

МЕХАНИЗМЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

УДК 577.152.1

ВЛИЯНИЕ D,L-БУТИОНИН-S,R-СУЛЬФОКСИМИНА НА СООТНОШЕНИЕ ФОРМ ГЛУТАТИОНА И РОСТ КАЛЛУСОВ ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ

© 2014 г. Л. Р. Нигматуллина, Н. И. Румянцева*, Ю. А. Костюкова

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

420111 Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31

E-mail: nat_rumyantseva@mail.ru

Поступила в редакцию 07.05.13 г.

Окончательный вариант получен 09.09.13 г.

Исследовали внутриклеточное содержание восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) форм глутатиона, активности глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы и аскорбатпероксидазы в морфогенном и неморфогенном каллусах гречихи татарской в ходе культурального цикла, а также при воздействии D,L-бутионин-S,R-сульфоксими́на (БСО) – ингибитора первого фермента биосинтеза глутатиона – γ -глутамилцистеинсинтазы. Было установлено, что в ходе пассажа культуры незначительно отличались по содержанию общего глутатиона, но содержание GSH было выше в морфогенной культуре, а содержание GSSG – в неморфогенной культуре. В морфогенном каллусе активность глутатион-S-трансферазы была в 10–20 раз выше, а активность глутатионредуктазы в 2–2.5 раза ниже, чем в неморфогенном. При действии БСО снижение содержания GSH в морфогенном каллусе было временным (на 6–8 сутки пассажа), а в неморфогенном оно снижалось уже через сутки и оставалось ниже, чем в контроле на протяжении всего пассажа. БСО не влиял на содержание GSSG в морфогенном каллусе, а в неморфогенном вызывал его накопление. Эти различия, вероятно, обусловлены тем, что на среде с БСО в морфогенном каллусе происходит активация глутатионредуктазы, а в неморфогенном каллусе, наоборот, глутатионредуктаза ингибируется. Несмотря на то, что БСО вызывал снижение общего содержания глутатиона только в неморфогенной культуре, цитостатический эффект БСО был более выражен в морфогенном каллусе. БСО также оказывал негативное влияние на дифференцировку проэмбриональных клеточных комплексов в морфогенном каллусе. Обсуждается роль редокс-статуса глутатиона в поддержании эмбриогенной активности культивируемых клеток растений.

Ключевые слова: *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn., морфогенный каллус, неморфогенный каллус, GSH, GSSG, глутатионредуктаза, глутатион-S-трансфераза, D,L-бутионин-S,R-сульфоксимин, соматический эмбриогенез.

DOI: 10.7868/S0475145014010054

ВВЕДЕНИЕ

Трипептид глутатион (γ -глутамил-цистеинил-глицин) является основным редокс-буфером в клетках животных, присутствуя в двух формах – восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG). В растениях преимущественный вклад в создание внутриклеточного редокс-буфера вносят аскорбат и дегидроаскорбат. Тем не менее, функции глутатиона в клетках растений столь же важны и многообразны, как и в клетках животных: глута-

тион напрямую участвует в защите клеток от окислительного стресса, являясь скэвенджером супероксид-аниона, гидроксил-радикала и синглетного кислорода, выполняет функцию субстрата для работы таких антиоксидантных ферментов как глутатион-S-трансферазы, глутатионпероксидазы, дегидроаскорбатредуктазы. Глутатионилирование – одна из важнейших посттрансляционных модификаций белка, которая защищает тиол-содержащие белки от окислительного повреждения и, вследствие обратимости реакции, способствует модуляции их внутриклеточной активности (Dixon et al., 2005). Глутатион участвует в регуляции клеточного цикла растений, хотя механизм этой ре-

Принятые сокращения: БСО – D,L-бутионин-S,R-сульфоксимин, ПЭКК – проэмбриональный клеточный комплекс, АФК – активные формы кислорода, ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид.

гуляции, полностью не выяснен (Sanchez-Fernandez et al., 1997; Vernoux et al., 2000). В растениях глутатион — это основной источник запасной серы, которая особенно важна в ходе эмбрионального развития растений (Foyer et al., 2001). Показано, что глутатион участвует в регуляции различных морфогенетических процессов как *in vivo*, так и *in vitro* (Kerk et al., 2000; Jiang et al., 2003; Tybursky et al., 2010).

Образование дисульфидной связи при окислении двух молекул восстановленного глутатиона приводит к образованию GSSG — окисленной формы глутатиона. Накопление GSSG в клетках животных, индуцируемое окислительным стрессом, является токсичным и может индуцировать апоптоз (Filomeni et al., 2005). Причем, индукция апоптоза определяется не избытком АФК, а уровнем деплеции (истощения) GSH (Franco et al., 2007). В клетках животных величина соотношения GSH/GSSG отражает развитие стресса и используется как дополнительный индикатор для диагностирования различных патологий. Показано, что в растениях при разных видах стресса также происходит снижение в клетках GSH и увеличение GSSG (Ruiz et al., 2002). Устойчивые генотипы растений характеризуются большим содержанием GSH, при действии различных стрессоров в них наблюдается активация ферментов аскорбат/глутатионового цикла.

Культуры клеток растений имеют разную способность к регенерации растений *in vitro*, поэтому в зависимости от проявления этой способности их подразделяют на морфогенные и неморфогенные культуры. Среди морфогенных культур в исследованиях, как фундаментально, так и в биотехнологических разработках, чаще всего используются так называемые эмбриогенные линии, характеризующиеся высокой частотой регенерационной активности. Основной путь морфогенеза в таких линиях — соматический эмбриогенез. Как правило, эмбриогенные линии имеют “нодулярный” фенотип, который характеризуется наличием проэмбриональных клеточных комплексов (ПЭКК), или, согласно другой терминологии, проэмбриогенных масс (Finer et al., 1994). ПЭКК, в зависимости от видовой и даже сортовой принадлежности культуры, могут быть проэмбрио или даже глобулярными зародышами, остановленными в развитии добавлением ауксина в среду культивирования. Значительную массу каллусной ткани эмбриогенных культур составляет рыхлая ткань-нянька (или “мягкий” каллус), которая образуется при разрыхлении предсущ-

ствующих ПЭКК. Эта ткань является метаболически активной, но ее клетки не способны к активному делению, в отличие от клеток ПЭКК, и, в конечном счете, стареют и погибают. Нами показано, что в морфогенном каллусе гречихи татарской (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.), который является типичной нодулярной культурой, постоянно поддерживается цикл воспроизведения ПЭКК, запускаемый пересадкой каллуса на новую среду с 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (Румянцева и др., 2003; Румянцева и др., 2004). Морфогенные каллусы гречихи татарской сохраняют способность к морфогенезу в течение нескольких лет культивирования, неморфогенные клоны возникают в них редко и сразу характеризуются рыхлым фенотипом и отсутствием ПЭКК, полиплоидией, быстрым ростом, не способностью ни к какому типу дифференцировки. Ранее нами было показано, что для неморфогенных культур по сравнению с морфогенными характерно высокое содержание перекиси водорода и повышенный уровень перекисного окисления липидов, низкая активность каталазы и высокая активность супероксиддисмутазы (Камалова и др., 2009), в них содержится меньше фенолов, и они отличаются по качественному составу (Сибгатуллина и др., 2012). Мы предположили, что культуры, способные к регенерации, должны иметь высокий уровень антиоксидантной защиты, который, с одной стороны, позволяет защищать генетический аппарат клеток от повреждений, вызываемых АФК, а, с другой стороны, эффективно контролировать редокс-регуляцию сигналинга.

