

УДК 581.1

ОТВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ КЛЕТОК НА ТЕМПЕРАТУРУ И АБК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ РАЗВИТИЯ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ

И.А. Ларская, О.И. Трофимова, Т.С. Барышева, А.И. Заботин

Аннотация

Использование в качестве объекта исследования суспензионной культуры *Triticum thimopheevii* Zhuk. позволило охарактеризовать ответ клеток на закаливающую температуру в зависимости от стадии развития культуры. Клетки на 4–5-е сутки культивирования, находящиеся в стадии активного клеточного деления, показывали более высокую способность к закаливанию низкими положительными температурами (2 °С, 7 сут) и отвечали на действие температуры более значительной и длительной активацией гидролитических ферментов клеточной стенки (β -глюкозидазы, β -фукозидазы). Добавление абсцизовой кислоты (50 мкМ) без холодового воздействия также вызывало увеличение морозоустойчивости клеток суспензионной культуры. При этом максимальный уровень устойчивости достигался на 5-е сутки, если абсцизовую кислоту вносили в начале пассажа, и через сутки при добавлении гормона к клеткам 4-дневного возраста. Предполагается, что закаливание растений обусловлено субпопуляцией клеток, находящихся в определенной стадии клеточного цикла.

Ключевые слова: *Triticum thimopheevii*, суспензионная культура клеток, низкотемпературная адаптация, ферменты клеточной стенки, абсцизовая кислота.

Введение

Устойчивость к пониженной температуре является свойством, характеризующим видовые и сортовые особенности растений и определяющим их географическое распространение и продуктивность. Повышение морозоустойчивости озимых, наблюдаемое при действии низкой положительной температуры, сопровождается целым рядом метаболических изменений, охватывающих все уровни организации растения: от клетки до целого организма [1]. Однако, несмотря на то что на настоящий момент накоплено достаточно большое количество данных по исследованию механизма приспособления растений к пониженной температуре [2], многие детали данного процесса все еще остаются не выясненными. Одной из причин этого может быть то, что большинство работ традиционно выполнялось на целых растениях, демонстрируя интегральный ответ тканей и/или органов на закаливающую температуру, хотя показано, что разные части растения имеют различную реакцию на внешние воздействия [3]. Так, например, было продемонстрировано увеличение устойчивости проростков шпината при закаливании их листьев и отсутствие эффекта при закаливании корней [4]. Эффект абсцизовой кислоты (АБК), которая является индуктором морозостойкого состояния, был выше при опрыскивании листьев, чем при добавлении ее

в среду выращивания проростков пшеницы [5]. Кроме того, использование АБК на целых растениях не всегда было успешным, и оставался открытым вопрос о возможной микробной деградации гормона или его неэффективном проникновении и транспортировке [5]. Избежать большинства этих проблем можно с использованием клеточных культур, которые так же, как и растения, отвечают повышением морозоустойчивости при закаливании их низкими положительными температурами [6, 7] или при обработке АБК [6, 8]. Применение в качестве объекта исследования даже частично синхронизированной клеточной культуры позволяет не только использовать относительно однородный клеточный материал, но и работать с клетками, находящимися на определенной стадии развития, которые, как известно, обладают разной чувствительностью к действию температуры и различных эффекторов [9]. Так, например, на суспензионной культуре клеток *Arabidopsis thaliana* было продемонстрировано, что только клетки, взятые с лаг-фазы, имели хорошую способность к закаливанию и повышенное содержание эндогенного уровня АБК [7]. Однако в подобных работах отбор клеток для экспериментов осуществлялся без должной характеристики выраженности стадий развития, например, по величине митотического индекса или другим параметрам, что не давало возможность судить о точности деления клеток по их статусу. Поэтому была поставлена задача, используя суспензионную культуру клеток озимой пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk. с хорошей степенью синхронизации (митотический индекс до 12%), определить различия в ответе клеток, находящихся на разных стадиях развития, на закалывающую температуру и экзогенно добавленную АБК.

1. Материалы и методы

1.1. Объектом исследований служила суспензионная культура клеток озимой пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk. (РККК ВР, № 34), которая была получена в отделе биотехнологии Института физиологии растений им. Тимирязева РАН (г. Москва) [10]. Культура выращивалась на среде Шенка – Хильдебрандта [11] с 1.0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, 0.1 мг/л кинетина, 3%-ной сахарозы с периодом субкультивирования 21 день, в темноте, при 26 °С на шейкере (95 качаний в минуту). Для определения способности к закаливанию клеток разного возраста их отбирали с разных стадий развития культуры, переносили в климатическую камеру (2 °С) и культивировали в течение 7 сут. Обработку АБК проводили, добавляя стерильный раствор гормона в среду культивирования до конечной концентрации 50 мкМ без последующего закалывания клеток. Все остальные условия выращивания (состав среды, скорость качания, темновой режим и др.) не менялись.

