

А. Ш. УТАРБАЕВА, О. В. ЧЕБОНЕНКО, А. К. ТУРСУНОВА,  
А. Ж. АМИРКУЛОВА, А. О. АБАЙЛДАЕВ, Н. П. МАЛАХОВА, А. ХАСЕЙН

(РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина» КН МОН РК,  
Алматы, Казахстан. E-mail: a.utar@mail.ru)

## ПРО- И АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO* КЛЕТОК КАРТОФЕЛЯ ПРИ СЕЛЕКЦИИ НА СОЛЕ- И ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТЬ

**Аннотация.** Проведен сравнительный анализ уровня прооксидантов (содержание перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) и перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активности антиоксидантных ферментов (АОФ): супероксиддисмутазы (СОД), аскорбатпероксидазы (АПО), каталазы (КАТ) и пероксидазы (ПО) в суспензионных клетках картофеля сорта Аксор при селекции на соле- (0,1М NaCl) и засухоустойчивость (0,15М маннитол). На начальном этапе селекции в клетках уровень прооксидантов был выше в 1,5-2 раза, чем в контроле на средах с маннитолом. Засоление вызывало незначительное на 30-40% усиление ПОЛ. Наблюдали активацию КАТ и СОД при засолении и ингибирование – при осмотическом стрессе. Активность АПО и ПО усиливалась на средах с маннитолом и снижалась на средах с NaCl. СОД и КАТ активировались на (50-60% больше контроля) на конечном этапе селекции в засухоустойчивых клетках. Наибольший отклик наблюдали для связанной формы ПО, активность которой в 2-3 раза превышала контроль. Содержание  $H_2O_2$  и ПОЛ практически не превышало контрольного уровня, что свидетельствует об эффективной работе антиоксидантной системы защиты устойчивых к данным стрессам клеток. Таким образом, суспензионные клетки картофеля сорта Аксор показали достаточно высокий потенциал для селекции на соле- и засухоустойчивость. Активация СОД, КАТ и связанных с клеточной стенкой форм ПО участвует в утилизации активных форм кислорода (АФК), снимает негативное влияние окислительного стресса и прямо коррелирует с соле- и засухоустойчивостью суспензионных клеток картофеля.

**Ключевые слова:** картофель, суспензионные клетки, антиоксидантные ферменты, прооксиданты, селекция, солеустойчивость, засухоустойчивость.

**Тірек сөздер:** картоп, суспензионды жасушалар, антиоксидантты ферменттер, прооксиданттар, іріктеу, тұзға төзімділік, құрғақшылыққа төзімділік.

**Keywords:** potato, suspension cells, selection, antioxidant enzymes, prooxidants, salinity resistance, drought resistance.

В настоящее время установлено, что одним из общих стрессорных ответов растений на действие повреждающих абиотических факторов различной природы, включая засоление и засуху, является усиление генерации активных форм кислорода (АФК) и развитие окислительного стресса.

Важную роль в защите клеток и тканей от чрезмерных окислительных повреждений и поддержания нормального редокс-баланса играют системы естественной детоксикации, в том числе специализированные ферментные антиоксиданты: СОД, КАТ, группа ПО, ферменты аскорбат-глутатионового цикла: АПО, дегидроаскорбат-редуктаза (ДАР), глутатион-редуктаза (ГР) [1, 2]. В научной литературе имеется много фактических данных об участии ферментов-антиоксидантов, экспрессии их генов в обезвреживании различных АФК, образующихся при абиотических стрессах. Большинство исследований показывает прямую корреляцию устойчивости к данным стрессовым факторам с усилением активности ферментов – антиоксидантов, и как следствие уменьшением проявлений окислительного стресса [3, 4]. Однако не всегда основные антиоксидантные ферменты реагируют на стрессы, вызванные засолением и засухой увеличением активности. Имеются данные, что при действии высоких концентраций NaCl и в солеустойчивых и чувствительных *in vitro* линиях картофеля наблюдалось снижение активности СОД, АПО, ГР, а активность КАТ не менялась [5].

Литературные данные показывают, что про- и антиоксидантные системы могут выступать маркерами устойчивости или чувствительности растений к абиотическим стрессам, включая засоление и засуху. Удобной моделью для исследования биохимических аспектов участия про- и антиоксидантов в механизмах устойчивости и селекции на соле- и засухоустойчивость могут служить культивируемые *in vitro* клетки и растения-регенеранты.

В связи с этим были исследованы изменения прооксидантного статуса (генерация  $H_2O_2$  и ПОЛ) и активности ключевых АОФ при селекции суспензионных клеток картофеля сорта Аксор на соле- и засухоустойчивость.