В настоящей работе мы исследовали влияние D,L-бутионин-S,R-сульфоксимирина (БСО) — ингибитора первого фермента биосинтеза глутатиона — γ -глутамилцистеинсинтазы на редокс-статус глутатиона и рост каллусов гречихи татарской.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использовали морфогенные и неморфогенные каллусы гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. Морфогенные каллусы были получены из незрелых зародышей как описано ранее (Румянцева и др., 1989; Румянцева и др., 1992; Румянцева и др., 1998; Лукина и др., 1999). Линия морфогенного каллуса *Fagopyrum tataricum* (L.) 1–8 была получена в 2005 году и поддерживалась *in vitro* в течение 8-ми лет. Морфогенная культура имела типичный нодулярный морфотип и состояла из ПЭКК и “мягкого” каллуса. Морфогенные кал-

лусы сохраняли морфологию, диплоидное число хромосом и способность к соматическому эмбриогенезу и геммогенезу в течение длительного времени культивирования (несколько лет) (Румянцева и др., 1989; Румянцева и др., 1998). Неморфогенный каллус линии 1-8р, состоящий только из клеток паренхимного типа, был отселектирован как клон, сформированный на морфогенном каллусе. Неморфогенный каллус отличался от морфогенного каллуса рыхлой структурой, высокой скоростью роста, значительной генетической вариабельностью (хромосомные числа от n до $8n$) и полной утратой способности к морфогенезу. Каллусные культуры поддерживали в термостате при температуре $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$, в темноте на каллусогенной среде RX (Румянцева и др., 1998). Морфогенные каллусы характеризовались способностью формировать соматические зародыши на безгормональной среде MS, а также почки на среде RX с добавлением 6-бензиламинопурина и индолуксусной кислоты. Неморфогенный каллус пересаживали через каждые 2 недели, морфогенный каллус — через каждые 3 недели. О характере роста каллусной культуры судили по приросту сырой массы ткани за определенные промежутки времени.

Определение общего содержания, восстановленной и окисленной форм глутатиона проводили согласно методу, описанному Занг и др. (Zhang et al., 1996). Содержание общего глутатиона оценивали в ходе цветной реакции при образовании комплекса 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоты и GSH. Содержание GSSG оценивали при помощи 2-винилпиридина, который связывается с GSH и маскирует его. Навеску каллусной ткани (250 мг) растирали в 1 мл 5%-ной 5-сульфосалициловой кислоты. Гомогенат центрифугировали (5 мин, 10000 g) и полученный супернатант делили на две части. К одной части супернатанта добавляли 375 мкл 0.5 М Na-фосфатного буфера (pH 7.5) и 12 мкл дистиллированной воды (эту пробу использовали для определения общего содержания глутатиона). Ко второй части супернатанта добавляли 375 мкл 0.5 М Na-фосфатного буфера (pH 7.5) и 12 мкл 2-винилпиридина (97%-ный 2-винилпиридин, стабилизированный 0.1%-ным 4-третбутилкатахолом) для маскировки восстановленной формы глутатиона. Реакционная смесь содержала 600 мкл 0.18%-ного раствора Na-ЭДТА в фосфатном буфере, 100 мкл 0.16%-ного раствора НАДФН, 200 мкл 0.12%-ного раствора 5,5-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) и 2 мкл глутатионредуктазы 0.76 U и 100 мкл супернатанта. Измерения оптической плотности проводили

при 412 нм в течение 60 с интервалом 2.5 с на спектрофотометре Lambda 25 ("Perkin Elmer", США). Вычисление концентраций GSH и GSSG проводили по калибровочным кривым, построенным по известным концентрациям GSH и GSSG. Оптическая плотность GSH вычислялась из разницы оптической плотности общего глутатиона и GSSG.

Активность глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) измеряли согласно методу, описанному Верлан (Верлан, 2008). Навеску каллусной ткани (250 мг) растирали в экстракционном буфере, содержащем 50 mM K_2HPO_4 , 4%-ного поливинилпирролидона, 0.1 mM Na-ЭДТА и 0.3%-ного Triton X-100, 1.3 mM аскорбиновой кислоты и 1 mM ФМСФ. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 11000 g. Супернатант перенесли в новый эппендорф и хранили в сосуде со льдом. Реакционная смесь содержала 1.91 мл буфера измерения, содержащего 100 mM Tris, 1 mM Na-ЭДТА и HCl для доведения pH до 8.0, 20 мкл 0.4%-ного раствора НАДФН и 50 мкл экстракта. Реакция запускалась добавлением 20 мкл 3%-ного раствора GSSG. Контрольная кювета содержала 1.93 мл буфера измерения и 50 мкл экстракта. Активность глутатионредуктазы определяли по изменению абсорбции при 340 нм, обусловленным окислением НАДФН за 3.5 мин с интервалом в 1 с на спектрофотометре Lambda 25 ("Perkin Elmer", США). Активность фермента рассчитывали, используя коэффициент экстинкции для НАДФ⁺ при длине волны 340 нм, равный $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Активность глутатион-S-трансферазы (КФ 2.5.1.18) измеряли согласно методу, описанному Хабиб и др. (Habig et al., 1974) по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между GSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом. Навеску каллусной ткани (350 мг) растирали в экстракционном буфере, содержащем 50 mM K_2HPO_4 , 4%-ного поливинилпирролидона, 0.1 mM Na-ЭДТА и 0.3%-ного Triton X-100, 1.3 mM аскорбиновой кислоты и 1 mM ФМСФ. Гомогенат центрифугировали 5 мин, 12000 g. Супернатант использовали для анализа. Реакционная смесь содержала 2.5 мл 0.1 М К-Na-фосфатного буфера (pH 6.5), 0.2 мл 0.015 М раствора GSH, 0.1 мл супернатанта. Реакцию запускали добавлением 0.2 мл 0.015 М 1-хлор-2,4-динитробензола. Активность глутатион-S-трансферазы определяли по изменению абсорбции при 340 нм, обусловленной образованием глутатион-S-1-хлор-2,4-динитробензола за 1.5 мин с интервалом в 1 с на спектрофотометре Lambda 25 ("Perkin Elmer", США). Активность фермента рассчитывали, используя коэф-

фициент экстинкции для глутатион-S-1-хлор-2,4-динитробензола при длине волны 340 нм, равный $9.6 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Активность аскорбатпероксидазы (КФ 1.11.1.7) измеряли согласно методу, описанному Верма и Дубей (Verma et al., 2003). Навеску каллусной ткани (150 мг) растирали в 50 мМ К-Na-фосфатном буфере (рН 7.8), содержащем 1 мМ ФМСФ, 1 мМ аскорбиновой кислоты и 1%-ного поливинилпирролидона. Гомогенат центрифугировали (5 мин, 12000 g). Полученный супернатант использовали для измерения. Реакционная смесь содержала К-Na-фосфатный буфер (рН 7.0), 0.2 мМ аскорбиновой кислоты, 0.2 мМ Na-ЭДТА и супернатант. Реакцию запускали добавлением 20 мкМ перекиси водорода. Измерение оптической плотности проводили при 290 нм в течение 120 с интервалом в 1 с на спектрофотометре Lambda 25 ("Perkin Elmer", США). За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, изменяющее оптическую плотность реакционной смеси на 0.001 единиц оптической плотности за единицу времени.