1.2. Отбор и фиксирование проб для определения активности гликозидаз. К отфильтрованным и отмытым дистиллированной водой клеткам добавляли охлажденный фосфат-цитратный буфер (0.1 М, рН 5.0). Для разрушения клеток образцы озвучивали на дезинтеграторе УЗДН-1 (Россия) 2 раза по 2 мин (22 кГц, 0.5 А), центрифугировали 6 мин при 9000 об/мин. К надосадочной жидкости добавляли сульфат аммония (до 80% насыщения) для осаждения белков растворимой фракции.

1.3. Определение активности гликозидаз. Активность гликозидаз измеряли, используя в качестве субстрата 4-метилумбеллиферил-меченые сахара. Реакционная смесь содержала 0.1 М фосфат-цитратный буфер с pH 5.0, растворенный в том же буфере субстрат (0.05 мМ 4-метилумбеллиферил – глюкозид или 0.025 мМ 4-метилумбеллиферил – фукозид) и экстракт белка. Реакцию проводили в термостатируемых условиях (37 °С) в течение 10 мин. О величине ферментативной активности судили по количеству отщепившегося 4-метилумбеллиферона (4-МУ), содержание которого измеряли на спектрофлуориметре MPF-44B (Perkin Elmer, США) при длине волны 448 нм (длина волны возбуждения 325 нм). Активность ферментов рассчитывали в нМ 4-МУ на 1 мг сырого веса в минуту и выражали в процентах к исходному значению контрольных образцов.

1.4. Определение жизнеспособности клеток. Об устойчивости клеток к воздействию пониженной температурой на разных стадиях развития культуры судили по их выживаемости после промораживания при –15 °С в течение 1 ч. Жизнеспособность клеток выражали в процентах к контролю, в качестве которого служили клетки без промораживания. Выживание определяли по способности живых клеток восстанавливать бесцветный 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (ТТХ) до окрашенного формазана [12]. Для этого к замороженным и контрольным клеткам добавляли по 1 мл 0.5%-ного раствора ТТХ в фосфатном буфере (pH 7.2–7.5) и выдерживали в течение ночи при комнатной температуре. Затем надосадочную жидкость сливали, клетки промывали дважды 2 мл дистиллированной воды. К отмытым клеткам добавляли 1 мл 96%-ного этанола и в течение 2 ч экстрагировали образовавшийся формазан. Количество формазана определяли фотометрически при длине волны 485 нм на спектрофотометре Specol (Carl Zeiss, Германия).

1.5. Определение морозоустойчивости клеток. В экспериментах по действию АБК на формирование морозоустойчивости использовали метод, основанный на измерении выхода электролитов из клеток [13] с небольшими модификациями. Клетки (0.1 г) суспензионной культуры отмывали 3%-ным раствором сахарозы, помещали в микрохолодильник с заранее установленной отрицательной температурой, которую снижали с интервалом в 1 °С, начиная с –3 °С до –10 °С. После инкубации при заданной температуре в течение 1 ч пробы отбирали, добавляли 10 мл дистиллированной воды и инкубировали 1 ч на шейкере. Выход электролитов определяли по электропроводности жидкой фазы на кондуктометре ОК-102-1 с диаметром ячейки 22 мм и высотой 1.97 мм. Морозоустойчивость выражали как ЛТ₅₀ – значение температуры, соответствующее 50%-ной гибели клеток. За нулевой уровень принимали значение электропроводности образцов, не подвергавшихся промораживанию, за 100% – значение электропроводности образцов после автоклавирования при 0.8 атм 30 мин.

1.6. Определение митотического индекса клеток суспензионной культуры озимой пшеницы. Клетки фиксировали смесью спирта и уксусной кислоты (3 : 1) в течение 24 ч, после чего переводили в 70%-ный спирт. Образцы

окрашивали 1.5%-ным орсеином, приготовленным на 45%-ной уксусной кислоте. Число делящихся клеток и общее число клеток (не менее 2500 клеток) подсчитывали под световым микроскопом (PZO, Польша) с 400-кратным увеличением. Значение митотического индекса вычисляли как отношение числа делящихся клеток к общему числу просмотренных клеток, умноженное на 100.

В работе использовали реактивы производства Sigma (США): 4-метилумбеллиферил-гликозиды, 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид, орсеин, гормоны. Все остальные реактивы были отечественного производства квалификации «х.ч.» и «ч.д.а.»

Эксперименты проводили 2–3 раза в 3 биологических повторностях. В таблицах и на диаграммах приведены средние арифметические значения и стандартные ошибки одного типичного эксперимента.

