

0719592 - 1

На правах рукописи

Мухитов Александр Ринатович

ВЛИЯНИЕ КОЛХИЦИНА НА ГЕНЕТИЧЕСКУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ И МОРФОГЕННУЮ
АКТИВНОСТЬ КАЛЛУСОВ *FAGOPYRUM TATARICUM* (L.) Gaertn

03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Казань - 2000

Работа выполнена в лаборатории биохимии клеточной стенки
Казанского института биохимии и биофизики Казанского Научного Центра РАН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Н. И. Румянцева

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Чиков В.И.

кандидат биологических наук, доцент

Малков С.В.

Ведущая организация:

Институт биохимии и генетики

Уфимского Научного Центра РАН

Защита состоится "22" декабря 2000 г. в ____ час. на заседании специализированного
совета К 053.29.19 по присуждению учёной степени кандидата биологических наук при
Казанском Государственном Университете (420008, Казань, ул. Кремлевская, 18).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского Государственного
Университета (Казань, ул. Кремлевская, 35)

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА
КФУ



Автореферат разослан "21" ноября 2000 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
канд. биол. наук

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Аскарова' (Askarova), with a stylized flourish at the end.

А. Н. Аскарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Исследования, проведенные учёными за последние три десятилетия, ярко иллюстрируют, что клеточная стенка и цитоскелет растений вовлечены в регуляцию морфогенеза и биохимическая перестройка этих структур может приводить к высвобождению сигнальных молекул, функционирующих как вторичные мессенджеры (Fry, 1988; Rosette, Karin, 1995; Streuli, 1999). Поддержание определенного размера является необходимым условием для сохранения и реализации клеткой морфогенетического потенциала, и это условие осуществляется вследствие координированного взаимодействия элементов цитоскелета и клеточной стенки (Lloyd, 1980).

Тем не менее, несмотря на то, что клеточная стенка и цитоскелет являются предметом активного изучения, взаимодействие этих двух структур в реализации морфогенетической программы освещено крайне слабо. Одним из наиболее продуктивных подходов к изучению взаимодействия цитоскелета и клеточной стенки может быть использование агентов, разрушающих цитоскелет. Ранее было показано, что колхицин - вторичный продукт *Colchicum autumnale* L. - вызывает растяжение клеток и разрыхление клеточных агрегатов в суспензионных культурах (Umetsu et al., 1975; Hayashi, Yoshida, 1988; Borkird, Sung, 1991), что косвенно могло свидетельствовать об изменении состава их клеточных стенок.

Колхицин часто используется для индукции полиплоидии, поскольку он разрушает веретено деления, тем самым, препятствуя расхождению хромосом. Кроме того, установлено, что колхицин является мутагеном (Hague, Jones, 1987) и может вызывать изменение транскрипции определенных генов (Rosette, Karin, 1995). Тем не менее, эффект длительного воздействия колхицина на генетическую стабильность малоизучен, хотя проведение таких исследований немаловажно в связи с тем, что колхицин широко используется при получении полиплоидов, межвидовых гибридов и чистых линий многих сельскохозяйственных растений, а также применяется в качестве цитостатического агента в терапии опухолей. Таким образом, важность изучения действия колхицина на клетку определяется не только актуальностью исследования участия клеточной стенки и цитоскелета в процессе морфогенеза, но и широким практическим применением колхицина в биологии и медицине.

Ране нами было показано (Румянцева и др., 1998), что морфогенные каллусы *Fagopyrum tataricum* сохраняют характерную морфологию, способность к регенерации и хромосомные числа стабильными в течение длительного культивирования (до 10 лет). Неморфогенные рыхлые клоны возникают в таких каллусах с частотой один случай на 30-40 пассажей и могут рассматриваться как спонтанные точковые мутации. Использование такого объекта может быть крайне удобным для изучения индуцированной нестабильности *in vitro*.

Целью нашей работы было изучить действие колхицина на генетическую стабильность и морфогенную способность каллусов гречихи татарской. Основными задачами этой работы были следующие:

1. Изучить влияние длительного воздействия колхицина на параметры культурального цикла (прирост биомассы, пролиферативная активность), а также на морфолого-гистологические особенности морфогенного и неморфогенного каллусов *Fagopyrum tataricum*.
2. Исследовать действие колхицина на полисахаридный состав клеточных стенок каллусов с разной морфогенной способностью.
3. Изучить влияние длительного действия колхицина на морфологическую и генетическую стабильность клеток каллусов *Fagopyrum tataricum*.
4. Изучить влияние колхицина на морфогенную активность каллусов гречихи татарской.
5. Проанализировать белковый состав каллусов с разным морфогенным потенциалом.

Научная новизна.

Впервые проведено комплексное исследование действия колхицина на целый ряд параметров длительно культивируемых каллусных линий *Fagopyrum tataricum*. Изучено влияние этого ингибитора полимеризации микротрубочек на морфологию, цитогенетику и морфогенную способность каллусных культур, полисахаридный состав их клеточных стенок, а также на спектр синтезируемых белков. Впервые показано, что неморфогенные каллусы более чувствительны к ингибитору сборки микротрубочек колхицину, по сравнению с морфогенными, из-за их неспособности останавливать последующее деление клеток в ответ на нарушение митоза и возникновение аномалий кариотипа (поли- и анзуплоидизация клеток). Впервые показано, что длительное культивирование на среде с колхицином вызывает уменьшение количества пектинов и увеличение количества гемицеллюлоз. Выявлено, что обработка колхицином приводит к нарушению генетической стабильности морфогенного каллуса, индуцируя в нем геномные и хромосомные aberrации. Эта генетическая и морфологическая нестабильность сохраняется в течение многих пассажей на среде без колхицина. Впервые показано, что в отличие от растворимых белков неморфогенного каллуса большинство белков морфогенных каллусов гликозилировано. Каллусы с наибольшим морфогенным потенциалом имеют наиболее богатый спектр гликозилированных белков. Показано, что неморфогенные каллусы гречихи татарской, по ряду признаков (генетическая нестабильность, высокая пролиферативная активность, неспособность клеток к дифференцировке, слабые межклеточные контакты, большая чувствительность к цитостатическому агенту колхицину) аналогичны клеткам опухолей животных. Колхицин вызывает значительное увеличение частоты возникновения клонов неморфогенного каллуса и, таким образом, оказывает на морфогенные каллусы гречихи действие сходное с канцерогенным действием этого ингибитора на клетки животных. Получена колхицин-резистентная линия каллуса, показано, что она имеет отличия по параметрам цикла культивирования и генетической стабильности от чувствительного к колхицину каллуса.

Теоретическая и прикладная значимость работы. Полученные результаты могут быть полезны для исследователей изучающих проблемы стабильности генома, соматической вариабельности, динамики популяций клеток *in vitro*, а также роли цитоскелета в морфогенетических процессах и процессах биосинтеза клеточной стенки.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, одна статья находится в печати.

Апробация работы.

Результаты работы были представлены на итоговых конференциях Казанского Научного Центра РАН (1999, 2000), на II съезде Биохимического общества (Москва, 1997), VI Молодежной конф. ботаников (С.-Петербург, 1997, 2000), международном симпозиуме "Molecular Biology for Agriculture" (Ceske Budejovice, 1997), на II(X) Делегатском съезде Русского ботанического общества "Проблемы ботаники на рубеже XX-XXI веков" (С.-Петербург, 1998), на 2-м международном симпозиуме по биотехнологии растений (Kiev, 1998), на 2-й международной конференции "Progress in Plant Science from Plant Breeding to Growth Regulation" (Mosonmagyaróvár, Hungary, 1998), VII международном симпозиуме по гречихе (Winnipeg, Canada, 1998), III Респ. научной конф. молодых учёных и специалистов (Казань 1998), на VI съезде Общества физиологов растений России (Москва, 1999), XII конгрессе FESPP (Budapest, Hungary, 2000), на Всероссийском симпозиуме "Клеточная биология на пороге XXI века", (С.-Петербург, 2000), на школе-конференции "Горизонты физико-химической биологии" (Пушино, 2000).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 156 страницах, содержит 41 рисунок, 3 таблицы. Состоит из введения, 3 глав, выводов и списка литературы из 313 наименований, из них 46 отечественных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовали каллусные линии, полученные из незрелых зародышей татарской гречихи *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. Морфогенный каллус (линия МК) гречихи татарской представляет собой типичный для этого вида гречихи плотный гетерогенный каллус, состоящий из мягкого каллуса и проэмбриональных клеточных комплексов (Румянцева и др., 1998). Неморфогенный каллус (линия НК) *F. tataricum* был отселектирован из морфогенного, как спонтанно образовавшийся клон рыхлого каллуса. Каллусы культивировали в темноте, при температуре 25-28°C, на среде RX (Румянцева и др., 1989). Продолжительность одного пассажа составляла 20 суток. В опытах с колхицином колхицин (Sigma) профильтрованный через ультрафильтры Millipore (размер пор 0,22 мкм), добавляли в среду в концентрациях 0,25 мМ, 0,5 мМ, 1 мМ и 2 мМ. Морфогенный и неморфогенный каллусы культивировали на среде с колхицином 20, 45, 60 и 90 суток, после чего переносили на обычную среду.