Содержание белка определяли по степени связывания с красителем Кумасси голубым (СВВ G-250 "Sigma") по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

Определение жизнеспособности клеток проводили спектрофотометрически с помощью красителя Evans Blue, как описано Кастро-Конча и др. (Castro-Concha et al., 2006). К 150 мг каллусной ткани добавляли 500 мкл 0.025%-ного красителя и выдерживали при комнатной температуре 15 мин. Затем клетки отмывали от красителя дистиллированной водой и добавляли к ним 1 мл раствора 1%-ного лаурилсульфата-Na в 50%-ном этаноле. Раствор с клетками выдерживали 30 мин на водяной бане при 60°C . Далее его центрифугировали (5 мин, 12500 g) и измеряли оптическую плотность супернатанта при длине волны 600 нм на спектрофотометре Lambda 25 ("Perkin Elmer", США). В качестве контроля (100% мертвых клеток) использовали 150 мг каллусной ткани, прокипяченной в течение 20 мин, или дважды замороженной жидким азотом и размороженной.

Митотический индекс подсчитывали на давленных препаратах каллуса, предварительно зафиксированного в фиксаторе Кларка и окрашенного пропионом лакмоидом. Для одновременной окраски и мацерации материал кипятили в красителе 5–10 с, затем готовили давленные препараты в 45%-ной молочной кислоте. Препараты

анализировали с помощью микроскопа Jenamed "Carl Zeiss" (Германия), фотографировали, используя цифровую камеру AxioCam MRc5 с программным обеспечением AxioVision Rel. 4.6, и обрабатывали с помощью программы Adobe PhotoShop 7.0.

Для гистологических исследований кусочки ткани фиксировали 2.5%-ным глутаровым альдегидом на фосфатном буфере с постфиксацией в 1%-ном OsO_4 . Далее ткань обезвоживали в ряде спиртов с постепенным повышением концентрации, ацетоне, пропиленоксиде и заключали в эпон. Для приготовления гистологических препаратов полутонкие срезы, сделанные с помощью ультрамикротомы LKB (Швеция), окрашивали 1%-ным толуидиновым синим и изучали с помощью микроскопа Jenamed (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали, используя цифровую насадку AxioCam MRc5 с программным обеспечением AxioVision Rel. 4.6.

В экспериментах ингибитор биосинтеза глутатиона БСО в концентрации 0.1 мМ добавляли в среду культивирования, предварительно простерилизовав его через ультрафильтр "Millipore" с диаметром пор 0.22 мкм. Кусочки каллусов взвешивали и помещали на среду с ингибитором и культивировали в термостате.

Обработка данных проведена методами математической статистики с использованием Microsoft Office Excel 2003. В качестве разброса экспериментальных данных указаны среднеарифметические ошибки, при подсчете митотического индекса – ошибка выборочной доли.

Реактивы. В работе использовали тиамин-HCl, пиридоксин-HCl, никотиновую кислоту, 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту, индолилуксусную кислоту, нафтилуксусную кислоту, кинетин, гидролизат казеина, Na-ЭДТА, орсеин, агар-агар, ФМСФ, глутатионредуктазу (0.76 U) из пекарских дрожжей и 5-сульфосалициловую кислоту, краситель Кумасси голубой СВВ G-250 фирмы "Sigma Aldrich" (США); НАДФН, GSH, GSSG, поливинилпирролидон фирмы "AppliChem" (Германия); 5,5'-дитиобис-2-нитробензойную кислоту и 1-хлор-2,4-динитробензол, 2-винилпиридин (97%-ный 2-винилпиридин, стабилизированный 0.1%-ным 4-третбутилкатехолом), OsO_4 фирмы "Alfa Aesar" (США); тритон X-100, 1,d-бутионин-s,r-сульфоксимин, лаурилсульфат-Na фирмы "Acros Organics" (Бельгия); аскорбиновую кислоту, Tris фирмы "Panreac" (Испания). Остальные реактивы отечественного производства.

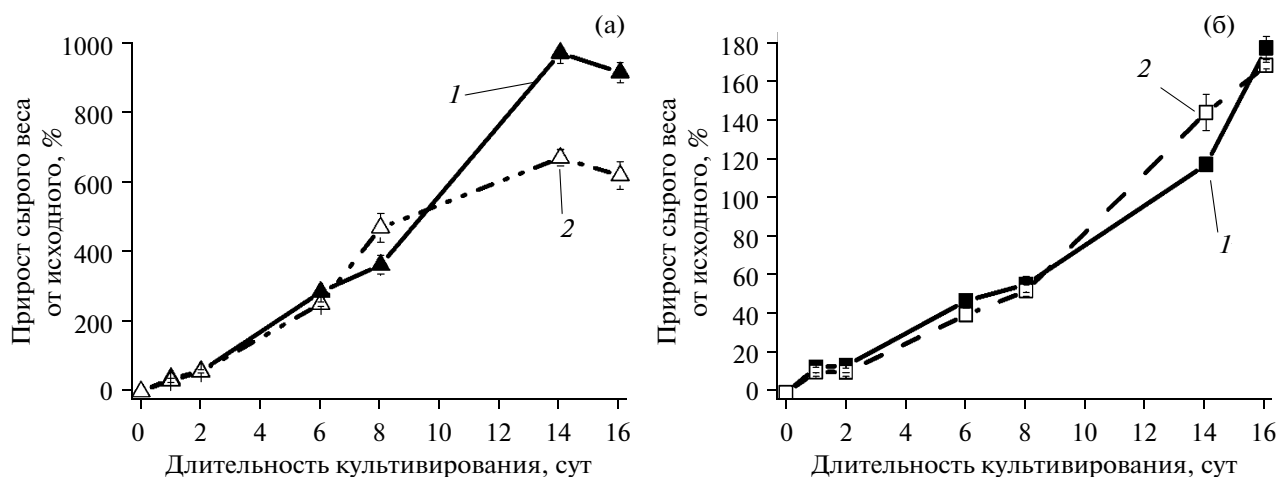


Рис. 1. Влияние БСО на рост неморфогенного (а) и морфогенного (б) каллусов гречихи татарской. 1 – среда RX, 2 – среда RX + 0.1 мМ БСО.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние БСО на рост морфогенного и неморфогенного каллусов гречихи татарской

Рост неморфогенного каллуса гречихи татарской можно описать S-образной кривой (рис. 1а). Клетки каллусов приступают к делению уже на 2 сутки после пересадки на новую среду культивирования и интенсивно делятся до 7 суток, после чего начинается их растяжение, которое наблюдается до 10–12 суток. После стадии растяжения следует стадия старения – на 14 сутки рост культур выходит на плато, а затем на 16–18 сутки наблюдается гибель клеток. Следует отметить, что неморфогенные каллусы крайне чувствительны к срокам пересадки на новую среду, так как даже при незначительной задержке сроков пересадки (на несколько суток) рост каллусов может быть очень слабым (в виде роста отдельных участков) или отсутствовать совсем.