2. Результаты

Развитие клеток суспензионной культуры *Triticum timopheevii* Zhuk. в ходе субкультивирования, оцениваемое по приросту сырой массы, описывалось S-образной кривой (рис. 1). Максимум митотического индекса (более 12%) приходился на 4-е сутки культивирования, после чего снижался и при интенсивном росте клеток достигал 1.5–2%. Такой характер роста культуры с четко прописанными стадиями развития позволил выделить образцы клеток в 2 качественно различных состояниях: суспензию клеток, обогащенных делящимися клетками (период со 2-х по 6-е сутки культивирования) и клеток, находящихся в состоянии интенсивного роста растяжением (с 7-х по 10-е сутки).

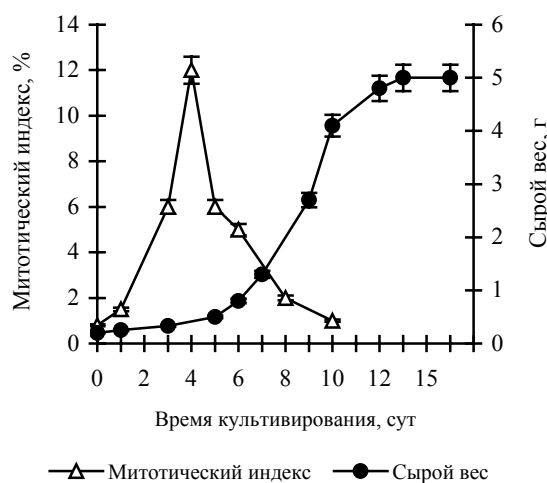


Рис. 1. Динамика накопления сырой массы и изменение митотического индекса в процессе роста суспензионной культуры озимой пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk.

Как видно из рис. 2, клетки обладали наибольшей жизнеспособностью в период от 6-го до 9-го дня культивирования с максимумом на 7-е сутки. Закаливание клеток, отобранных на разных этапах культивирования, приводило к увеличению

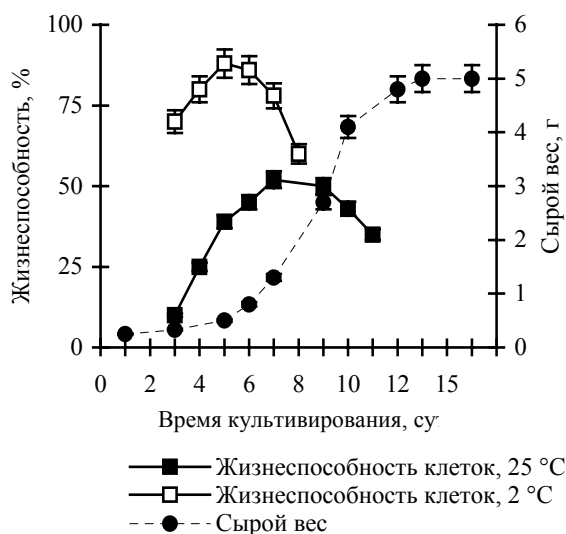


Рис. 2. Изменение жизнеспособности клеток суспензионной культуры озимой пшеницы в процессе культивирования при 25 °C и при закаливании клеток разного возраста. Примечание: клетки, отобранные с разных стадий развития культуры, закаливали при 2 °C в течение 7 сут. Показана жизнеспособность клеток по окончании периода закаливания. Пунктирной линией показана ростовая кривая суспензионной культуры в процессе культивирования при 25 °C

их морозоустойчивости. После 7 сут действия закалывающей (2 °C) температуры максимальное значение жизнеспособности наблюдалось у клеток 5-дневного возраста (рис. 2). При этом способность к закаливанию (разница между устойчивостью клеток к промораживанию до закаливания и после него) смещалась к началу пассажа на 3–4-е сутки культивирования.

Исследование динамики активности гидролитических ферментов (β -глюкозидазы и β -фукозидазы) при низкотемпературном закаливании выявило, что изменение их активности носило двухфазный характер и зависело от возраста культуры (рис. 3). Клетки, перешедшие в стадию роста растяжением (7–8 дней), характеризовались непродолжительной активацией этих ферментов с максимумом на 4–5-й час с небольшой амплитудой нарастания ферментативной активности на 20–30%, в то время как клетки в возрасте 4–5 дней отвечали на действие закалывающей температуры 3-кратным повышением активности с максимумом на 24-й час закаливания и сохраняли ферментативную активность на этом уровне, как минимум, еще сутки.

Инкубация клеток в среде с добавлением 50 мкМ АБК приводила к увеличению их морозоустойчивости по сравнению с необработанными клетками. При этом заметное повышение морозоустойчивости наблюдалось на 3-е сутки культивирования, если АБК добавляли в момент пересадки клеток в свежую среду, а при внесении гормона на 4-е сутки культивирования на максимуме митотической активности, повышение устойчивости было отмечено уже через 12 ч (табл. 1). При этом максимальная величина морозоустойчивости достигалась в первом случае на 5-е сутки культивирования с АБК, а во втором случае – через сутки после добавления гормона (табл. 1).