### Материалы и методы

Объектом исследований служили суспензионные клетки картофеля сорта Аксор. Для проведения клеточной селекции на засухо- и солеустойчивость в суспензионной культуре картофеля использовали селективные агенты маннитол в концентрации 0,15М, и NaCl в концентрации 0,1М, которые добавляли в жидкую питательную среду. Клеточную селекцию проводили способом прямой селекции, при которой выживает лишь определенный искомый мутантный тип клеток. Селекцию осуществляли по классической ступенчатой схеме: культивирование клеток в неселективных условиях (14 суток); культивирование клеток в селективных условиях (2 субкультивирования с периодом 7 суток); перенос клеток в неселективные условия (14 суток); перенос клеток в селективные условия (2 субкультивирования по 7 суток).

Содержание  $H_2O_2$  определяли с использованием ксиленолового оранжевого согласно Gay [6].

Интенсивность ПОЛ анализировали по накоплению в клетках малонового диальдегида (МДА), определяемого по цветной реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [7].

Активность КАТ определяли спектрофотометрически по распаду  $H_2O_2$  при 240 нм в  $Na^+$ -фосфатном буфере (рН 6,5). Реакционная смесь содержала 2мл 0,1М  $Na^+$ -фосфатного буфера (рН 6,5), 100 мкл  $H_2O_2$  (финальная концентрация 12,5 мМ), 50 мкл растительного экстракта. Коэффициент экстинкции  $H_2O_2$  при 240 нм  $0,040 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$  [8].

Активность АПО определяли спектрофотометрически по разложению аскорбиновой кислоты при 290 нм в Трис-НСI буфере (рН 7,8). Реакционная смесь содержала 2 мл 0,2 М Трис-НСI буфере (рН 7,8), 100 мкл 5,6 мМ аскорбиновой кислоты, 100 мкл 11,25 мМ  $H_2O_2$ , 100 мкл растительного экстракта. Коэффициент экстинкции аскорбиновой кислоты при 290 нм  $2,8 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$  [9].

Суммарную активность СОД определяли в реакции конкурентного восстановления тетразолия нитросинего [10] с модификациями.

Активность ПО отмечали по начальной скорости окисления о-дианизидина при комнатной температуре при 460 нм. Скорость реакции определяли по тангенсу угла наклона начальных участков кинетических прямых изменения оптической плотности во времени [11].

Количество белка измеряли по микробиуретовому методу [12].

Опыты проводились в 3-4-х кратной повторности. Все результаты были подвергнуты стандартной статистической обработке.

### Результаты и их обсуждение

Анализ прооксидантов показал, что в суспензионных клетках на начальных этапах селекции на засухоустойчивость (через 2 недели культивирования на 0,15М маннитол) уровень  $H_2O_2$  был в 2 раза выше в селективных клетках по сравнению с контролем. На конечном этапе селекции суспензионных культур (через 4 недели) уровень  $H_2O_2$  в засухоустойчивых вариантах лишь незначительно (на 10-15%) был выше контроля. Уровень ПОЛ изменялся аналогично содержанию  $H_2O_2$ . Также на первых этапах селекции в селективных линиях содержание ПОЛ в 1,7-2 раза было выше, чем в контроле. К концу селекционного процесса в устойчивых клетках незначительно (на 20-30%) содержание МДА было выше по сравнению с контрольными образцами (таблица 1). При селекции на солеустойчивость, генерация  $H_2O_2$  возрастала на протяжении этапов селекции. К концу опыта в устойчивых линиях, содержание АФК в 3 раза превышало контроль. Содержание ПОЛ как и в случае с засухоустойчивыми клетками было на уровне контроля на конечном этапе селекции (таблица 1).

Анализ активности АОФ показал, что ответная реакция цитоплазматических форм АОФ различается в процессе селекции. СОД, КАТ и связанные с клеточной стенкой ПО в начале селекции в опытных вариантах ингибируются, АПО и растворимые ПО активируются в 2 раза больше контроля. В конце селекции АОФ у устойчивых клеток уровень всех ферментов был выше контрольных. Наиболее выраженное увеличение активности наблюдали для связанных ПО (в 2 раза больше контроля) (таблица 2). Солеустойчивые клетки на начальном этапе селекции характеризовались повышенной активностью СО и КАТ (в 2 раза больше контроля), АПО и ПО ингибировались. На

Таблица 1 – Содержание прооксидантов в суспензионных клетках картофеля при селекции на соле- и засухоустойчивость