Для морфогенной культуры S-образная кривая не характерна, что может объясняться отсутствием выраженной стадии деградации и гибели культуры (каллус может приступать к росту на новой среде даже после 2–3 месяцев выдерживания на среде без пересадки).

Ранее было показано, что в ходе культурально-го цикла в морфогенном каллусе наблюдается несколько пиков митотической активности, что связано с циклами формирования ПЭКК (Румянцева и др., 1998). Морфогенные культуры отличаются медленным ростом по сравнению с неморфогенными: по приросту сырой биомассы в 4–5 раз (рис. 1б).

БСО используется как ингибитор биосинтеза GSH, содержание которого снижается вследствие ингибирования активности γ -глутамилцистеинсинтазы. Как у животных, так и у растений нокаут гена γ -глутамилцистеинсинтазы приводит к эмбриональным летальям (Shi et al., 2000; Cairns et al., 2006). При действии БСО прирост биомассы неморфогенного каллуса на 14–16 сутки культивирования отставал от контроля (рис. 1а), а прирост морфогенного каллуса не отличался от контроля (рис. 1б). При этом жизнеспособность клеток неморфогенного каллуса была такой же (85%) как и в контроле. Важно отметить, что, несмотря на отсутствие различий по приросту биомассы, БСО оказывал влияние на образование ПЭКК в морфогенном каллусе, значительно снижая их количество (рис. 2а, 2б). На рис. 2б на среде с БСО видны единичные ПЭКК. При проведении гистологического анализа на 5 сутки выращивания каллуса на среде с БСО нами было установлено, что в морфогенном каллусе нарушаются рост и дифференцировка ПЭКК (рис. 2в, 2г). На гистологических срезах видно, что ПЭКК в каллусах на среде с БСО значительно меньшего размера, чем в контроле и образованы небольшим числом клеток меристематического типа, такие ПЭКК визуально на поверхности каллуса не различимы (рис. 2г). Морфологически ПЭКК на среде с БСО соответствуют вновь формирующимся комплексам на среде без ингибитора на 2 сутки культивирования. На 5 сутки в контрольной культуре ПЭКК – это визуально различимые структуры, образованные различными типами клеток и имеющие величину 0.5–1 мм (рис. 2в). Стоит отметить, что на гистологических срезах размер клеток мягкого

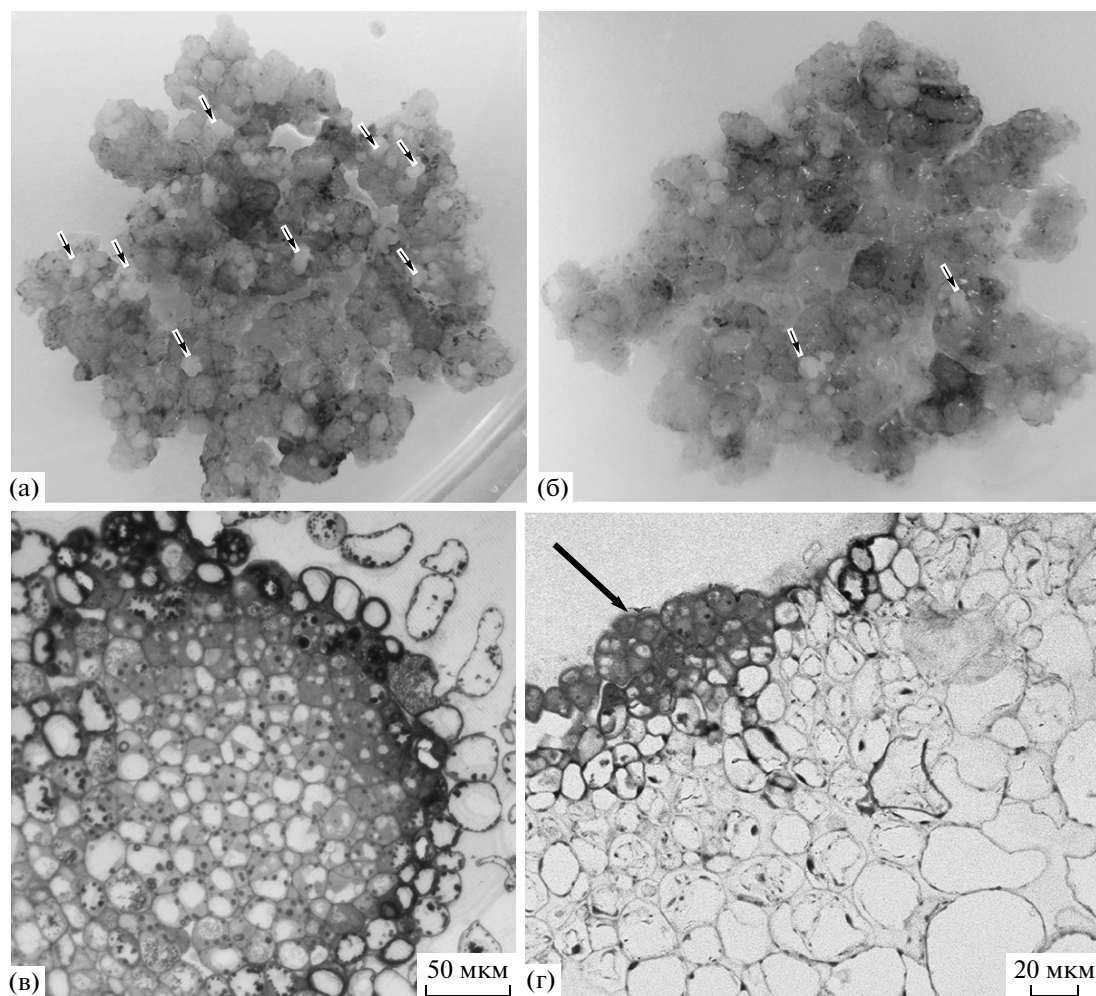


Рис. 2. Влияние БСО на морфологию и гистологию морфогенного каллуса гречихи татарской. (а) – Внешний вид морфогенного каллуса на среде RX, (б) – внешний вид морфогенного каллуса на среде RX + 0.1 мМ БСО, (в) – гистология ПЭКК на среде RX, (г) – гистология ПЭКК на среде RX + 0.1 мМ БСО (стрелками указаны ПЭКК).

каллуса на среде с БСО был несколько больше, чем в контроле, что можно объяснить усилением вакуолизации клеток при действии БСО. На гистологические особенности неморфогенного каллуса БСО не оказывал значительного влияния, хотя проведенные измерения размеров клеток показали, что их длина увеличилась почти на 20% (данные не представлены).