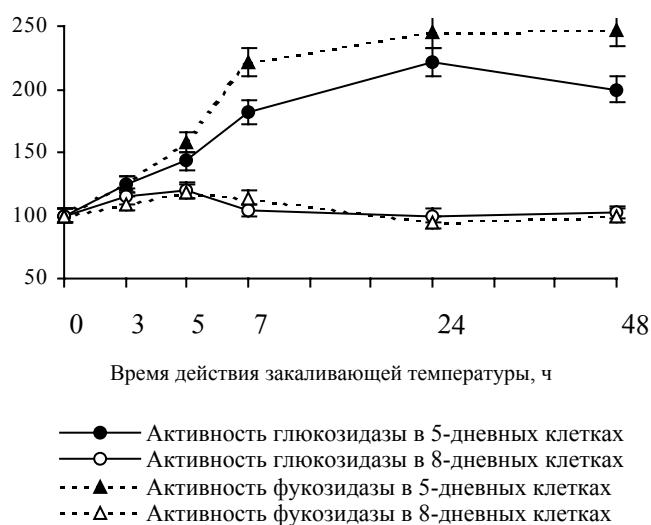


Рис. 3. Изменение активности гликозидаз при закаливании клеток (2 °С) суспензионной культуры озимой пшеницы разного возраста. За 100% взята активность ферментов до закаливания, выраженная в нМ 4-МУ на 1 мг сырого веса в минуту: для β -глюкозидазы – 524 и 331, для β -фукозидазы – 662 и 478 для 5- и 8-дневных клеток соответственно. Нулевой момент времени соответствует началу закаливания

Табл. 1

Образование морозостойкого состояния клеток суспензионной культуры озимой пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk. под действием АБК (50 мкМ, 26 °С) в зависимости от возраста. Звездочкой отмечено значение ЛТ₅₀ через 12 ч после добавления АБК

Время культивирования, сут	Контроль	АБК внесена	
		в начале пассажа	на 4-й день
ЛТ ₅₀ , °С			
1	-5.3 ± 0.3	-5.3 ± 0.3	–
2	-5.5 ± 0.3	-5.5 ± 0.3	–
3	-5.7 ± 0.3	-6.6 ± 0.3	–
4	-6.5 ± 0.2	-7.4 ± 0.2	-7.4 ± 0.2*
5	-7.5 ± 0.2	-8.2 ± 0.2	-8.6 ± 0.2

Добавление АБК на разных стадиях развития культуры оказывало разное влияние и на некоторые другие физиолого-биохимические показатели. Так, АБК, внесенная в нулевой точке пассажа, практически полностью подавляла накопление сырой массы клеток (рис. 4, а). При этом пик митотической активности был слабо выражен и приходился на 5-е сутки, а не на 4-е сутки, как в необработанных клетках (рис. 4, б).

При добавлении гормона на 4-е сутки культивирования также наблюдались подавление роста клеточной культуры (рис. 4, а) и уменьшение величины митотического индекса (рис. 4, б), однако снижение этих параметров не было таким значительным.



Рис. 4. Влияние АБК на рост суспензионной культуры и митотический индекс суспензионной культуры озимой пшеницы в зависимости от времени ее внесения: а) ростовая кривая суспензионной культуры; б) изменение митотического индекса суспензионной культуры. Конечная концентрация гормона составляла 50 мкМ

3. Обсуждение

Как следует из приведенных данных, клетки, выращенные в стационарных условиях (26 °С), были более устойчивы к промораживанию на стадии растяжения, тогда как при закаливании максимальную величину жизнеспособности показывали более молодые клетки (рис. 2), которые находились в стадии активного клеточного деления, что подтверждалось максимальной величиной митотического индекса (рис. 1), а также, как было показано нами ранее, значительным увеличением количества каллозы в этот период [14], накопление которой связывается с формированием срединной пластинки при делении и может использоваться для экспресс-оценки процесса деления. Кроме того, при выращивании в стационарных условиях клетки этого возраста характеризовались наибольшей активностью гидролитических ферментов клеточной стенки, которая затем снижалась при переходе клеток к растяжению [14], показывая значительную интенсивность катаболических реакций на стадии деления. То, что клетки, и так имеющие высокий уровень активности ферментов в стационарных условиях (рис. 3), показывают дополнительное увеличение активности при действии закалывающей температуры, свидетельствует о том, что в условиях адаптации возрастает напряженность катаболических реакций, направленных на перестройку метаболизма в изменившихся условиях. Следует отметить, что усиление ферментативной активности при низкотемпературной адаптации отмечалось нами ранее на проростках озимой пшеницы [15]. При этом быстрая и краткосрочная активация гликозидаз, наблюдаемая в самом начале периода закалывания (на 3–4-й час гипотермии), ингибировалась циклогексимидом, который также ингибировал процесс формирования морозоустойчивости проростков [16], что указывает на вовлеченность этих ферментов в реализацию формирования морозостойкого состояния. Наблюдаемая нами разница в активации гидролаз на разных стадиях развития культуры как в стационарных условиях [14], так и при действии закалывающей температуры (рис. 3) показывает, что молодые, делящиеся клетки характеризуются более высокой метаболической активностью, что позволяет

