb.20530.
4. Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease Resistance. *Nature*, 1998, vol. 394, no. 6693, pp. 585–588.
5. Durner J., Wendehenne D., Klessig D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, vol. 95, no. 17, pp. 10328–10333.
6. Tanou G., Molassiotis A., Diamantidis G. Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. *Environ. Exp. Bot.*, 2009, vol. 65, nos. 2–3, pp. 270–281. doi: 10.1016/j.envexpbot.2008.09.005.
7. Ötvös K., Pasternak T., Miskolczi P., Domoki M., Dorjgotov D., Bottka S., Dudits D., Fehér A. Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures: NO in cell division. *Plant J.*, 2005, vol. 43, no. 6, pp. 849–860. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02494.x.
8. Correa-Aragunde N., Graziano M., Chevalier C., Lamattina L. Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *J. Exp. Bot.*, 2006, vol. 57, no. 3, pp. 581–588.
9. Shen Q., Wang Y.-T., Tian H., Guo F.-Q. Nitric oxide mediates cytokinin functions in cell proliferation and meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant*, 2013, vol. 6, no. 4, pp. 1214–1225. doi: 10.1093/mp/sss148.
10. Fehér A., Ötvös K., Pasternak T., Pettkó-Szandtner A. The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the cell cycle activation (G_0 -to- G_1 transition) of plant cells. *Plant Signaling Behav.*, 2008, vol. 3, no. 10, pp. 823–826. doi: 10.1007/s10725-006-9152-0.
11. Inzé D., De Veylder L. Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.*, 2006, vol. 40, no. 1, pp. 77–105. doi: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090431.
12. Pasternak T., Potters G., Caubergs R., Jansen M.A. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *J. Exp. Bot.*, 2005, vol. 56, no. 418, pp. 1991–2001. doi: 10.1093/jxb/eri196.
13. Pasternak T.P., Ötvös K., Domoki M., Fehér A. Linked activation of cell division and oxidative stress defense in alfalfa leaf protoplast-derived cells is dependent on exogenous auxin. *Plant Growth Regul.*, 2007, vol. 51, no. 2, pp. 109–117. doi: 10.1007/s10725-006-9152-0.
14. Correa-Aragunde N., Graziano M., Lamattina L. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, 2004, vol. 218, no. 6, pp. 900–905. doi: 10.1007/s00425-003-1172-7.
15. Pagnussat G.C., Simontacchi M., Puntarulo S., Lamattina L. Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol.*, 2002, vol. 129, no. 3, pp. 954–956. doi: 10.1104/pp.004036.
16. Tun N.N., Holk A., Scherer G.F. Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Lett.*, 2001, vol. 509, no. 2, pp. 174–176. doi: 10.1016/S0014-5793(01)03164-7.
17. Zhou B., Guo Z., Xing J., Huang B. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *J. Exp. Bot.*, 2005, vol. 56, no. 422, pp. 3223–3228. doi: 10.1093/jxb/eri319.
18. Pagnussat G.C., Lanteri M.L., Lombardo M.C., Lamattina L. Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiol.*, 2004, vol. 135, no. 1, pp. 279–286. doi: 10.1104/pp.103.038554.
19. del Rio L.A. ROS and RNS in plant physiology: An overview. *J. Exp. Bot.*, 2015, vol. 66, no. 10, pp. 2827–2837. doi: 10.1093/jxb/erv099.