Этапы селекции	Содержание H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , мкМ/г сырого веса		Содержание МДА, мкМ/г сырого веса	
	контроль	опыт	контроль	опыт
0,15М маннитол				
Через 2 недели	5,3 ± 0,2	10,2 ± 0,3	0,65 ± 0,02	1,3 ± 0,02
Через 4 недели	9,3 ± 0,2	13,4 ± 0,3	1,0 ± 0,02	1,2 ± 0,02
0,1М NaCl				
Через 2 недели	9,3 ± 0,2	17,2 ± 0,3	1,2 ± 0,02	1,6 ± 0,02
Через 4 недели	7,0 ± 0,15	20,0 ± 0,4	2,0 ± 0,02	2,2 ± 0,02

Таблица 2 – Активность цитоплазматических форм АОФ суспензионных клеток картофеля при селекции на соле- и засухоустойчивость

Варианты	Активность АОФ				
	СОД, ед. акт./мг белка	КАТ, мкМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / (мг белка мин)	АПО, мкМ аскорбата / (мг белка мин)	ПО растворимые, (отн. ед./мг белка мин)	ПО связанные, (отн. ед./мг белка мин)
0,15М маннитол					
Контроль 2 недели	22,7 ± 3	15,8 ± 3	0,30 ± 0,01	26,6 ± 3,1	54,3 ± 4,2
Опыт 2 недели	13,3 ± 2	0,8 ± 0,2	0,60 ± 0,01	73,7 ± 4,6	28,3 ± 1,9
Контроль 4 недели	16,0 ± 2	2,6 ± 0,2	1,8 ± 0,1	70,0 ± 4,0	42,4 ± 3,0
Опыт 4 недели	24,4 ± 3	3,6 ± 0,2	2,4 ± 0,1	81,2 ± 4,7	87,0 ± 4,6
0,1М NaCl					
Контроль 2 недели	12,5 ± 2	11,6 ± 1,5	1,8 ± 0,01	56 ± 3,1	65,1 ± 4,2
Опыт 2 недели	22,6 ± 3	22,3 ± 3	0,7 ± 0,01	43,7 ± 2,6	32,5 ± 1,9
Контроль 4 недели	3,3 ± 0,3	2,8 ± 0,2	0,9 ± 0,01	22,6 ± 2,1	47 ± 2,8
Опыт 4 недели	3,6 ± 0,3	17,5 ± 2,5	1,2 ± 0,01	14,7 ± 1,6	38 ± 1,6

конечной стадии селекционного процесса наблюдали значительное активирование КАТ в 5 раз превышающее уровень контроля. Эти данные подтверждают предположение, что в солеустойчивых клетках активируется КАТ, один из основных ферментов утилизирующих H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и защищающих от негативных последствий окислительного стресса (таблица 2). Активность секретируемых форм АОФ оставались ниже контрольного уровня на всех этапах селекции на засухоустойчивость. Такое реагирование свидетельствует, что внутриклеточные и локализованные в клеточной стенке АОФ засухоустойчивых линий утилизируют избыточные количества АФК и поддерживают редокс-баланс на нормальном для клетки уровне. Солевой стресс вызывал секрецию некоторых АОФ в среду культивирования. Особенно активно секретировались КАТ и ПО, превышая контрольный уровень к концу селекции в 5 и 3 раза соответственно (таблица 3).

Таблица 3 – Активность секретируемых форм АОФ суспензионных клеток картофеля при селекции на соле- и засухоустойчивость

Варианты	Активность АОФ			
	СОД, ед. акт./мг белка	КАТ, мкМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / (мг белка мин)	АсПО, мкМ аскорбата / (мг белка мин)	ПО, (отн. ед./мг белка мин)
0,15М маннитол				
Контроль 2 недели	5,2 ± 0,5	0,56 ± 0,05	0,15 ± 0,01	50,6 ± 4,1
Опыт 2 недели	4,7 ± 0,5	0,08 ± 0,002	0,20 ± 0,01	32,7 ± 2,6
Контроль 4 недели	4,3 ± 0,5	0,22 ± 0,02	0,3 ± 0,01	12,8 ± 1,4
Опыт 4 недели	2,5 ± 0,3	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,01	10,3 ± 1,2
0,1М NaCl				
Контроль 2 недели	4,3 ± 0,5	0,2 ± 0,02	0,4 ± 0,02	41 ± 3,8
Опыт 2 недели	2,1 ± 0,1	0,5 ± 0,03	0,4 ± 0,02	83 ± 5,1
Контроль 4 недели	3,2 ± 0,1	0,1 ± 0,002	0,1 ± 0,002	12 ± 2,1
Опыт 4 недели	2,8 ± 0,1	0,6 ± 0,03	0,4 ± 0,02	37 ± 3,1