им развивать бóльшую морозоустойчивость (рис. 2). Биохимические, а также морфологические особенности молодых клеток, которые обеспечивают им преимущества при действии внешних факторов, были отмечены в работах других авторов. Так, на культуре клеток рапса было показано, что клетки, еще не вошедшие в фазу быстрого роста, имеют распределение и организацию микрофиламентов в виде тонкой сети, которая является более лабильной и быстро разбирается в ответ на снижение температуры [17]. Различный ответ клеток, отобранных с разных стадий развития, на внешние воздействия также был продемонстрирован на культуре клеток *Arabidopsis thaliana* [9]. Клетки, находящиеся на лаг-фазе, были способны к повышению морозоустойчивости при действии АБК, в отличие от клеток логарифмической фазы роста. В наших экспериментах степень подавления митотического индекса и нарастания сырой массы клеток под действием АБК также зависела от возраста клеток. Снижение митотического индекса при добавлении АБК в среду культивирования свидетельствует о снижении количества делящихся клеток. По мнению Иванова [18], любое изменение скорости деления приводит к изменению скорости перехода клеток к растяжению, и это, в свою очередь, приводит к изменению скорости роста, что мы и наблюдали в наших экспериментах (рис. 4). При большем подавлении митотического индекса нарастание сырой массы клеток практически отсутствует (АБК внесена в начале пассажа), а менее выраженный ингибирующий эффект на митотическую активность сопровождается меньшим подавлением ростовых процессов (АБК внесена на 4-й день). Любопытно, что в последнем случае период формирования морозоустойчивого состояния у клеток был намного короче, и через сутки после добавления АБК достигался тот же уровень морозоустойчивости, который наблюдался только на 5-е сутки при добавлении АБК в начале пассажа (табл. 1).

Различными авторами высказывается мнение, что реакция клеток на внешние воздействия, в том числе и чувствительность клеток к АБК [9], определяется не просто возрастом клеток, а стадией клеточного цикла, в которой находятся большинство клеток на данный момент. Роль клеточного цикла в ответных реакциях растений на внешние воздействия, а также действие различных факторов на протяженность стадий клеточного цикла достаточно широко обсуждается как в обзорах, так и в экспериментальных статьях [19, 20], хотя молекулярные механизмы запуска и регуляции клеточного цикла под действием температуры или АБК до сих пор не детализированы. На данный момент известно, что АБК влияет на переход из G₁- в S-стадию клеточного цикла [19], что обусловлено тем, что АБК индуцирует экспрессию ингибитора циклин-зависимой киназы (ICK1), не оказывая влияния на другие гены клеточного цикла [20]. Исходя из этих данных, можно предположить, что наблюдаемое в нашей работе значительное ингибирование митотического индекса и ростовых процессов под действием АБК при внесении гормона в начале пассажа может свидетельствовать о том, что большинство клеток в этот момент находилось на стадии клеточного цикла, которая наиболее чувствительна к действию АБК, а именно на G₁-стадии, а во втором случае, при внесении АБК на максимуме митотической активности, большая часть клеток прошла эту ключевую точку (*checkpoint*) восприимчивости к гормону. Однако, опираясь на существующие на данный

момент работы, трудно объяснить, почему в наших экспериментах клетки, которые слабее реагировали на АБК ингибированием роста и снижением митотического индекса, быстрее достигали морозоустойчивого состояния. В отдельных работах высказывается мнение, что АБК может регулировать и другие стадии клеточного цикла [21]. Однако подобные работы крайне малочисленны и нет бесспорных доказательств того, что ингибирование ростовых процессов и формирование морозоустойчивого состояния обусловлено действием АБК на разные стадии клеточного цикла. Кроме того, в работах, в которых проводились исследования действия гормона на клеточный цикл и взаимосвязь этого с ответной реакцией организма на внешние стимулы, растения подвергали стрессовым воздействиям, таким как резкое снижение или повышение температуры [22]. Исследование взаимозависимости протекания процесса адаптации к пониженным температурам под действием АБК с успешным прохождением фаз клеточного цикла требует дальнейшего изучения. Исходя из наших данных, мы можем пока только констатировать факт, что клетки, находящиеся в стадии активного клеточного деления быстрее достигают морозоустойчивого состояния под действием экзогенно добавленной АБК.