Для определения регенерационной способности каллусных культур куски каллуса переносили со среды поддержания (RX) на среды регенерации RXR и MS⁶⁷. Регенерационную способность каллусов определяли качественно - по типу морфогенеза, который способен осуществлять каллус.

Прирост биомассы каллусов определяли, взвешивая начальный и конечный вес эксплантов, после чего определяли среднее значение прироста биомассы и ошибку средней (Глотов и др., 1982).

Выделение клеточной стенки проводили по методу Нишитани с соавт. (Nischitany et al., 1982). Фракционирование клеточной стенки проводили согласно Talmage с соавт. (Talmage et al., 1983).

Анализ моносахаров полисахаридов матрикса и внеклеточных полимеров проводили спектрофотометрическим методом с применением орто-толуидинового реактива (Резников и др., 1982). Статистическую обработку результатов осуществляли по формуле Фирудта (Бернштейн, Каминский, 1975) с помощью компьютерной программы "TOLUIDIN". Изучение полисахаридного состава клеточных стенок каллусов проводили совместно с мнс лаборатории биохимии клеточной стенки Валиевой А. И.

Приготовление цитогенетических препаратов. Каллус фиксировали в фиксаторе Кларка (этанол + уксусная кислота 3:1) и окрашивали 2% пропионовым орсеином ("Serva"). Давленные препараты готовили в 45% молочной кислоте. Препараты анализировали и фотографировали с помощью микроскопа Jenamed (Германия).

Митотический индекс определяли по формуле: $MI = \frac{M}{N} \cdot 100\%$, где N – общее количество клеток, а M – число делящихся клеток, при этом учитывалось не менее 5000 клеток на точку фиксации. Результаты обрабатывали статистически (Лакин, 1990).

Для выявления распределения клеток каллусов по классам пloidности подсчитывали хромосомы на 250-300 метафазных пластинках. Интервалы достоверности рассчитывали через критерий Фишера (Глотов, 1982).

Жизнеспособность клеток выявляли с помощью синего Эванса (Evans Blue, Sigma) путём прямого подсчёта интенсивно окрашиваемых клеток.

Проницаемость мембраны клеток каллусов оценивали по изменению количества K⁺ в инкубационной среде за 1 час (Пахомова, 1999). Измерения K⁺ проводили на пламенном

фотометре ПФМ (СССР). Определение проницаемости мембраны проводили совместно с с.н.с. лаборатории регуляции клеточного окисления Минибаевой Ф. В.

Для гистологических исследований материал фиксировали в 2,5% растворе глutarового альдегида, с постфиксацией в 1% растворе OsO_4 с добавлением сахарозы. После обезвоживания в этаноле, ацетоне и окиси пропилена срезы заключали в эпон. Срезы готовили на ультрамикротоме LKB-8800 ("LKB", Швеция) и окрашивали 1% метиленовым синим. Препараты фотографировали с помощью микроскопа Jenamed (Reichert Jung, Германия).

Для сканирующей электронной микроскопии материал фиксировали в 2,5%-ном глutarовом альдегиде на фосфатном буфере ($\text{pH} = 7,3$) в течение 3 часов. Дофиксацию проводили в 1% OsO_4 на том же буфере 2 часа, обезвоживание - в градиенте спиртов до абсолютного этанола и ацетона. Образцы высушивали в критической точке с последующим напылением золота под вакуумом. Образцы анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа SCAN - 25 S фирмы Jeol.

Выделение и электрофорез ДНК. ДНК из клеток каллусов выделяли по методике Blin and Stafford (1976). Электрофорез тотальной ДНК проводили в 1% агарозном геле по стандартной методике (Маниатис и др, 1984).

Выделение белков проводили по методу Glass et al., (1981). Содержание белка определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976).

Электрофорез белков проводили в 10% полиакриламидном геле по стандартной методике (Laemmli, 1970). Гели окрашивали Кумаси голубым G-250. Отмытые и высушенные гели сканировали и обрабатывали с помощью программ Photoshop 5.0 и Corel Draw 8.0.

Иммуноблоттинг растворимых белков с антителами к тубулину и иммунологическое выявление гликопротеинов. Перенос белков с 12% геля на нитроцеллюлозные мембраны проводили на блоттере BioRad. Иммуноблоттинг тубулина осуществляли с помощью антител к α -тубулину ("Amersham", USA), конъюгированных со щелочной фосфатазой. Выявление гликопротеинов проводили с использованием китов для иммунодетекции гликопротеинов (Immun-Blot Kit for Glycoprotein Detection, BioRad).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние колхицина на морфолого-гистологические особенности каллусных культур

Ранее нами было показано (Румянцева и др., 1998), что морфогенные каллусы гречихи татарской состоят из проэмбриональных клеточных комплексов (ПЭКК) и клеток "мягкого каллуса", выполняющих трофические функции. Неморфогенный каллус *Fagorugum tataricum* состоит только из клеток паренхимы и его клетки не способны к дифференциации. Для неморфогенного каллуса гречихи татарской характерны также слабые межклеточные контакты и отсутствие плазмодесм. Наши исследования показали, что поверхность проэмбриональных клеточных комплексов морфогенного каллуса покрыта сетью экстраклеточного матрикса (ЭКМ), тогда как на поверхности клеток неморфогенного каллуса ЭКМ не наблюдается. Поверхностная сеть экстраклеточного матрикса представляет собой фибриллярную структуру, которая, по крайней мере, отчасти, имеет белковое происхождение (Dubois, et al., 1991; Samaj et al., 1995; Chapman et al., 2000). Поверхностная сеть экстраклеточного матрикса - структурный маркер, характерный для ПЭКК морфогенных культур и проэмбрио. Таким образом, наличие поверхностной сети экстраклеточного матрикса коррелирует с морфогенной способностью каллусов гречихи татарской.

Наши исследования показали, что колхицин вызывает дезагрегацию и вакуолизацию клеток в проэмбриональных клеточных комплексах морфогенного каллуса. В результате действия колхицина межклеточные контакты в ПЭКК разрушались, клетки приобретали

округлую форму и увеличились в размерах. В каллусе прекратилось образование проэмбриональных клеточных комплексов, что может быть результатом дезагрегации клеток. Дезагрегация, вакуолизация и увеличение размеров клеток в результате действия колхицина были пропорциональны времени культивирования каллусов на среде с этим агентом. Важно отметить, что на среде с колхицином в субповерхностных клетках каллусов происходило накопление глобулярных белковых телец. Показано, что обработка колхицином может приводить к исчезновению с поверхности клеток проэмбрио *Cichorium* сети экстраклеточного матрикса (Chapman et al., 2000). Аналогичный эффект колхицина и трифлуралина (ингибитора полимеризации микротрубочек) наблюдали на клетках *Drosera rotundifolia* (Bobak et al., 1999). Возможно, что на среде с колхицином в клетках морфогенного каллуса гречихи татарской накапливаются именно белки, имеющие отношение к экстраклеточному матриксу, которые в норме транспортируются на поверхность ПЭКК. Накопление этих веществ в клетках является, по-видимому, следствием нарушения их направленного транспорта к поверхности ПЭКК.