Согласно литературным данным, гомеостаз клеточного редокс-потенциала является важнейшим регулятором судьбы клетки, как у млекопитающих, так и у растений и регулируемые изменения в увеличении или накоплении окислительных и восстановительных сигналов могут оказывать большое влияние на прохождение клеточного цикла (Sanchez-Fernandez et al., 1997; Vèrnoux et al., 2000; Belmonte et al., 2005; Maughan et al., 2006; Reichheld et al., 2007). Известно, что для клеток жи-

вотных в G1 фазе клеточного цикла характерен низкий уровень глутатиона; увеличение содержания GSH необходимо для прохождения клетками G1/S-фазы клеточного цикла (Kerk et al., 2000). Поскольку деплеция (истощение) глутатиона при действии БСО может влиять на прохождение клеточного цикла и деление клеток, мы проверили влияние БСО на митотический индекс в обеих культурах (в течение 7 суток культивирования). В неморфогенном каллусе достоверную разницу в снижении митотического индекса наблюдали, начиная с 3 суток, на 2 сутки культура еще активно делилась как в опыте, так и в контроле (рис. 3а). Даже к 7 суткам культивирования около 1% клеток неморфогенного каллуса продолжало делиться (рис. 3а), в то время как в морфогенном каллусе делилось не более 0.44% клеток (рис. 3б). В морфогенном каллусе БСО вызывал подавление де-

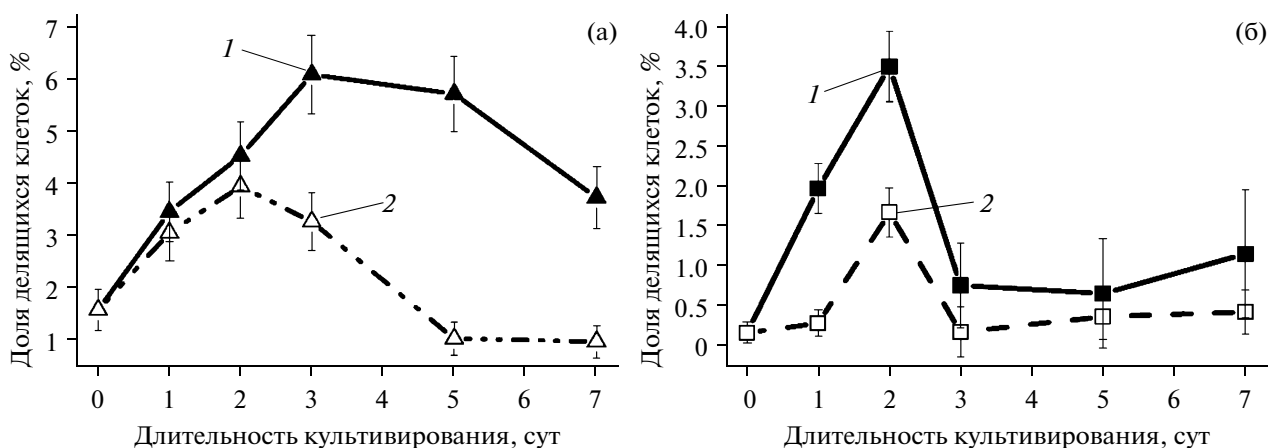


Рис. 3. Влияние БСО на митотический индекс неморфогенного и морфогенного каллусов гречихи татарской. (а) – Неморфогенный каллус, (б) – морфогенный каллус; 1 – среда RX, 2 – среда RX + 0.1 мМ БСО.

ления клеток уже через сутки культивирования (рис. 3а). Таким образом, мы установили, что БСО в концентрации 0.1 мМ влияет на деление клеток обеих каллусных культур, оказывая цитостатическое действие. Ранее Санчез-Фернандез и др. (Sanchez-Fernandez et al., 1997) было показано, что деплеция глутатиона при добавлении в среду выращивания 1 мМ БСО снижает митотический индекс в корнях *A. thaliana*, в то время как экзогенное добавление 0.25 мМ GSH увеличивает его. Нами показано, что в культивируемых клетках гречихи татарской цитостатический эффект вызывает значительно меньшая концентрация ингибитора. Вероятно, ингибирование деления клеток объясняет тот факт, что к 7 суткам культивирования на среде с БСО количество ПЭКК в морфогенном каллусе было значительно ниже, чем в контроле. Отсутствие различий по росту биомассы морфогенного каллуса на среде с ингибитором и без него обусловлено, вероятно, усилением вакуолизации и оводненности клеток.

2. Динамика содержания глутатиона и антиоксидантных ферментов в ходе пассажа в культурах с разной морфогенной активностью

В целом, содержание общего глутатиона в морфогенном и неморфогенном каллусах отличалось незначительно (рис. 4в) и варьировало в течение пассажа в пределах 400–600 мкМ/г сухого веса. Основные различия касались соотношения содержания в клетках двух форм глутатиона – GSH и GSSG (рис. 4а, 4б, 4г). Нами также были выявлены определенные особенности в динамике содержания GSH в ходе пассажа обеих каллусных культур (рис. 4а).

После пересадки неморфогенного каллуса на свежую среду культивирования было отмечено небольшое повышение содержания GSH, которое сохранялось до 6 суток пассажа (рис. 4а), и, вероятно, было связано с делением клеток каллуса. Показано, что GSH необходим для поддержания деления клеток в меристеме корня *A. thaliana* (Sanchez-Fernandez et al., 1997). GSH локализован в активно делящихся инициальных клетках, но отсутствует в медленно делящихся клетках покоящегося центра (Jiang et al., 2003). К 14 суткам культивирования содержание GSH в клетках постепенно снижалось, составляя в среднем около 330 мкМ/г сухого веса, а на 16 сутки наблюдалось резкое увеличение содержания GSH, почти до 1050 мкМ/г сухого веса. Мы провели еще один опыт, увеличив время культивирования каллуса до 18 суток (данные не приведены), и снова обнаружили резкое увеличение содержания GSH – до 800 мкМ/г сухого веса на 15 сутки культивирования, а на 18 сутки – резкое снижение содержания GSH до 200 мкМ/г сухого веса. В ходе пассажа содержание GSSG в клетках неморфогенного каллуса варьировало от 150 до 250 мкМ/г сухого веса, увеличиваясь к 16–18 суткам до 280–400 мкМ/г сухого веса. Можно предположить, что такие колебания в содержании GSH и GSSG обусловлены процессами старения и гибели клеток, поскольку при старении содержание GSH снижается, а GSSG увеличивается (Groten et al., 2006). Резкое увеличение содержания GSH на 15–16 сутки культивирования объяснить сложно, возможно, оно связано со снижением активности ферментов, удаляющих глутатион из клетки. Этот период, по-видимому, приходится на ограничение культуры по субстрату (например, сульфатам) и ее голодание. Подобный эффект был описан