Таким образом, проведенные эксперименты выявили существенные различия в ответной реакции клеток *Triticum timopheevii* Zhuk., находящихся на разных стадиях развития, на закалывающую температуру и АБК. Клетки в период активного клеточного деления проявляли более высокую способность к закаливанию низкими положительными температурами, отвечали на действие температуры более значительной и длительной активацией гидролитических ферментов клеточной стенки и имели более быструю реакцию на экзогенно добавленную АБК. Поскольку разница между стадиями развития культуры в основном определяется пулом клеток, находящихся преимущественно в той или иной фазе клеточного цикла, мы можем предположить, что наблюдаемые различия могут быть связаны с разной чувствительностью клеток, находящихся в определенной фазе клеточного цикла. Дальнейшие шаги в этом направлении помогут понять механизм адаптации растений к неблагоприятным факторам.

Авторы выражают благодарность сотрудникам отдела биотехнологии Института физиологии растений им. Тимирязева РАН (г. Москва) за предоставление суспензионной культуры клеток пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk.

Литература

1. Guy C., Kaplan F., Kopka J., Selbig J., Hinch D.K. Metabolomics of temperature stress // *Physiol. Plant.* – 2008. – V. 132, No 2. – P. 220–235. – doi: 10.1111/j.1399-3054.2007.00999.x.
2. Thomashow M.F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1999. – V. 50. – P. 571–599.
3. Pearce R.S., Houlstoun C.E., Atherton K.M., Rixon J.E., Harrison P., Hughes M.A., Alison Dunn M. Localization of expression of three cold-induced genes, *blt101*, *blt4.9*, and *blt14*, in different tissues of the crown and developing leaves of cold-acclimated cultivated barley // *Plant Physiol.* – 1998. – V. 117, No 3. – P. 787–795.

4. Fennel A., Li P.H., Markhart A.H. Influence of air and soil temperature on water relations and freezing tolerance of spinach (*Spinacia oleracea*) // *Physiol. Plant.* – 1990. – V. 78, No 1. – P. 51–56.
5. Gusta L.V., Fowler D.B., Tyler N.J. Factors influencing hardening and survival in winter wheat // *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress* / Eds. P.H. Li, A. Sakai. – N. Y.: Acad. Press, 1982. – V. 2. – P. 33–40.
6. Сопина Н.Ф., Карасев Г.С., Трунова Т.Н. АБК как фактор закаливания суспензионной культуры пшеницы к морозу // *Физиология растений.* – 1994. – Т. 41, № 4. – С. 546–551.
7. Sasaki Y., Takahashi K., Oono Y., Seki M., Yoshida R., Shinozaki K., Uemura M. Characterization of growth-phase-specific responses to cold in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells // *Plant Cell Environ.* – 2008. – V. 31, No 3. – P. 354–365.
8. Chen T.H., Gusta L.V. Abscisic acid-induced freezing resistance in cultured plant cells // *Plant Physiol.* – 1983. – V. 73, No 1. – P. 71–75.
9. Yoshida S., Hattanda Y., Suyama T. Variations in chilling sensitivity of suspension-cultured cells of mung bean (*Vigna radiata* [L.] Wilczek) during the growth cycle // *Plant Cell Physiol.* – 1993. – V. 34, No 5. – P. 673–678.
10. Зориняц С.Э., Смоленская И.Н., Носов А.В. Быстрорастущая суспензионная культура клеток и протопласты пшеницы Тимофеева // *Физиология растений.* – 1993. – Т. 40, № 2. – С. 300–306.
11. Schenk R.U., Hildebrandt A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures // *Can. J. Bot.* – 1972. – V. 50, No 1. – P. 199–204.
12. Towill L.E., Mazur P. Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures // *Can. J. Bot.* – 1975. – V. 53, No 11. – P. 1097–1102.
13. Uemura M., Steponkus P.L. Parallel effects of freezing and osmotic stress on the ATPase activity and protein composition of the plasma membrane of winter rye seedlings // *Plant Physiol.* – 1989. – V. 91, No 3. – P. 961–969.
14. Ларская И.А., Барышева Т.Б., Заботин А.И. Особенности изменения внеклеточного матрикса клеток в процессе развития суспензионной культуры *Triticum timopheevii* Zhuk. // *Цитология.* – 2005. – Т. 47, № 7. – С. 602–608.
15. Заботин А.И., Барышева Т.С., Заботина О.А., Ларская И.А., Лозовая В.В., Белдман Г., Вораген А.Дж. Вовлеченность матрикса клеточной стенки в процесс низкотемпературной адаптации озимой пшеницы // *Физиология растений.* – 1998. – Т. 45. – С. 425–432.
16. Барышева Т.С., Заботина О.А., Заботин А.И. Влияние циклогексимида на синтез полисахаридов клеточной стенки и активность гликозидаз корней пшеницы при закаливании к морозу // *Физиология растений.* – 1999. – Т. 46, № 4. – С. 633–638.
17. Egierszdorff S., Kasperska A. Low temperature effects on growth and actin cytoskeleton organisation in suspension cells of winter oilseed rape // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2001. – V. 65, No 2. – P. 149–158.
18. Иванов В.Б. Использование корней как тест-объектов для оценки биологического действия химических соединений // *Физиология растений.* – 2011. – Т. 58, № 6. – С. 944–952.
19. Swiatek A., Lenjou M., van Bockstaele D., Inzé D., van Onckelen H. Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 128, No 1. – С. 201–211.