Другим интересным явлением было появление в каллусах клеток с огодевшей от КС плазмалеммой и сжатой цитоплазмой, содержащей ядерный материал. На 8 день встречались лишь единичные клетки с такими признаками. На 16 суток количество таких клеток составляло 5-7%, а после 24 суток культивирования на среде с колхицином - около 10%.

Показано (Pont-Lezica et al., 1993), что отделение плазмалеммы от клеточной стенки

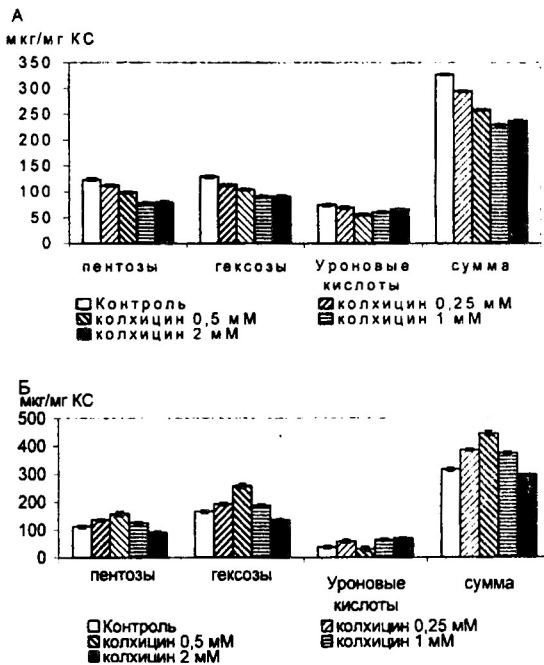


Рис. 1. Влияние колхицина на содержание полисахаридов в клеточной стенке морфогенного каллуса. А - пектиновая фракция, Б - фракция гемицеллюлоз.

может являться следствием разрушения сайтов адгезии, в формировании которых принимают участие, как микротрубочки, так и микрофиламенты цитоскелета. Сайты адгезии клеточной стенки и плазмалеммы образованы трансмембранными белками, к внутреннему домену которых прикреплены элементы цитоскелета, а внешний домен закреплен внутри клеточной стенки. На клетках животных показано, что нарушение связей интегральных белков плазматической мембраны с экстраклеточным матриксом приводит к программированной клеточной смерти (ПКС) (Bates et al., 1994; Frish, Fransis, 1994). Можно предположить, что действие колхицина привело к разрушению сайтов адгезии КС с плазмалеммой. Результатом этого явилось отделение плазмалеммы от КС, и, возможно, программированная клеточная смерть. В

неморфогенном каллусе контакт между клетками значительно слабее, чем в морфогенном. На среде с колхицином наблюдалась ещё более сильная дезагрегация клеток и увеличение их размеров. На 8-е сутки появились клетки с отошедшей от клеточной стенки цитоплазмой (признаками, похожими на происходящие при программированной клеточной смерти). Накопление в клетках белковых телец не наблюдалось.

Поскольку форма растительной клетки зависит как от цитоскелета, так и от клеточной стенки, мы решили исследовать полисахаридный состав клеточных стенок каллусов. Ранее было показано (Rumyantseva et al., 1998), что культивирование морфогенных каллусов *Fagopyrum tataricum* на среде с 0,25 мМ колхицина приводит к некоторому снижению количества пектинов в клеточной стенке. В данной работе мы исследовали влияние разных концентраций колхицина (0,25 мМ, 0,5 мМ, 1 мМ и 2 мМ) на полисахаридный состав КС каллусов. Наши исследования показали, что при добавлении в среду культивирования колхицина в КС морфогенного каллуса снижалось количество пектиновых веществ. Это снижение происходило главным образом за счёт нейтральной фракции полисахаридов. Количество гемицеллюлоз и целлюлозы в КС на среде с колхицином увеличилось (Рис. 1). Эти изменения коррелировали с изменением морфологии

клеток, составляющих культуру. Анализируя полученные нами результаты, можно предположить, что дезагрегация клеток ПЭКК может объясняться либо нарушением транспорта матричных полисахаридов к клеточной стенке, либо деградацией и метаболизацией пектинов в клеточной стенке и срединной пластинке, поскольку срединная пластинка состоит главным образом из пектинов (Ishii, 1981; Moore et al., 1986; Fry, 1988). Увеличение же количества гемицеллюлоз может быть связано не с увеличением их синтеза, а с изменением характера их связей с полимерами клеточной стенки после деградации пектинов, и как следствие - с более легкой экстракцией гемицеллюлозных молекул. По-видимому, изменение полисахаридного состава КС под действием колхицина является активным процессом и связано с распадом и модификацией матричных полисахаридов, что в свою очередь определяется изменением активности ферментов, локализованных в клеточной стенке.

В неморфогенном каллусе на среде с колхицином

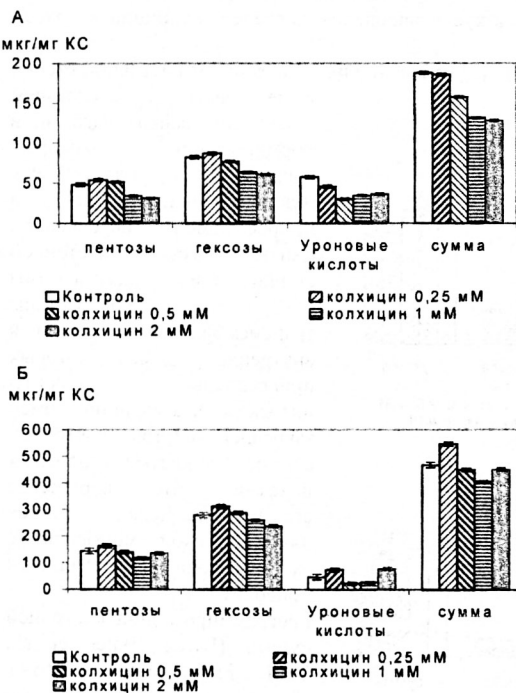


Рис. 2. Влияние колхицина на содержание полисахаридов в клеточной стенке неморфогенного каллуса. А - фракция пектинов, Б - фракция гемицеллюлоз.

количество пектиновых веществ не изменилось существенным образом при концентрации

колхицина 0,25 мМ. При остальных концентрациях количество пектинов снизилось: при 0,5 мМ за счёт уоновых кислот, а при концентрациях 1 мМ и 2 мМ за счёт уоновых кислот и нейтральных полисахаридов. Количество гемицеллюлоз увеличилось только при концентрации 0,25 мМ, причём менее значительно, чем в случае морфогенного каллуса (Рис. 2). Содержание целлюлозы в клеточной стенке изменилось лишь в пределах ошибки средней. Таким образом, были выявлены отличия в характере изменений полисахаридного состава клеточных стенок морфогенного и неморфогенного каллусов. Можно предположить, что в неморфогенном каллусе нарушен каскад событий, при котором разрушение элементов цитоскелета запускает процессы метаболизации полисахаридов клеточной стенки. Изменение же состава пектинов при концентрациях колхицина 0,5мМ-2мМ связано, скорее всего, с процессами тотальной деградации клеточных стенок, вероятно, объясняемой некрозом клеток неморфогенного каллуса, так как известно, что одно и то же вещество может индуцировать апоптоз при низких концентрациях и некроз при высоких (Harmon et al., 1990).

2. Влияние колхицина на параметры культурального цикла и цитогенетическую изменчивость в морфогенных и неморфогенных каллусах

2.1. Эффект колхицина на динамику жизнеспособности клеток, прирост биомассы и пролиферативную активность каллусов

Наши исследования выявили значительные различия между морфогенным и неморфогенным каллусами гречихи по чувствительности к колхицину. Морфогенный каллус (линия МК), даже после длительного культивирования на среде с колхицином (до 3-х месяцев), сохраняет высокий процент жизнеспособных клеток, тогда как неморфогенный каллус (линия НК) погибает практически полностью после 15-20 суток культивирования на среде с колхицином.