Таким образом, суспензионные клетки картофеля сорта Аксор показали достаточно высокий потенциал для селекции на соле- и засухоустойчивость. Активное участие в формировании устойчивости *in vitro* культуры к данным абиотическим стрессовым факторам принимает антиоксидантная система. Активация СОД, КАТ и связанных с клеточной стенкой форм ПО участвует в утилизации АФК, снимает негативное влияние окислительного стресса и прямо коррелирует с соле- и засухоустойчивостью суспензионных клеток картофеля.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends in Plant Science*. – 2002. – Vol. 7(9). – P. 405-410.
- 2 Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review // *Annals of Botany*. – 2003. – Vol. 91. – P. 179-194.
- 3 Aghaei K., Ehsanpour A.A., Komatsu S. Potato responds to salt stress by increased activity of antioxidant enzymes // *J. Integr. Plant Biol.* – 2009. – Vol. 51(12). – P. 1095-1103.
- 4 Rahnema H., Ebrahimzadeh H. The effect of NaCl on antioxidant enzyme activities in potato seedlings // *Biol. Plant.* – 2005. – Vol. 49. – P. 93-97.
- 5 Queirós F., Rodrigues J.A., Almeida J.M., Almeida Domingos P.F., Fidalgo F. Differential responses of the antioxidant defence system and ultrastructure in a salt-adapted potato cell line // *Plant Physiol Biochem.* – 2011. – Vol. 49(12). – P. 1410-1419.
- 6 Gay C., Collins J., Gebicki J. M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex // *Analytical Biochemistry*. – 1999. – Vol. 273. – P. 149-155.
- 7 Жиров В.К., Мерзляк М.Н., Кузнецов Л.В. Перекисное окисление мембранных липидов холодостойких растений при повреждении отрицательными температурами // *Физиология растений*. – 1982. – Т. 29. – С. 1045-1052.
- 8 Aebi H. Catalase in vitro // *Methods Enzymology*. – 1984. – Vol. 105. – P. 121-126.
- 9 Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // *Plant Cell Physiol.* – 1981. – Vol. 22. – P. 867-880.
- 10 Beauchamp C., Fridovich J. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels // *Anal. Biochem.* – 1971. – Vol. 44. – P. 276-287.
- 11 Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. Кинетическое изучение реакции окисления о-дианизидина H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в присутствии пероксидазы хрена // *Биохимия*. – 1977. – Т. 42. – С. 1372-1379.
- 12 Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М., 1971. – С. 309-310.

#### REFERENCES

- 1 Mittler R. *Trends in Plant Science*, **2002**, 7 (9), 405-410
- 2 Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. *Annals of Botany*, **2003**, 91, 179-194.
- 3 Aghaei K., Ehsanpour A.A., Komatsu S. *J. Integr. Plant Biol.*, **2009**, 51(12), 1095-1103.
- 4 Rahnema H. and Ebrahimzadeh H. *Biol. Plant*, **2005**, 49, P. 93-97.
- 5 Queirós F., Rodrigues J.A., Almeida J. M., Almeida Domingos P.F., Fidalgo F. *Plant Physiol Biochem.*, **2011**, 49 (12), 1410-1419.
- 6 Gay C., Collins J. and Gebicki J. M. *Analytical Biochemistry*, **1999**, 273, P. 149-155.
- 7 Zhiron V.K., Merzljak M.N., Kuznecov L.V. *Fiziologija rastenij*, **1982**, 29, 1045-1052 (in Russ.).
- 8 Aebi H. *Methods Enzymology*, **1984**, 105, 121-126.
- 9 Nakano Y., Asada K. *Plant Cell Physiol*, **1981**, 22, 867-880.
- 10 Beauchamp C., Fridovich J. *Anal. Biochem.*, **1971**, 44, 276-287.
- 11 Lebedeva O.V., Ugarova N.N., Berezin I.V. *Biohimija*, **1977**, 42, 1372-1379 (in Russ.).
- 12 Kochetov G.A. *M.*, **1971**, 309-310 (in Russ.).