20. Dudits D., Ábrahám E., Miskolczi P., Ayaydin F., Bilgin M., Horváth G.V. Cell-cycle control as a target for calcium, hormonal and developmental signals: the role of phosphorylation in the retinoblastoma-centred pathway // *Ann. Bot.* – 2011. – V. 107, No 7. – P. 1193–1202. – doi: 10.1093/aob/mcr038.
21. Xu J., Gao G., Du J., Guo I., Yang C. Cell cycle modulation in response of the primary root of *Arabidopsis* to ABA // *Pak. J. Bot.* – 2010. – V. 42, No 4. – P. 2703–2710.
22. Peres A., Churchman M.L., Hariharan S., Himanen K., Verkest A., Vandepoele K., Magyar Z., Hatzfeld Y., Van Der Schueren E., Beemster G.T., Frankard V., Larkin J.C., Inzé D., de Veylder L. Novel plant-specific cyclin-dependent kinase inhibitors induced by biotic and abiotic stresses // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282, No 25. – P. 25588–25596.

Поступила в редакцию
05.07.13

Ларская Ирина Алексеевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник, Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань, Россия.

E-mail: pzl@mail.ru

Барышева Тальмира Сергеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань, Россия.

Трофимова Оксана Игоревна – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник, Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань, Россия.

E-mail: trofimova@mail.knc.ru

Заботин Алексей Иванович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань, Россия.

E-mail: zabotinalex@mail.ru

* * *

RESPONSE OF CELLS TO TEMPERATURE AND ABSCISIC ACID DEPENDING ON THE STAGE OF DEVELOPMENT OF A SUSPENSION CULTURE

I.A. Larskaya, O.I. Trofimova, T.S. Barysheva, A.I. Zabolin

Abstract

The use of the suspension culture of *Triticum thimopheevii* Zhuk. as an object for research made it possible to describe the response of cells to hardening temperature depending on the stage of development of the culture. On the 4th or 5th day of cultivation, the cells undergoing active cell division showed higher ability to hardening by low positive temperatures (2°C, 7 days) and responded to the action of temperature by the increased and longer activation of the cell wall hydrolytic enzymes (β -glucosidase, β -fucosidase). The addition of abscisic acid (50 mM) without cold action also led to the increase in the cold hardiness of the suspension culture cells. The maximum level of hardiness was observed on the 5th day, when abscisic acid were added at the beginning of the passage, and a day later, after adding the hormone to the cells of 4-day age. It is assumed that plant hardening is determined by the subpopulation of cells undergoing a certain stage of cell cycle.

Keywords: *Triticum thimopheevii*, suspension cell culture, low-temperature adaptation, cell wall enzymes, abscisic acid.

References

1. Guy C., Kaplan F., Kopka J., Selbig J., Hinch D.K. Metabolomics of temperature stress. *Physiol. Plant.*, 2008, vol. 132, no. 2, pp. 220–235. doi: 10.1111/j.1399-3054.2007.00999.x.