Различия в чувствительности к колхицину у морфогенного и неморфогенного каллусов показывает также анализ действия колхицина на прирост биомассы каллусов за пассив. На средах с колхицином мы наблюдали увеличение прироста сырого веса морфогенного каллуса за счёт увеличения оводнённости клеток. Для неморфогенного каллуса мы наблюдали совершенно иную картину влияния колхицина на прирост биомассы, чем в случае морфогенного каллуса. При всех концентрациях колхицина происходило значительное ингибирование прироста веса каллуса.

Ранее нами было показано, что морфогенный и неморфогенный каллусы *F. tataricum* отличаются по динамике митотического индекса (МИ) (Румянцева и др., 1998). Кривая пролиферативной активности МК, в отличие от НК, имеет многовершинный вид, что может свидетельствовать о более сложном характере культурального цикла у этого каллуса. Видимому, это связано со сложной структурой МК и с разнообразием типов клеток в нём. Образование новых ПЭКК сопровождается активацией деления эмбриогенных клеток. Культуральный цикл неморфогенного каллуса характеризуется одним пиком пролиферативной активности в ходе пассажа, что отражает более простую, по сравнению с МК, структуру этого каллуса. При культивировании морфогенного каллуса на среде с колхицином, при всех применённых нами концентрациях, наблюдалось исчезновение вторичных пиков пролиферативной активности. Зависимость величины МИ от концентрации ингибитора МТ имела сложный характер: при концентрациях колхицина 0,25 мМ и 1 мМ максимум МИ возрастал, по сравнению с контролем, а при 0,5 мМ и 2 мМ - мало отличался от контроля. На среде с колхицином у неморфогенного каллуса наблюдалась та же зависимость величины МИ от концентрации ингибитора в среде, что и для морфогенного каллуса. Интересно, что в опытных вариантах мы отмечали появление нехарактерных для неморфогенных каллусов вторичных пиков митотической активности. Повышение МИ в каллусах на среде с колхицином, по сравнению с контролем может быть

следствием стимуляции деления клеток колхицином или метафазного блока. В последнем случае значение МИ возрастает не вследствие увеличения пролиферативной активности, а в результате накопления в культуре клеток, находящихся на стадии метафазы. Анализ кривых МИ при концентрациях колхицина 0,25 мМ, 0,5 мМ, 1 мМ и 2 мМ позволяет предположить, что оба вышеупомянутых пути повышения МИ имеют место, но их проявление зависит от концентрации ингибитора. Наиболее яркое отличие эффектов колхицина на НК и МК - исчезновение у МК вторичных пиков митотической активности, тогда как у НК, наоборот, такие пики возникают. Исчезновение вторичных пиков митотической активности у МК может быть обусловлено нарушением цикла воспроизведения ПЭКК в морфогенном каллусе. Появление у НК вторичных пиков МИ на среде с колхицином в интервале от двенадцатых суток до конца пассажа может объясняться стимуляцией деления клеток колхицином или селекцией в пользу клеток, обладающих большей устойчивостью к колхицину, по сравнению с основной массой клеток в популяции.

2.2. Действие колхицина на цитогенетические характеристики каллусов

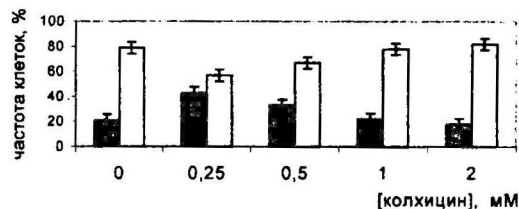
Кариотип гречихи татарской представлен 16 хромосомами. Морфогенные каллусы гречихи татарской характеризуются высокой стабильностью цитогенетических признаков: на протяжении 12 лет культивирования 90-98 % их клеток имеют диплоидный, а 2-10 % клеток - гаплоидный набор хромосом. Неморфогенный каллус представляет собой миксопloidную клеточную популяцию с модальными классами плоидности 2n, 3n и 4n (Румянцева и др., 1998).

Для определения изменения плоидности культуры под действием колхицина мы фиксировали каллус в двух временных точках - 5 и 15 суток. Первая точка характеризует начальные этапы полиплоидизации культуры (на этой стадии наибольшее число клеток проходит 1-3 деления), а вторая - стадию накопления полиплоидных клеток (в этой точке большинство пролиферативно-активных клеток уже прошли через митоз). Вторая точка фиксации интересна по следующим соображениям. Как известно, нарушение хода клеточного цикла может приводить к блоку последующих делений клетки, причём такой блок характерен для нормальных клеток (то есть, для клеток с ненарушенным механизмом контроля генетической стабильности) - у животных такие клетки после повреждения не вступают в деление и нередко погибают по механизму апоптоза (Новиков и др., 1996). В том случае, если механизмы контроля генетической стабильности повреждены, то клетки не останавливают деление в ответ на нарушения клеточного цикла, а продолжают делиться, накапливая нарушения, что характерно для трансформированных клеток животных. Таким образом, исследование степени полиплоидизирующего эффекта колхицина на МК и НК может пролить свет на причину разной чувствительности клеток этих каллусов к колхицину.

Наши исследования показали, что колхицин оказывает на неморфогенный каллус более значительный полиплоидизирующий эффект, чем на морфогенный. Так, основная часть полиплоидных клеток морфогенного каллуса на среде с колхицином относилась к классам 3n и 4n (Рис. 3). Общее число клеток плоидностью от 5 до 8n не превышало 5 % на первой точке фиксации и 15% на второй. Высокополиплоидные клетки (>8n) на первой точке фиксации не наблюдались, а на второй их доля не превышала 3% (Рис. 4). При всех концентрациях колхицина около 50 % клеток морфогенного каллуса на первой точке фиксации и не менее 35% клеток на второй сохранили диплоидный набор хромосом. Доля клеток с микроядрами была пропорциональна концентрации ингибитора, и не превышала в максимуме 4% (при 2 мМ колхицина в среде культивирования) (Рис. 7). К концу пассажа доля клеток с микроядрами при всех концентрациях колхицина снижалась, что может свидетельствовать об их элиминации.

В клетках неморфогенного каллуса на среде с колхицином значительно возрастала доля клеток высоких уровней плоидности (5-8 и >8n) (Рис. 5, 6). Особенно значительно

А



Б

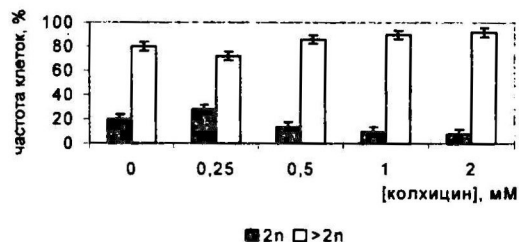
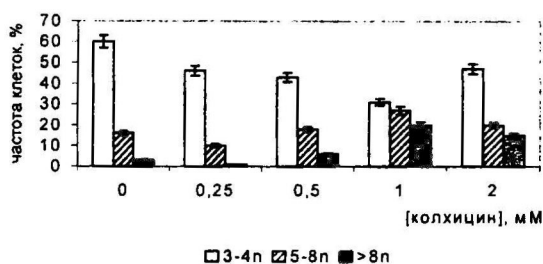


Рис. 5. Изменение ploидности клеток неморфогенного каллуса под действием колхицина. А - 5 суток, Б - 15 суток.

А



Б

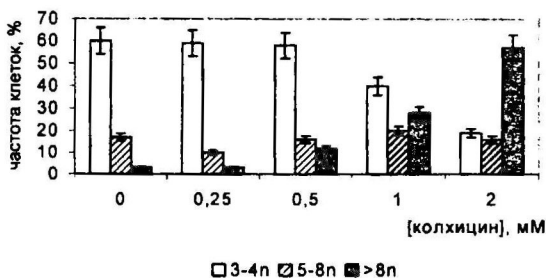


Рис. 6. Распределение полиплоидных клеток неморфогенного каллуса в % - зависимости от концентрации колхицина. А - 5 сут, Б - 15 сут.