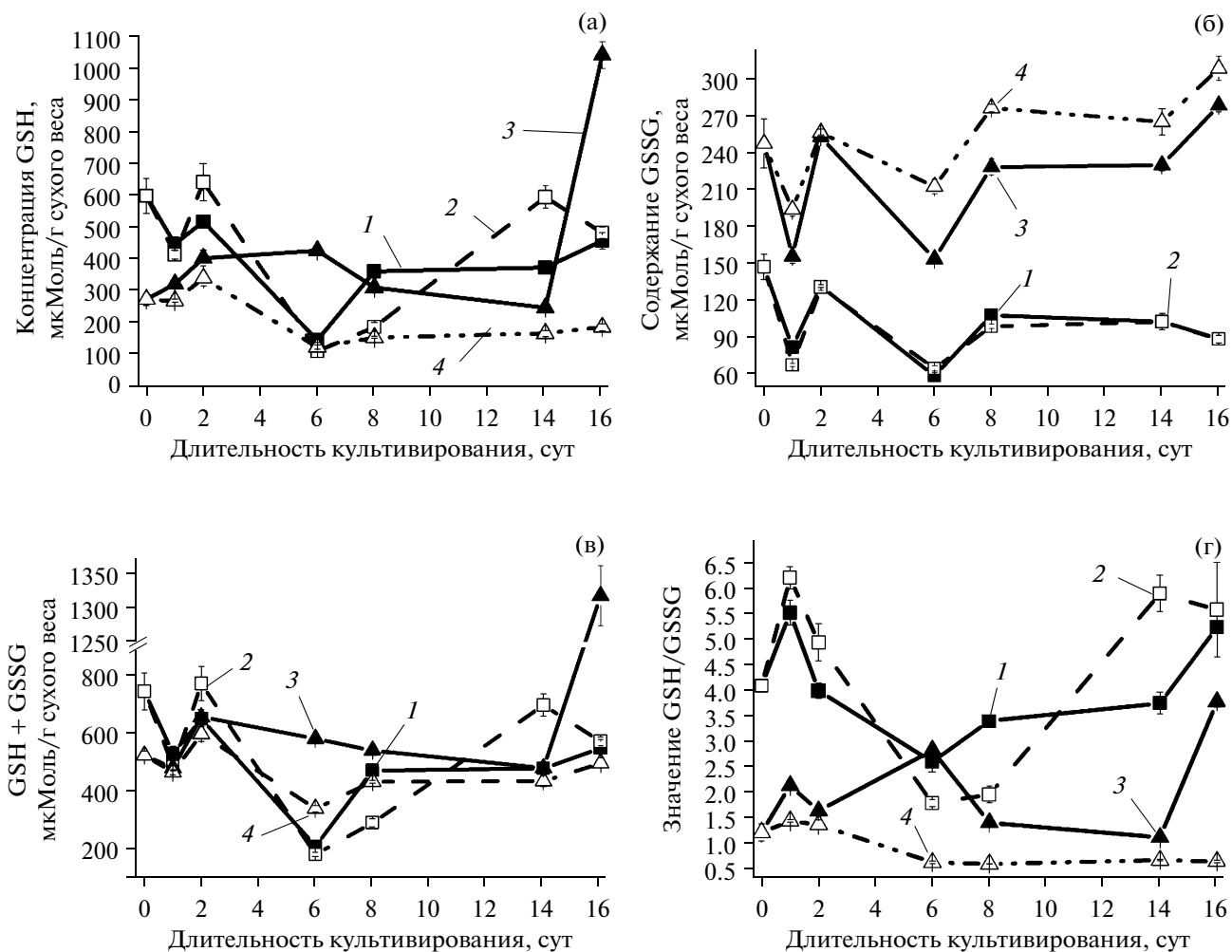


Рис. 4. Динамика восстановленной (а) и окисленной форм глутатиона (б), общего содержания глутатиона (в) и показателя GSH/GSSG (г) в клетках морфогенного и неморфогенного каллусов гречихи татарской. 1 – Среда RX, морфогенный каллус, 2 – среда RX + 0.1 мМ БСО, морфогенный каллус, 3 – среда RX, неморфогенный каллус, 4 – среда RX + 0.1 мМ БСО, неморфогенный каллус.

Пельни и др. (Pelny et al., 2009) на суспензионной культуре *A. thaliana*. Авторами было показано, что содержание GSH в клетках, которое увеличивалось на экспоненциальной фазе роста, резко снижалось с прекращением роста культуры. Продлить экспоненциальный рост культуры и накопление GSH удалось добавлением свежей среды к культивируемым клеткам.

Соотношение GSH/GSSG в ходе пассажа неморфогенного каллуса было более высоким на 1–6 сутки культивирования (до 2.8), затем снижалось до 1 к 14 суткам и после резкого и кратковременного увеличения на 15–16 сутки (до 4) падало до 0.48. Помимо линии 1–8р мы изучили содержание двух форм глутатиона еще в двух линиях неморфогенного каллуса гречихи татарской 1–10р и

1–5р (данные не представлены). В них, так же как и в линии 1–8р, значения соотношения GSH/GSSG в ходе пассажа были очень низкими по сравнению с морфогенным каллусом и составляли от 1 до 2.

В морфогенном каллусе в ходе пассажа содержание GSH увеличивалось на 2 сутки культивирования, а затем падало на 6 сутки культивирования и снова увеличивалось на 8 сутки (рис. 4а). Это последовательное увеличение, снижение и новое увеличение содержания GSH наблюдалось в двух отдельных опытах и является достоверным. Вероятно, такая динамика GSH связана с циклом образования ПЭКК. На 2–4 сутки в культуре отмечается усиление секреторных процессов, формирование трихом и разрыхление предсуществующих ПЭКК (Румянцева и др., 2004). Известно,