2. Thomashow M.F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1999, vol. 50, pp. 571–599.
3. Pearce R.S., Houlstoun C.E., Atherton K.M., Rixon J.E., Harrison P., Hughes M.A., Alison Dunn M. Localization of expression of three cold-induced genes, *blt101*, *blt4.9*, and *blt14*, in different tissues of the crown and developing leaves of cold-acclimated cultivated barley. *Plant Physiol.*, 1998, vol. 117, no. 3, pp. 787–795.
4. Fennel A., Li P.H., Markhart A.H. Influence of air and soil temperature on water relations and freezing tolerance of spinach (*Spinacia oleracea*). *Physiol. Plant.*, 1990, vol. 78, no. 1, pp. 51–56.
5. Gusta L.V., Fowler D.B., Tyler N.J. Factors influencing hardening and survival in winter wheat. *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress* (Eds. P.H. Li, A. Sakai). N. Y., Acad. Press, 1982, vol. 2, pp. 33–40.
6. Sopina N.F., Karasev G.S., Trunova T.N. Abscisic acid as a factor of frost hardening of wheat suspension culture. *Fiziologiya rastenii*, 1994, vol. 41, no. 4, pp. 546–551. (In Russian)
7. Sasaki Y., Takahashi K., Oono Y., Seki M., Yoshida R., Shinozaki K., Uemura M. Characterization of growth-phase-specific responses to cold in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. *Plant Cell Environ.*, 2008, vol. 31, no. 3, pp. 354–365.
8. Chen T.H., Gusta L.V. Abscisic acid-induced freezing resistance in cultured plant cells. *Plant Physiol.*, 1983, vol. 73, no. 1, pp. 71–75.
9. Yoshida S., Hattanda Y., Suyama T. Variations in chilling sensitivity of suspension-cultured cells of mung bean (*Vigna radiata* [L.] Wilczek) during the growth cycle. *Plant Cell Physiol.*, 1993, vol. 34, no. 5, pp. 673–678.
10. Zorinyants S.E., Smolenskaya I.N., Nosov A.V. Fast-growing suspension-cultured cells and protoplast of wheat from Timofeev. *Fiziologiya rastenii*, 1993, vol. 40, no. 2, pp. 300–306. (In Russian)
11. Schenk R.U., Hildebrandt A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 1972, vol. 50, no. 1, pp. 199–204.
12. Towill L.E., Mazur P. Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. *Can. J. Bot.*, 1975, vol. 53, no. 11, pp. 1097–1102.
13. Uemura M., Steponkus P.L. Parallel effects of freezing and osmotic stress on the ATPase activity and protein composition of the plasma membrane of winter rye seedlings. *Plant Physiol.*, 1989, vol. 91, no. 3, pp. 961–969.
14. Larskaya I.A., Barysheva T.B., Zabotin A.I. Peculiarities of the change in the extracellular matrix of cells in the process of development of the suspension culture of *Triticum timopheevii* Zhuk. *Tsitologiya*, 2005, vol. 47, no. 7, pp. 602–608. (In Russian)
15. Zabotin A.I., Barysheva T.S., Zabolina O.A., Larskaya I.A., Lozovaya V.V., Beldman G., Voragen A.G. Involvement of the cell wall matrix in the process of low-temperature adaptation of winter wheat. *Fiziologiya rastenii*, 1998, vol. 45, pp. 425–432. (In Russian)
16. Barysheva T.S., Zabolina O.A., Zabolina A.I. Influence of cycloheximide on the synthesis of cell-wall polysaccharides and the activity of glycosidases in wheat roots under frost hardening. *Fiziologiya rastenii*, 1999, vol. 46, no. 4, pp. 633–638. (In Russian)
17. Egierszdorff S., Kacperska A. Low temperature effects on growth and actin cytoskeleton organisation in suspension cells of winter oilseed rape. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2001, vol. 65, no. 2, pp. 149–158.
18. Ivanov V.B. The use of roots as test objects for estimating biological effect of chemical compounds. *Fiziologiya rastenii*, 2011, vol. 58, no. 6, pp. 944–952. (In Russian)
19. Swiatek A., Lenjou M., van Bockstaele D., Inzé D., van Onckelen H. Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol.*, 2002, vol. 128, no. 1, pp. 201–211.
20. Dudits D., Abraham E., Miskolczi P., Ayaydin F., Bilgin M., Horváth G.V. Cell-cycle control as a target for calcium, hormonal and developmental signals: the role of phosphorylation in the retinoblastoma-centred pathway. *Ann. Bot.*, 2011, vol. 107, no. 7, pp. 1193–1202. doi: 10.1093/aob/mcr038.
21. Xu J., Gao G., Du J., Guo I., Yang C. Cell cycle modulation in response of the primary root of *Arabidopsis* to ABA. *Pak. J. Bot.*, 2010, vol. 42, no. 4, pp. 2703–2710.

22. Peres A., Churchman M.L., Hariharan S., Himanen K., Verkest A., Vandepoele K., Magyar Z., Hatzfeld Y., Van Der Schueren E., Beemster G.T., Frankard V., Larkin J.C., Inzé D., de Veylder L. Novel plant-specific cyclin-dependent kinase inhibitors induced by biotic and abiotic stresses. *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 282, no. 25, pp. 25588–25596.

Received
July 5, 2013

Larskaya Irina Alekseevna – PhD in Biology, Research Fellow, Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan Russia.

E-mail: pzl@mail.ru

Barysheva Talmira Sergeevna – PhD in Biology, Senior Research Fellow, Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan Russia.

Trofimova Oksana Igorevna – PhD in Biology, Junior Research Fellow, Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan Russia.

E-mail: trofimova@mail.knc.ru

Zabotin Aleksei Ivanovich – PhD in Biology, Senior Research Fellow, Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan Russia.

E-mail: zabotinalex@mail.ru