возрастала доля таких клеток при концентрациях 1 и 2 мМ - до 48 % (из них 28% - >8n) и 73 % (из них 57 % - >8n), соответственно. На среде с колхицином доля клеток с микроядрами у НК также была значительно большей, чем у МК (Рис. 7), причём при концентрациях 1 и 2 мМ образование микроядер носило массовый характер и к 20-25 суткам 80-90 % клеток каллуса содержало микроядра (до 50 на клетку), причём, в отличие от МК, доля клеток с микроядрами к концу пассажа увеличивалась.

Интересно отметить, что на первой точке фиксации, при концентрациях колхицина 0,5 мМ, 1 мМ и 2 мМ мы наблюдали увеличение числа гаплоидных клеток, что является нехарактерным для колхицина эффектом. Гаплоидные клетки могли образоваться в результате неравноценных или многополюсных митозов, или вследствие amitotических делений, которые мы наблюдали в клетках каллуса на среде с колхицином.

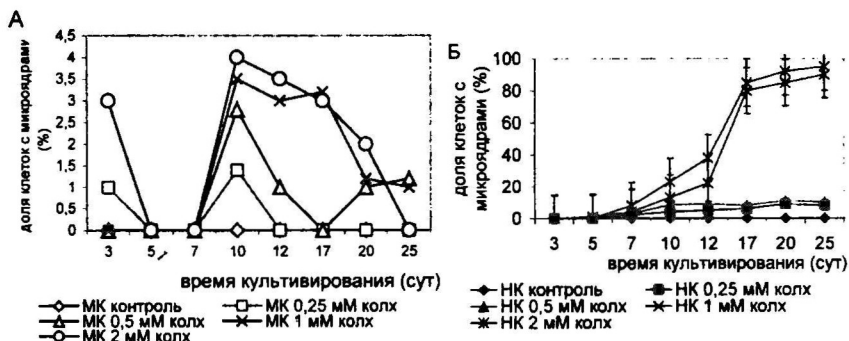


Рис. 7. Образование микроядер в клетках морфогенного (А) и неморфогенного (Б) каллусов на среде с колхицином.

Таким образом, клетки неморфогенного каллуса на среде с колхицином достигли значительно более высокой степени полиплоидизации, чем морфогенные. Это свидетельствует о том, что клетки морфогенных каллусов проходили на среде с колхицином 1-2 аномальных митоза, после чего прекращали деление, тогда как клетки неморфогенных каллусов продолжали в этих условиях активно делиться. Показано, что неспособность клеток животных останавливать митоз в ответ на нарушение клеточного цикла является следствием повреждения механизмов контроля клеточного цикла (Туровец и др., 2000; Trielli et al., 1996). Причём, такая особенность характерна для опухолевых клеток. Таким образом, можно предположить, что клетки неморфогенного каллуса, в отличие от клеток морфогенного, обладают нарушенным механизмом контроля клеточного цикла и генетической стабильности клетки.

3. Постэффекты колхицина на морфологию, генетику и морфогенную способность каллусов

3.1. Постэффект длительного воздействия колхицина на морфологические и цитогенетические признаки каллусов

После культивирования на среде с колхицином и перемещения на обычную среду морфогенные каллусы гречихи возобновили свой рост в виде отдельных клонов. Каллусы, подвергавшиеся воздействию колхицина в течение 30-90 суток, в последующих пассажах

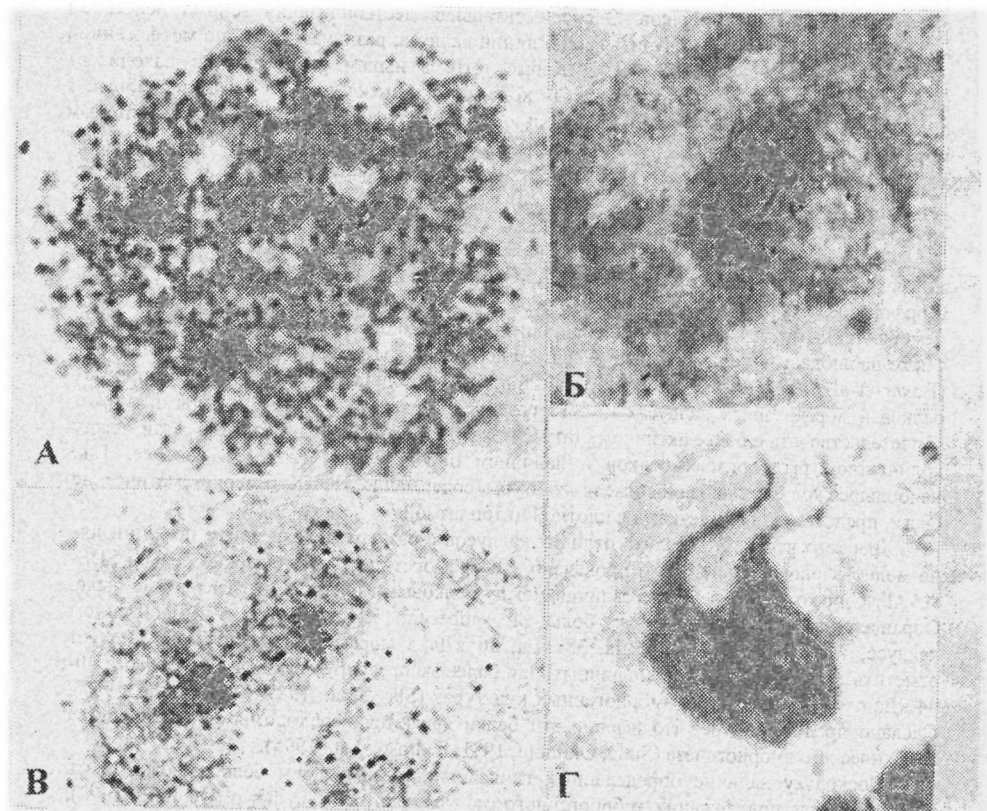


Рис. 8 Постэффект колхицина на клетки морфогенного каллуса *Fagopyrum tataricum*. А - фрагментация хромосом (Ув. 1250X), Б - отставание хромосомы (Ув. 500X), В - образование фрагментов хромосом (Ув. 500X), Г - диминуция хроматина (Ув. 1250X).

калусных линий - К-3 сохранилась способность к гистогенезу - на безгормональной среде в этом каллусе появляются трахейные элементы.

Таким образом, в результате культивирования на среде с колхицином морфогенные каллусы гречихи татарской утратили способность к эмбриоидогенезу и геммогенезу, а способность к ризогенезу и гистогенезу у них сохранилась.

Поскольку колхицин вызвал высокую степень генетической нестабильности в каллусах, то можно было предполагать, что линии каллусов, полученных под действием этого ингибитора гетерогенны по признаку экспрессии генов, а, следовательно, и по спектру синтезируемых белков. Экспериментальная дестабилизация генома действием колхицина позволила нам получить серию линий каллуса, различающихся по морфогенной способности: NS, К-45-3, LS, НК-2. Кроме того, в нашем распоряжении находилась каллусная линия 14, образовавшаяся в ходе селекции клеток *in vitro*, способная к образованию аномальных почек. Мы использовали несколько линий каллусов с различным морфогенным потенциалом: МК (способный к орган- и эмбриоидогенезу), NS (способный к ризогенезу), 14 (способный к образованию почек и трахеид), К-45-3 и LS (рыхлые культуры, способные к образованию трахеид), ряд неморфогенных каллусов (НК, К-2, CR4, NC-65), представленных только паренхимными клетками.

Спектрофотометрический анализ содержания белков показал, что каллусы с разным морфогенным потенциалом отличаются по содержанию растворимых белков (Табл.3). Морфогенные каллусы содержат большее количество белков, по сравнению с неморфогенными, и каллусами, сохранившими способность к образованию трахеид, что также наблюдали в каллусах риса (Chen, Luthe, 1987), кофе (Yuffa et al., 1994), цикория (Boyer et al., 1993) и пшеницы (Rajyalakshmi, 1991). Бóльшее содержание растворимых белков в морфогенных каллусах (в 5-10 раз), по сравнению с неморфогенными, может свидетельствовать о более активном статусе морфогенного каллуса, а также о связи между количеством растворимых белков и наличием определённых тканей в каллусе. Так, наибольшее количество белков имели культуры, содержащие ПЭКК, и меристематические очаги, представленные клетками с плотной цитоплазмой.