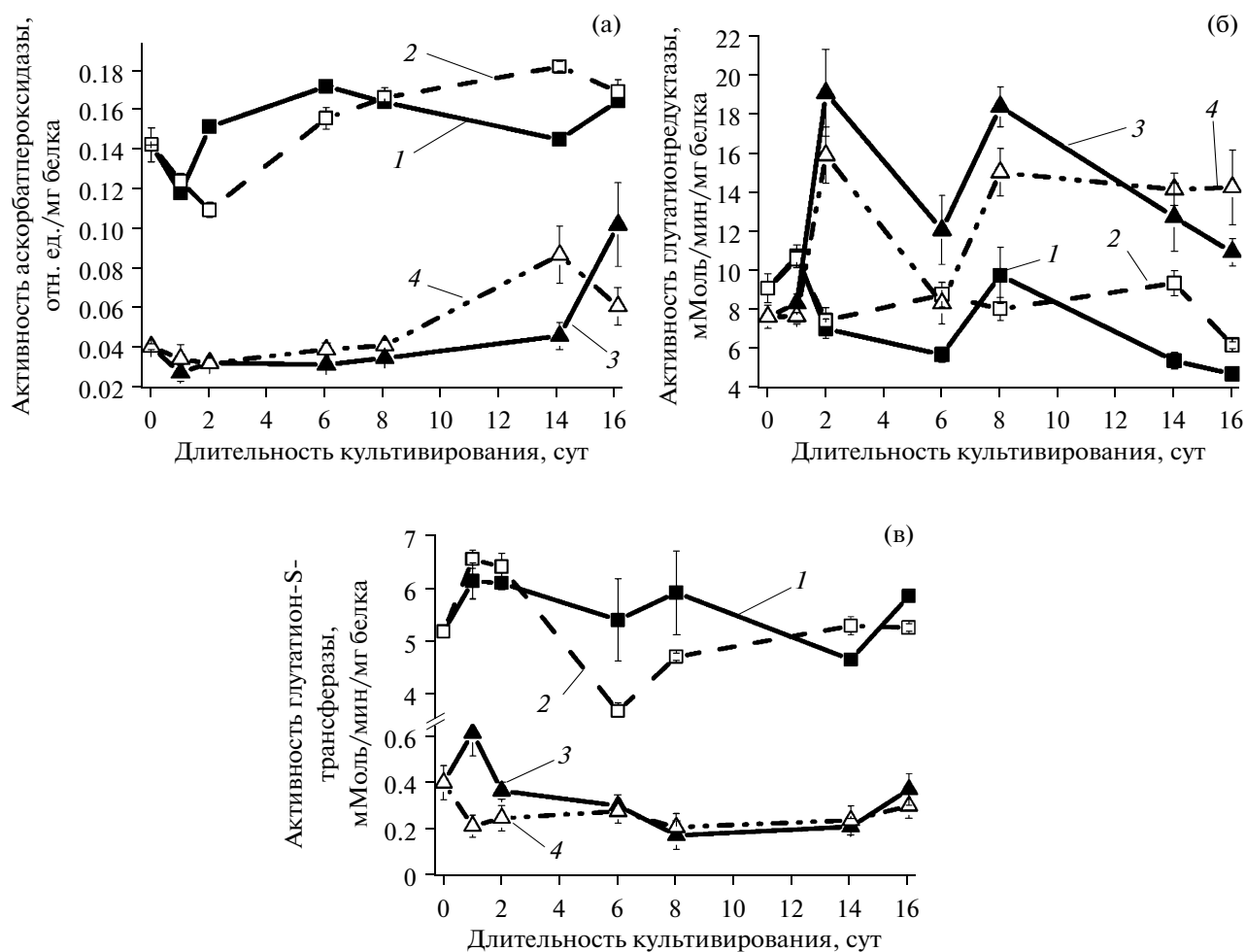


Рис. 5. Влияние БСО на активность аскорбатпероксидазы (а), глутатионредуктазы (б), глутатион-S-трансферазы (в) в неморфогенном и морфогенном каллусах гречихи татарской. 1 – Среда RX, морфогенный каллус, 2 – среда RX + 0.1 мМ БСО, морфогенный каллус, 3 – среда RX, неморфогенный каллус, 4 – среда RX + 0.1 мМ БСО, неморфогенный каллус.

что секреция белков (Chakravarthi et al., 2004) и формирование трихом (Gutierrez-Alcala et al., 2000) зависят от синтеза GSH. Усиление секреции коррелирует с началом деления клеток и инициацией новых ПЭКК. Как уже упоминалось, высокое внутриклеточное содержание GSH характерно для делящихся клеток и меристем, в стареющих клетках содержание GSH снижается, а GSSG увеличивается. Снижение содержания GSH на 6 сутки, вероятно, обусловлено прекращением секреторных процессов, что коррелирует с отмиранием трихом. Последующее увеличение GSH обусловлено делением и дифференцировкой клеток вновь образованных ПЭКК. Важно отметить, что в разных линиях МК цикл образования ПЭКК характеризовался одинаковой динамикой изменения содержания GSH (данные не приведены).

Содержание GSH в ходе пассажа культуры составляло в среднем 416 мкМ/г сухого веса (за исключением 6 суток). Следует отметить, что в морфогенном каллусе содержание GSSG в течение пассажа практически не изменялось, оставаясь примерно в 2 раза ниже по сравнению с неморфогенным каллусом, и лишь немного повышалось к концу пассажа (рис. 4б). Значение соотношения GSH/GSSG в течение всего пассажа морфогенного каллуса поддерживалось на достаточно высоком уровне (от 2.8 до 5.5) (рис. 4г).

Изучение активности глутатионредуктазы, аскорбатпероксидазы и глутатион-S-трансферазы показало, что в неморфогенном каллусе активность глутатионредуктазы выше, чем в морфогенном каллусе, а активность аскорбатпероксидазы и глутатион-S-трансферазы выше в морфогенном каллусе (рис. 5а, 5б, 5в). Обращает на себя внима-

ние очень большая разница в активности глутатион-S-трансферазы в двух культурах — в 10–20 раз. Интересно отметить, что в морфогенном каллусе активность глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы коррелируют с увеличением и снижением содержания GSH в клетках. Активность аскорбатпероксидазы такой зависимости не обнаруживает.

3. Влияние БСО на содержание различных форм глутатиона и активность антиоксидантных ферментов в клетках, контрастных по морфогенной способности

В ответ на действие 0.1 мМ БСО содержание GSH снижалось как в морфогенном каллусе, так и в неморфогенном каллусе по сравнению с контролем (рис. 4а). Но если в морфогенном каллусе снижение GSH наблюдали на 6–8 сутки культивирования и оно было временным, то в неморфогенном каллусе содержание GSH снижалось уже через сутки и оставалось ниже, чем в контроле на протяжении всего пассажа. В клетках морфогенного каллуса на 2 и 14 сутки культивирования содержание GSH на среде с БСО было выше, чем в контроле. Важно отметить, что БСО не влиял на содержание GSSG в клетках морфогенной культуры, в то время как в клетках неморфогенного каллуса увеличение содержания GSSG наблюдали, начиная с 3 суток. Соотношение GSH/GSSG в морфогенном каллусе на среде с БСО варьировало от 2 до 6 и было на 1, 2 и 14 сутки выше, чем в контроле. В неморфогенном каллусе соотношение GSH/GSSG снижалось уже через сутки культивирования каллуса на среде с БСО до 1.3, а, начиная с 6 суток культивирования, не превышало 0.5 (рис. 4г).

В неморфогенном каллусе увеличение активности аскорбатпероксидазы на среде с БСО отмечали, начиная с 6 суток культивирования, хотя она все равно оставалась в несколько раз ниже, чем в морфогенном каллусе (рис. 5а). Ингибирование активности аскорбатпероксидазы в морфогенном каллусе наблюдали только на 2 сутки культивирования, в остальное время активность или была такой же, как в контроле или даже увеличивалась (14 сутки).

Активность глутатионредуктазы на среде с БСО в морфогенном каллусе увеличивалась на 6, 14 и 16 сутки культивирования, в остальные точки проведения измерений ее активность была сопоставима с контрольными значениями (рис. 5б). Напротив, в неморфогенном каллусе активность глутатионредуктазы снижалась уже через 2 сут

культивирования, но по-прежнему оставалась выше, чем в морфогенном каллусе.

Активность глутатион-S-трансферазы в неморфогенном каллусе и так невысокая по сравнению с морфогенным, подавлялась уже на 1–2 сутки культивирования на среде с БСО и далее не отличалась от контроля. В морфогенном каллусе подавление активности глутатион-S-трансферазы на среде с БСО наблюдали временно — на 6–8 сутки культивирования (рис. 5в). Глутатион-S-трансферазы — это ферменты, катализирующие конъюгацию глутатиона с широким кругом гидрофобных, электрофильных и цитотоксических субстратов, которые затем транспортируются с помощью АТФ-зависимой GS-X помпы в вакуоль. Многие из глутатион-S-трансфераз работают как GSH-зависимые пероксидазы, катализируя редукцию органических гидроперекисей. Показано, что трансгенные растения *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие ген глутатион-S-трансферазы, более устойчивы к окислительному стрессу, индуцируемому паракватом, зацветают раньше контрольных растений и имеют большее количество листьев (Gong et al., 2005). В ряде работ была выявлена зависимость экспрессии генов глутатион-S-трансфераз и способности культивируемых клеток к соматическому эмбриогенезу (Kuriyama et al., 2002; Galland et al., 2001, Imin et al., 2001). Вероятно, сверхэкспрессия глутатион-S-трансфераз не только обеспечивает защиту от разрушительного действия АФК, но и модулирует сигналинг в культивируемых клетках. Известно, что сигнальный ответ на увеличение уровня пероксида водорода, который запускает морфогенетический отклик в клетках, включает увеличение мобилизации кальция, фосфорилирование белков и экспрессию генов (Neill et al., 2002).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в нашей работе было показано:

1. В культурах гречихи татарской, контрастных по морфогенной активности, общее содержание глутатиона приблизительно одинаково. Однако содержание GSH выше в морфогенной культуре, а содержание GSSG выше в неморфогенной культуре. Таким образом, морфогенные каллусы обладают большим запасом GSH, который может участвовать в защите от инактивации ферментов, в восстановлении дегидроаскорбата или напрямую восстанавливать АФК.