20. Sibgatullina G.V., Rumyantseva N.I., Khaertdinova L.R., Akulov A.N., Tarasova N.B., Gumerova E.A. Establishment and characterization of the line of *Fagopyrum tataricum* morphogenic callus tolerant to aminotriazole. *Russ. J. Plant Physiol.*, 2012, vol. 59, no 5, pp. 662–669. doi: 10.1134/S1021443712050172.
21. Kamalova G.V., Akulov A.N., Rumyantseva N.I. Comparison of redox state of cells of tatar buckwheat morphogenic calluses and non-morphogenic calluses obtained from them. *Biochemistry (Moscow)*, 2009, vol. 74, no. 6, pp. 686–694. doi: 10.1134/S0006297909060145.
22. Rumyantseva N.I., Valieva A.I., Samokhvalova N.A., Mukhitov A.R., Ageeva M.V., Lozovaya V.V. Peculiarities of lignification of cell walls of buckwheat calli with different morphogenetic ability. *Tsitologiya*, 1998, vol. 40, no. 10, pp. 835–843. (In Russian)
23. Gamborg O.L., Miller, R.A., Ojima R. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 1968, vol. 50, no. 1, pp. 151–158. doi: 10.1016/0014-4827(68)90403-5.
24. Pfeiffer S., Leopold E., Hemmens B., Schmidt K., Werner E.R., Mayer B. Interference of carboxy-PTIO with nitric oxide-and peroxy-nitrite-mediated reactions. *Free Radicals Biol. Med.*, 1997, vol. 22, no. 5, pp. 787–794. doi: 10.1016/S0891-5849(96)00407-8.
25. Kumari A., Sheokand S., Swaraj K. Nitric oxide induced alleviation of toxic effects of short term and long term Cd stress on growth, oxidative metabolism and Cd accumulation in Chickpea. *Braz. J. Plant Physiol.*, 2010, vol. 22, no. 4, pp. 271–284. doi: 10.1590/S1677-04202010000400007.
26. Raldugina G.N., Kuznetsov V.V. *Molecular Genetic and Biochemical Methods in Modern Plant Biology*. Moscow, Izd. Binom Lab. Znaniy, 2012. 487 p. (In Russian)
27. Bellincampi D., Dipierro, N., Salvi, G., Cervone F., De Lorenzo G. Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated *rolB* gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiol.*, 2000, vol. 122, no. 4, pp. 1379–1386.
28. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 2001, vol. 29, no. 9, pp. 2002–2007.
29. Koroleva O.A., Tomlinson M., Parinyapong P., Sakvarelidze L., Leader D., Shaw P., Doonan J.H. *CycD1*, a putative g1 cyclin from *Antirrhinum majus*, accelerates the cell cycle in cultured tobacco BY-2 cells by enhancing both G1/S entry and progression through S and G2 PHASES. *Plant Cell*, 2004, vol. 16, no. 9, pp. 2364–2379. doi: 10.1105/tpc.104.023754.
30. Oakenfull E.A., Riou-Khamlichi C., Murray J.A.H. Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Philos. Trans. R. Soc., B.*, 2002, vol. 357, no. 1422, pp. 749–760. doi: 10.1098/rstb.2002.1085.
31. Riou-Khamlichi C., Huntley R., Jacquard A., Murray J.A.H. Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science*, 1999, vol. 283, pp. 1541–1544. doi: 10.1126/science.283.5407.1541.
32. Dewitte W., Murray J.A.H. The plant cell cycle. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2003, vol. 54, no. 1, pp. 235–264. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134836.
33. Dewitte W., Scofield S., Alcasabas A.A., Maughan S. C., Menges M., Braun N., Collins C., Nieuwland J., Prinsen E., Sundaresan V., Murray J.A.H. Arabidopsis CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, vol. 104, no. 36, pp. 14537–14542. doi: 10.1073/pnas.0704166104.
34. Doerner P., Celenza J. *Plant Hormone Research. How Are Plant Growth Regulators Involved in Cell Cycle Control?*. Palme K., Schell J. (Eds.). Berlin, Springer, 2000, pp. 1–27.
35. Harashima H., Kato K., Shinmyo A., Sekine M. Auxin is required for the assembly of A-type cyclin-dependent kinase complexes in tobacco cell suspension culture. *J. Plant Physiol.*, 2007, vol. 164, no. 9, pp. 1103–1112. doi: 10.1016/j.jplph.2007.01.005.
36. Zhang K., Letham D.S., John P.C. Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta*, 1996, vol. 200, no. 1, pp. 2–12.
37. Erdei L., Kolbert Z. Nitric oxide as a potent signalling molecule in plants. *Acta Biol. Szeged.*, 2008, vol. 52, no. 1, pp. 1–5.
38. Wang P., Du Y., Li Y., Ren D., Song C-P. Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2010, vol. 22, no. 9, pp. 2981–2998. doi: 10.1105/tpc.109.072959.

39. Lum H.K., Butt Y.K.C., Lo S.C.L. Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*Phaseolus aureus*). *Nitric Oxide*, 2002, vol. 6, no. 2, pp. 205–213. doi: 10.1006/niox.2001.0395.
40. Navarre D.A., Wendehenne D., Durner J., Noad R., Klessig D.F. Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiol.*, 2000, vol. 122, no. 2, pp. 573–582. doi: 10.1104/pp.122.2.573.

Для цитирования: Сибгатуллина Г.В., Акулов А.Н., Горшков О.В., Румянцева Н.И. Участие оксида азота в регуляции ростовой активности неморфогенного каллуса гречихи татарской // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2017. – Т. 159, кн. 2. – С. 306–320.

For citation: Sibgatullina G.V., Akulov A.N., Gorshkov O.V., Rummyantseva N.I. Nitric oxide involvement in regulation of the growth activity of nonmorphogenic Tartary buckwheat callus. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2017, vol. 159, no. 2, pp. 306–320. (In Russian)