Для того чтобы определить отличия каллусов с разным морфогенным потенциалом на молекулярном уровне, было проведено электрофоретическое разделение белков SDS-ПААГ. Однако существенных различий между белковыми спектрами выявлено не было. Обращает на себя внимание факт бóльшей экспрессии белка 71 кДа в эмбрионном каллусе, 74 кДа, 55 кДа, 40 кДа, 38 кДа, 36 кДа в морфогенных каллусах. Следует отметить, что присутствие специфичных, или более экспрессируемых белков в области 40-44 кДа отмечалось ранее в эмбрионных культурах (Slay et al., 1989; Chen, Luthe, 1987). Сделано предположение, что именно эти белки являются необходимыми для процесса соматического эмбриогенеза (Sung, Okimoto, 1981; Pedrosa et al., 1995).

Поскольку наличие определенных гликозилированных форм белков может быть критичным для поддержания эмбрионного статуса каллусных культур (De Jong, 1992), мы решили сравнить спектры гликозилированных форм белков каллусов, обладающих разным морфогенным потенциалом. Проведенные исследования показали, что неморфогенные каллусы содержат незначительное количество гликозилированных белков, тогда как большая часть белков морфогенных каллусов (в особенности эмбрионного) гликозилирована. Кроме того, наши исследования выявили, что каллусы с наибольшим морфогенным потенциалом имеют наиболее богатый спектр гликозилированных белков, причем, если все морфогенные каллусы имеют общие гликозилированные формы в области 30-32 кДа, то эмбрионный каллус имеет дополнительные гликозилированные белки в области 34 кДа и 20-22 кДа (Рис. 9).

Наиболее интересным нам представляется факт специфической экспрессии гликозилированного белка 34 кДа в эмбрионном каллусе. По молекулярной массе этот

белок близок к хитиназе, специфическая экспрессия которой показана в ходе соматического эмбриогенеза (De Jong, 1992).

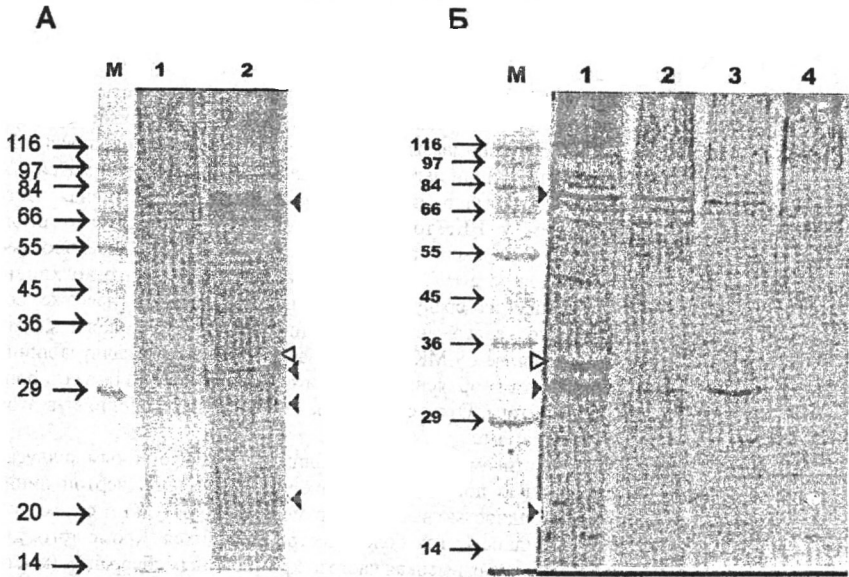


Рис. 9. Спектр гликозилированных белков каллусов с разной морфогенной способностью. А: 1 - неморфогенный каллус, 2 - эмбриогенный каллус. Б: 1 - Эмбриогенный каллус, 2 - каллус, способный к геммогенезу, 3 - ризогенный каллус (линия NS), 4 - неморфогенный каллус (линия CR4). > - эмбриоспецифические белки, < - белки, характерные для морфогенных каллусов.

4. Получение колхицин-резистентной линии каллуса *F. tataricum* и её характеристика

4.1. Получение линии каллуса, устойчивого к ингибитору

Поскольку в качестве одного из постэффектов колхицина на культуры *F. tataricum* мы наблюдали значительное увеличение в них морфологической и генетической нестабильности, мы предположили, что нестабильность затрагивает не только геномный и хромосомный, но и генный уровень. В этом случае представлялось возможным использовать предполагаемый высокий фон мутаций для получения резистентной к колхицину линии каллуса. Мы поместили морфологически и генетически нестабильный (образующий в каждом пассаже клоны рыхлого каллуса) каллус линии NS, полученный действием колхицина на МК (0,25 mM, 65 суток), на среду с тем же ингибитором (1 mM). Более высокая концентрация колхицина была использована с целью увеличить давление селекционирующего фактора на клетки. После 30 суток культивирования, на каллусе линии NS

образовался клон рыхлого каллуса, способный к росту на среде с 1 мМ колхицина. При этом сам глобулярный каллус линии NS, а также все клоны рыхлого каллуса, предсуществовавшие на нём до пересадки на среду с колхицином, погибли. Каллус резистентный к колхицину был обозначен CR4.

4.2. Свойства колхицин-резистентного каллуса линии CR4

По морфологии колхицин-резистентный каллус был сходен с рыхлым неморфогенным каллусом гречихи, не способным к росту на среде с колхицином. Также как и НК, каллус линии CR4 состоял из крупных вакуолизированных клеток паренхимного типа.

Проведённые нами исследования показали, что CR4 отличается по ряду параметров культурального цикла от МК и НК гречихи татарской. Так, продолжительность пассажа у CR4 составлял всего 10-12 суток, тогда как для НК была характерна продолжительность пассажа 18-20 суток. Причём прирост биомассы CR4 за его пассаж (12 суток) превышал таковой у НК за характерный для этой линии пассаж (18 суток) на 20%. При этом максимум митотического индекса у НК и CR4 был одинаков. Поскольку, пролиферативная часть пассажа у CR4 была короче, чем у НК, то можно было предположить, что столь значительный прирост массы у CR4 был обусловлен меньшей продолжительностью клеточного цикла у CR4, по сравнению с НК. Интересно также отметить, что колхицин-резистентный каллус при пересадке на среду без колхицина на первом пассаже рос значительно хуже, чем на среде, содержащей колхицин. Если предположить, что микротрубочки CR4 более стабильны, чем у МК и НК, то замедленный рост каллуса линии CR4 на среде без колхицина может объясняться сдвигом динамики МТ в сторону полимеризации на среде без ингибитора. Отсутствие в среде колхицина выполняет в этом случае роль МТ-стабилизирующего агента.

По цитогенетическим характеристикам CR4 оказался ближе к неморфогенным каллусам и представляет собой миксоплоидную популяцию клеток. Отличительной чертой линии CR4 является отсутствие клеток пloidностью выше 5n. Возможно, это результат селекции в пользу клеток низких уровней ploидности, как более быстро делящихся. Кроме того, для каллуса линии CR4 была характерна очень высокая частота хромосомных aberrаций (мосты и фрагменты хромосом), достигавшая в период с 1 по 20 пассаж 80%, а с в последующие пассажи 35-40 %. Для сравнения: у НК частота aberrаций составляла 5-10%, у МК - 1-2 %, а у каллуса линии NS, из которого CR4 был отселектирован, 5-8%. К морфогенезу каллус CR4 оказался не способен: на среде регенерации он, также как и НК, погибает.

По полисахаридному составу клеточной стенки CR4 несколько отличался от сходного с ним по морфологии НК. При этом, отличия по пектинам и гемипеллозам носили количественный характер: в клеточной стенке CR4 их было значительно меньше, чем у НК.