#### Резюме

А. Ш. Отарбаева, О. В. Чебоненко, А. К. Тұрсынова, А. Ж. Әмірқұлова,  
А. О. Абайлдаев, Н. П. Малахова, А. Хасейн

(ҚР БҒМ ҒК «М. Ә. Айтқожин атындағы Молекулалық биология және биохимия институты»,  
Алматы, Қазақстан)

#### ТҰЗ- ЖӘНЕ ҚҰРҒАҚШЫЛЫҚҚА ТӨЗІМДІ *IN VITRO* ДАҚЫЛДАНҒАН КАРТОП ЖАСУШАЛАРЫНЫҢ ПРО- ЖӘНЕ АНТИОКСИДАНТТЫ СТАТУСЫ

Прооксиданттар (сутегі асқын тотығы (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) және липидтердің сутек асқын тотығуы (ПОЛ) деңгейі мен антиоксиданттық ферменттердің, яғни супероксиддисмутаза (СОД), аскорбатпероксидаза (АПО), каталаза (КАТ) және пероксидаза (ПО) белсенділігін тұзға (0,1М NaCl) және құрғақшылыққа төзімді (0,15М маннитол) іріктеуде картоптың Аксор сортының суспензия жасушаларында салыстырмалы талдау жасалынды.

Маннитол ортасындағы іріктеудің басты сатысында жасушаларда прооксидант деңгейі бақылаумен салыстырғанда 1,5-2 есе жоғары болды. Тұздың әсері липидтердің сутектік асқын тотығуын 30-40%-ға көбейтті. КАТ және СОД-тың белсендігін тұзда, ал осмотикалық стресте тежелгені байқады. Ал, АПО мен ПО белсенділігі маннитолы бар ортада күшейіп, NaCl ортада азайған. Іріктеудің соңғы сатысында құрғақшылыққа төзімді жасушалардың СОД пен КАТ белсенділігі (50-60% бақылаумен салыстырғанда) артты. Ең үлкен белсенділік ПО-ның байланысқан формасы, бақылаумен салыстырғанда 2-3 есе жоғары болды. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> мен липидтердің сутек асқын тотығу мөлшері бақылау деңгейінен асқан жоқ, бұл жасушалардың осы стрестерге төзімді антиоксиданттық жүйесінің қорғаныс жұмысы. Осыдан, картоптың Аксор сортының суспензионды жасушалары тұз және құрғақшылыққа төзімді селекциясында жоғары әлеует көрсетті. СОД, КАТ және ПО-ның жасуша қабығымен байланысқан формасының белсенділігі картоптың суспензионды жасушаларының тұз және құрғақшылыққа төзімділігіне тура қатысты болып, оттегінің белсенді формаларын пайдаға асырады және тотықтандырғыш стрестің кері әсерін бәсеңдетеді.

**Тірек сөздер:** картоп, суспензионды жасушалар, антиоксидантты ферменттер, прооксиданттар, іріктеу, тұзға төзімділік, құрғақшылыққа төзімділік.

### Summary

*A. Sh. Utarbayeva, O. V. Chebonenko, A. K. Tursunova,  
A. Zh. Amirkulova, A. O. Abayldaev, N. P. Malakhova, A. Khassein*

(M. A. Aitkhozhin institute of molecular biology and biochemistry CS MES RK, Almaty, Kazakhstan)

#### PRO- AND ANTIOXIDANT STATUS OF *IN VITRO* CULTIVATED POTATO CELLS UNDER SELECTION WITH SALINITY AND DROUGHT TOLERANCE

There was a comparative analysis of level of prooxidants (containing of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes (AOE): superoxiddismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and peroxidase (POD) in suspension cells of potato line Aksor under selective conditions – salinity (0,1M NaCl) and drought resistance (0,15M mannitol). At the first stage of selection level of prooxidants in cells was in 1,5-2 times higher than in control after cultivation in medium with mannitol. The salinity increased activity of LPO in 30-40%. Activity of CAT and SOD increased under salinity and decreased under osmotic stress. Activity of APX and POD increased on a medium contains mannitol and decreased on a medium with NaCl. SOD and CAT activated in the drought resistant cells at the last stage of selection. The most responsive was cell wall bounded POD with form – its activity in a 2-3 times higher than control. Content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and lipid peroxidation wasn't higher than control level which means that antioxidant system works effectively in the stress tolerant cells. Therefore suspended potato cells of Aksor line demonstrated the high potential for further selection with salinity and drought tolerance. Activation of SOD, CAT and cell wall bounded POD with forms involves in utilization of reactive oxygen species (ROS), neutralize the negative effect of oxidative stress and correlates with resistance to salinity and drought of potato cells suspension.

**Keywords:** potato, suspension cells, selection, antioxidant enzymes, prooxidants, salinity resistance, drought resistance.

*Поступила 10.0.2014 г.*