Нередко устойчивость к различным агентам, в том числе антимитотическим, обеспечивается путём экстра- или интрахромосомной амплификации генов, придающих клеткам свойство резистентности (Хесин, 1984; Fojo et al., 1985; Gros et al., 1986; Roninson et al., 1986). Наши исследования показали, что в клетках колхицин-устойчивого каллуса не содержится миникольцевых фрагментов ДНК или более крупных экстрахромосомных включений (гетерохроматиновых глыбок или фрагментов хромосом). Характерных для колхицин-устойчивых линий клеток (Копнин, Гудков, 1982). Еще одним подтверждением того, что устойчивость к колхицину каллуса CR4 не связана с экстрахромосомной амплификацией генов, является тот факт, что CR4 не теряет свойства резистентности к колхицину после длительного (более 20 пассажей) культивирования этого каллуса на среде без колхицина. Таким образом, если в колхицин-резистентном каллусе гречихи и имеет место амплификация "генов устойчивости", то она происходит интрахромосомно. Косвенным свидетельством возможности такой амплификации является высокий процент хромосомных aberrаций в клетках линии CR4: как известно, повторяющиеся

последовательности ДНК в хромосоме часто оказываются вовлечёнными в кроссинговер между сестринскими хроматидами, что приводит к дестабилизации генома (Хесин, 1984).

Устойчивость к ингибиторам цитоскелета может обеспечиваться следующими механизмами:

1. Путём понижения проницаемости мембраны (Хесин, 1984);
2. Синтезом ферментов, инактивирующих молекулу ингибитора (Хесин, 1984);
3. Сверхсинтезом ингибируемого компонента;
4. Путём синтеза изоформ тубулина с низким сродством к ингибитору, или придающих микротрубочкам свойства повышенной стабильности (Schibler, Huang, 1991; Baird et al., 1997).
5. Высокоэффективными MAP (Microtubule associated proteins) (Billger, et al., 1991) и посттрансляционной обработкой тубулина.
6. Путём синтеза белков, удаляющих ингибитор из клеток (Borkird, Renee Sung, 1991; Johnstone et al., 2000; Juliano, Ling, 1976; Kartner et al., 1983).

Наши исследования показали, что на среде с колхицином чувствительный к колхицину неморфогенный каллус и колхицин-резистентный каллус не отличались друг от друга ни по величине мембранной проницаемости для K^+ , ни по её динамике в ходе пассажа. Показано, что в плазматической мембране локализуются элементы тубулинового цитоскелета (Isenberg, Niggli, 1998). Эти элементы участвуют в организации специфических доменов плазматической мембраны (Isenberg, Niggli, 1998). Антитубулиновые агенты приводят к удалению тубулина из мембранной фракции (Laporte et al., 1993). Колхицин также может изменять текучесть мембран и влиять на подвижность мембранных компонентов (Wunderlich, Muller, 1973). Таким образом, увеличение проницаемости мембраны клеток для ионов калия может объясняться нарушением структуры мембраны из-за удаления из неё тубулиновых компонентов. Для проверки 2-й, 5-й и 6-й возможностей мы провели исследование фракции растворимых белков каллусов линий НК и CR4. SDS-PAGE не выявил у этих каллусов различий между спектрами синтезируемых растворимых белков. Для проверки 3-й и 4-й возможностей мы провели блот-гибридизацию растворимых белков каллуса с антителами против α -тубулина. При этом мы наблюдали одинаковое мечение тубулина НК и CR4.

Таким образом, наши биохимические данные позволяют заключить, что устойчивость каллуса линии CR4 к колхицину не связана со сверхсинтезом тубулина. Мы также не наблюдали перекрёстной устойчивости каллуса линии CR4 к оризалину. На среде с оризалином в клетках CR4 наблюдалось образование микроядер. Мы также не обнаружили никаких специфичных для CR4 белков, по крайней мере, во фракции растворимых белков. Наиболее вероятной причиной устойчивости может быть сверхэкспрессия белков плазматической мембраны, обеспечивающих её непроницаемость для колхицина.

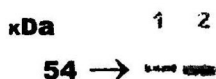


Рис. 10. Иммуноблоттинг с антителами к α -тубулину растворимых белков колхицин-резистентного (1) и чувствительного к колхицину (2) каллусов.

Заключение

Таким образом, проведённые нами исследования показали, что колхицин при длительном действии оказывает сильное дестабилизирующее влияние на геном, и генетическая нестабильность, индуцированная колхицином, проявляется в последующих после обработки колхицином пассажах каллуса. Вызываемая действием колхицина дестабилизация генома делает этот антитубулиновый агент эффективным инструментом для индуцирования мутаций, но может ограничить его применение для получения полиплоидов. Как было показано (Марьяхина и др., 1990), вегетативное потомство полиплоидных форм чеснока, полученных в результате обработки колхицином, отличались высокой частотой вариабельности признаков и аномалиями кариотипа.

Кроме того, наши исследования показали, что морфогенные и неморфогенные каллусы *F. tataricum* сильно отличаются по чувствительности к колхицину. При обсуждении причин разной чувствительности этих каллусов к колхицину, необходимо учесть различную природу этих каллусов. Рыхлый неморфогенный каллус гречихи принципиально отличается по свойствам клеток как от эмбрионного каллуса, так и от каллусов плотной консистенции с редуцированным морфогенным потенциалом. Клетки последних способны к дифференцировке и гистогенезу - образованию элементов проводящей ткани (трахеид), а иногда и к органогенезу. Клетки же неморфогенного каллуса гречихи по ряду признаков подобны клеткам опухолей животных. К числу таких признаков относятся неспособность клеток к дифференцировке, слабые межклеточные контакты, высокая пролиферативная активность. Важно отметить также и то, что раковые клетки гораздо менее устойчивы ко всем агентам, затрагивающим клеточный цикл, по сравнению с нормальными клетками, что определяется их высокой пролиферативной активностью. Нормальные клетки при нарушении хода клеточного цикла останавливаются на G₀/G₁-фазе и в дальнейшем, если повреждения серьёзные, не вступают в деление (Trielli et al., 1996; Новиков, 1996; Туровец и др., 2000). Трансформированные клетки, в отличие от нормальных клеток, не блокируются на стадии G₁ и продолжают деление. В результате, они накапливают мутации и нарушения метаболизма, что в конечном итоге приводит к их гибели. Неморфогенный каллус *Fagopyrum tataricum* проявил в нашей работе значительно меньшую устойчивость к колхицину - агенту серьёзно нарушающему клеточный цикл, по сравнению с морфогенным каллусом. При этом на среде с колхицином в морфогенном каллусе пролиферация клеток после короткого периода активации подавлялась. Неморфогенный каллус в этих условиях продолжал делиться.

Полученные нами данные позволяют предположить, что клетки морфогенного каллуса, в отличие от клеток неморфогенного, обладают ненарушенным механизмом контроля генетической стабильности клетки, и способны прекращать деление при повреждении. У НК даже клетки с явно несбалансированным геномом (высокополиплоидные клетки) продолжают делиться, тогда как у МК высокополиплоидные клетки если и образуются, то в деление больше не вступают. В дальнейшем они, видимо, погибают, возможно, по механизму апоптоза, так как мы наблюдали цитологические картины очень сходные с таковыми, описанными при программной клеточной смерти. Полученные нами данные свидетельствуют о различиях в эффектах колхицина на морфогенный и неморфогенный каллусы гречихи, аналогичных описанным для реакции нормальных и раковых клеток животных на повреждающее действие химических препаратов (Trielli et al., 1996; Новиков, 1996; Туровец и др., 2000). Таким образом, неморфогенный каллус может рассматриваться как совокупность клеток, у которых нарушены механизмы контролирующего деление, способность к дифференцировке и генетическую стабильность. Именно эти механизмы нарушены у раковых клеток животных.

Хорошо известно, что колхицин обладает канцерогенным действием на клетки животных. Он вызывает трансформацию клетки и превращение её в опухолевую.

Конкретный механизм этого явления до конца не ясен, однако есть свидетельства, что клетки опухолей имеют отличия в строении цитоскелета (в особенности цитоскелета ядра), по сравнению с нормальными клетками. Более того, вещества, способные вызвать реверсии раковых клеток к норме, не оказывают такого эффекта при ингибировании полимеризации микротрубочек колхицином (Puck, Krystoshek, 1992). Таким образом, для сохранения нормального статуса клетки необходима определённая организация цитоскелета (по-видимому, наиболее важна правильная организация хроматина, в установлении которой участвуют микротрубочки). Действие колхицина значительно повысило частоту образования клонов рыхлого каллуса - такие клоны образовывались в каждом последующем пассаже на обычной среде на протяжении 40-45 пассажей. Таким образом, учитывая аналогию неморфогенных каллусов гречихи татарской с клетками опухолей животных, можно полагать, что колхицин оказывает на каллусные культуры эффект, сходный с его канцерогенным действием на клетки животных.

ВЫВОДЫ

1. Длительное воздействие колхицина приводит к существенным изменениям морфологии морфогенного каллуса *F.tataricum*: разрыхлению его структуры и исчезновению проэмбриональных клеточных комплексов. На клеточном уровне эти изменения сопровождаются вакуолизацией клеток, потерей межклеточных контактов и гибелью части клеток с признаками, характерными для программируемой клеточной смерти.
2. Впервые показано, что длительное культивирование на среде с колхицином вызывает значительное изменение полисахаридного состава клеточных стенок морфогенных каллусов: уменьшение количества пектинов и увеличение количества гемицеллюлоз.
3. Обработка колхицином приводит к нарушению генетической стабильности морфогенного каллуса, индуцируя в нем геномные и хромосомные aberrации. В колхицин-обработанных каллусах значительно увеличивается частота появления рыхлых неморфогенных клонов (4-5 клонов на пассаж, в то время как в контроле она составляет 1 клон на 30-40 пассажей). Эта генетическая и морфологическая нестабильность сохраняется в течение многих пассажей на среде без колхицина.
4. В результате экспериментальной дестабилизации генома морфогенного каллуса получена рыхлая колхицин-резистентная линия, отличающаяся от чувствительных к колхицину каллусов более коротким циклом культивирования и высокой частотой хромосомных aberrаций. Устойчивость каллуса к колхицину не связана с экстрахромосомной амплификацией генов.
5. Все клоны морфогенного каллуса, отобранные после воздействия колхицином, проявляют меньшую морфогенную активность по сравнению с контролем. Установлено, что неморфогенные и частично морфогенные клоны (способные к проявлению отдельных форм морфогенеза) содержат меньше растворимых белков по сравнению с морфогенным каллусом. Впервые показано, что в отличие от растворимых белков неморфогенного каллуса большинство белков морфогенных и частично морфогенных каллусов гликозилировано. Каллусы с наибольшим морфогенным потенциалом имеют наиболее богатый спектр гликозилированных белков.
6. Впервые обнаружено, что неморфогенные каллусы менее устойчивы к колхицину, по сравнению с морфогенными, из-за их неспособности останавливать последующее деление клеток в ответ на нарушение митоза и возникновение аномалий кариотипа (поли- и анеуплоидизация клеток).
7. Неморфогенные каллусы гречихи татарской, по ряду признаков (генетическая нестабильность, высокая пролиферативная активность, неспособность клеток к дифференцировке, слабые межклеточные контакты, повышенная чувствительность к колхицину) аналогичны клеткам опухолей животных. Колхицин вызывает значительное увеличение частоты возникновения клонов неморфогенного каллуса и, таким образом,

оказывает на морфогенные каллусы гречихи действие сходное с канцерогенным действием этого ингибитора на клетки животных.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Румянцева Н.И., Валиева А.И., Мухитов А.Р., Лукина Ю.А., Лозовая В.В. Влияние колхицина на полисахаридный состав клеточных стенок каллусов с разной морфогенной способностью // Тез. докл. II съезда Биохимического общества.- Москва, 1997, ч.П.- С.529-531.
2. Валиева А.И., Мухитов А.Р., Румянцева Н.И. Особенности роста и динамика полисахаридного состава клеточных стенок морфогенного каллуса татарской гречихи // Тез. докл. VI Молодежн. конф. ботаников.- С.-Петербург, 1997. С.45-46.
3. Rummyantseva N., Valieva A., Mukhitov A., Lukina Yu., Lozovaya V. The influence of colchicine on cell wall composition of calli with different morphogenic ability Abstr. of Symp. Molecular Biology for agriculture.- Ceske Budejovice, 1997.- P.93.
4. Мухитов А.Р., Румянцева Н.И. Влияние колхицина на цитогенетическую стабильность каллусов гречихи *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. // Тезисы II(X) Делегатского съезда Русского ботанического общества "Проблемы ботаники на рубеже XX-XXI веков" С.-Петербург. 1998, с. 126.
5. Mukhitov A., Rummyantseva N. The influence of colchicine on mitotic dynamics in calli of *Fagopyrum tataricum*(L.) Gaertn. having different morphogenic ability // Abstr. 2-nd Int. Symp. on Plant Biotechnology Kiev, 1998 P.91.
6. N. Rummyantseva, Yu. Lukina, A. Mukhitov. Identification of embryogenic callus types for long-term maintenance and regeneration from *Fagopyrum* species // Abstr. Int. 2-nd Conference on Progress in Plant Science from Plant Breeding to Growth Regulation .1998. Mosonmagyaróvár, Hungary, P.78.
7. Румянцева Н. И., Валиева А.И., Самохвалова 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. - N 10. - с. 835 - 842.
8. Rummyantseva N.I., Valieva A.I., Mukhitov A.R. The effect of colchicine on morphogenic and non-morphogenic calli of buckwheat // Cell Biology International. - 1998. - V. 21. - N 12. - p. 891 - 892.
9. Valieva A.I., Rummyantseva N.I., Mukhitov A.R. Alterations in cell wall polysaccharide composition of buckwheat calli with different morphogenic ability // Proc. VII Int. Symp. on Buckwheat.- Winnipeg, Canada, 1998. Section V. P.83-87.
10. Лукина Ю.А., Мухитов А.Р., Румянцева Н.И. Гистологические и цитогенетические особенности каллусных культур двух видов гречихи // Тез. III Респ. Научная конф. Молодых учёных и специалистов. Казань 1998, с. 29-30.
11. Rummyantseva N.I., Valieva A.I., Mukhitov A.R. The influence of colchicine on cell wall composition of buckwheat calli having different morphogenic ability // Proc. VII Int. Symp. on Buckwheat.- Winnipeg, Canada, 12-14 Aug.1998. Section V. P.88-96.
12. Лукина (Костюкова) Ю.А., Мухитов А.Р., Шишкина Ю.М., Румянцева Н.И. Морфологические и цитогенетические особенности длительно культивируемых каллусов *Fagopyrum esculentum* (Moench.) // Тез. VI съезда Общества физиологов растений России (Москва, ИФР РАН), 1999, С.622.
13. Мухитов А. Р., Румянцева Н. И. Индуцированная колхицином генетическая и морфологическая нестабильность каллусных культур *Fagopyrum tataricum* // Тезисы VII Молодёжной конференции ботаников. - С.-Петербург, 2000. - С. 138.
14. Mukhitov A. R., Gogolev Yu. V., Minibayeva F. V., N. I. Rummyantseva N. I. Establishment and characterization of colchicine-resistant callus of *Fagopyrum tataricum* // Abstr. XII FESPP Congress 2000, P. 30.
15. Мухитов А. Р., Румянцева Н. И. Индукция колхицином морфологической и

генетической нестабильности каллусов *Fagopyrum tataricum* // Цитология. 2000, в печати.

16. Мухитов А. Р., Румянцева Н. И. Высокомутабельная система, полученная длительным действием колхицина на каллусные культуры *Fagopyrum tataricum* // Тезисы докл. Всероссийского симпозиума "Клеточная биология на пороге XXI века", С.-Иб. 17-19 октября 2000 г., Цитология, 2000, в печати.
17. Мухитов А. Р., Гоголев Ю. В., Румянцева Н. И. Особенности колхицин-резистентного каллуса гречихи татарской (*Fagopyrum tataricum*) // Тез. Конференции "Горизонты физико-химической биологии", Пушино, 2000, Т. 2, с. 128-129.



200

Подписано в печать 21.11.2000. Формат 60/84/16.
Усл. печ. л. 1,5. Договор № 32. Тираж 100.

Лаборатория оперативной печати ТТГИ.
420036, г. Казань, ул. Побежимова 47а, тел. 544373