2. В ходе пассажа содержание GSH изменяется как в морфогенной, так и в неморфогенной культурах. В морфогенном каллусе динамика GSH

связана с циклом образования ПЭКК, в неморфогенном наибольшее увеличение GSH было связано с окончанием стационарной фазы роста и предшествовало гибели культуры. В морфогенном каллусе содержание GSSG в течение пассажа практически не изменялось, оставаясь примерно в 2 раза ниже по сравнению с неморфогенным каллусом

3. Действие БСО приводило к снижению общего содержания глутатиона только в неморфогенной культуре, что могло свидетельствовать о подавлении активности γ -глутамилцистеинсинтазы и снижении синтеза GSH. Тем не менее, БСО оказывал цитостатический эффект на клетки обеих культур и этот эффект был более выражен в морфогенном каллусе. Не исключено, что в клетках морфогенного каллуса наблюдаемый эффект может быть связан со снижением содержания аскорбата и увеличением, соответственно, дегидроаскорбата. Известно, что дегидроаскорбат подавляет деление в клетках растений (Jiang et al., 2003). Кроме того, показано (Lin et al., 1991), что дегидроаскорбат и продукт его дегградации оксалат могут вызывать разрыхление клеточных стенок и усиливать вакуолизацию клеток, которую мы наблюдали в обеих культурах.

4. Судя по тому, что при действии БСО содержание GSH в морфогенной культуре снижается очень незначительно (только на 8 суток) и даже может увеличиваться (на 2 и 14 суток) – в морфогенном каллусе на среде с БСО происходит активное восстановление GSSG. Это восстановление, вероятно, осуществляется глутатионредуктазой, поскольку на среде с БСО в каллусных клетках происходит активация этого фермента. В неморфогенной культуре на среде с БСО, наоборот, глутатионредуктаза ингибируется.

5. Высокая активность глутатион-S-трансфераз, обнаруженная нами в морфогенных культурах гречихи татарской, свойственна также для эмбриогенных культур других растений. Глутатион-S-трансферазы являются маркерными белками соматического эмбриогенеза и позволяют клеткам эффективно противостоять окислительному стрессу (Sharifi et al., 2012). Можно предположить, что, по крайней мере, отчасти, высокое содержание GSH в морфогенных культурах необходимо для эффективной работы глутатион-S-трансфераз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Верлан Н.В. Клинико-фармакологический анализ состояния системы глутатиона при церебральной ишемии Автореф. дис. ... докт. мед. наук, МГУ. 2008. Москва. 37 с.
- Камалова Г.В., Акулов А.Н., Румянцева Н.И. Сравнение редокс-статуса клеток морфогенных и полученных из них неморфогенных каллусов гречихи татарской // Биохимия. 2009. Т. 74. С. 842–852.
- Лукина Ю.А., Румянцева Н.И. Каллусогенез и морфогенез в культуре незрелых зародышей различных видов рода *Fagopyrum* (*Polygonaceae*) // Бот. журн. 1999. Т. 84. С. 74–79.
- Сибгатуллина Г.В., Румянцева Н.И., Хаертдинова Л.Р. и др. Получение и характеристика устойчивой к аминотриазолу линии морфогенного каллуса *Fagopyrum tataricum* // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 701–709.
- Румянцева Н.И., Акулов А.Н., Мухитов А.Р. Экстраклеточные полимеры в каллусных культурах *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. с разной морфогенной активностью: динамика в ходе культурального цикла // Прикладная биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. С. 571–578.
- Румянцева Н.И., Валиева А.И., Самохвалова Н.А. и др. Особенности лигнификации клеточных стенок каллусов гречихи, различающихся по способности к морфогенезу // Цитология. 1998. Т. 40. С. 835–843.
- Румянцева Н.И., Сальников В.В., Федосеева Н.В. и др. Особенности морфогенеза в длительно культивируемых каллусах гречихи // Физиология растений. 1992. Т. 39. С. 143–151.
- Румянцева Н.И., Сергеева Н.В., Хакимова Л.Э. и др. Органогенез и соматический эмбриогенез в культуре двух видов гречихи // Физиология растений. 1989. Т. 36. С. 187–194.
- Румянцева Н.И., Шамай Й., Энзикат Х.-Ю. и др. Изменение поверхностной сети экстраклеточного матрикса в процессе циклического воспроизводства проэмбриональных клеточных комплексов в каллусе *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn // Доклады академии наук. 2003. Т. 391. С. 123–127.
- Belmonte M.F., Donald G., Reid D.M. et al. Alterations of the glutathione redox state improve apical meristem structure and somatic embryo quality in white spruce (*Picea glauca*) // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 2355–2364.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
- Cairns N.G., Pasternak M., Wachter A. et al. Maturation of Arabidopsis seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo // Plant Physiol. 2006. V. 141. P. 446–455.
- Castro-Concha L.A., Escobedo R.M., Miranda-Ham M.L. Measurement of cell viability in *in vitro* cultures // Methods in Mol. Biol. 2006. V. 318. P. 71–76.
- Chakravarthi S., Bulleid N.J. Glutathione is required to regulate the formation of native disulphide bonds within

- proteins entering the secretory pathway // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 39872–39879.
- Dixon D.P., Skipsey M., Grundy N.M. et al. Stress-induced protein S-glutathionylation in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2005. V. 138. P. 2233–2244.
- Filomeni G., Aquilano K., Civitareale P. et al. Activation of c-Jun-N-terminal kinase is required for apoptosis triggered by glutathione disulfide in neuroblastoma cells // *Free Radical Biol.* 2005. V. 39. P. 345–354.
- Finer J.J. Plant regeneration via embryogenic suspension cultures. In (eds. RA Dixon and RA Gonzales) *Plant Cell Culture: A Practical Approach* Oxford: Oxford University Press. 1994. P. 99–125.
- Foyer C.H., Theodoulou F.L., Delrot S. The functions of intercellular and intracellular glutathione systems in plants // *Trends Plant Sci.* 2001. V. 6. P. 486–492.
- Franco R., Panayiotidis M.I., Cidowski J.A. Glutathione depletion is necessary for apoptosis in lymphoid cells independent of reactive oxygen species formation // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 30452–30465.
- Galland R., Randoux B., Vasseur J. et al. A glutathione S-transferase cDNA identified by mRNA differential display is upregulated during somatic embryogenesis // *Biochim Biophys Acta.* 2001. V. 1522. P. 212–216.
- Gong H., Jiao Y., Hu W.W. et al. Expression of glutathione-S-transferase and its role in plant growth and development *in vivo* and shoot morphogenesis *in vitro* // *Plant Mol. Biol.* 2005. V. 57. P. 53–66.
- Groten K., Dutilleul C., van Heerden P.D. Redox regulation of peroxiredoxin and proteinases by ascorbate and thiols during pea root nodule senescence // *FEBS Letters.* 2006. V. 580. P. 1269–1276.
- Gutierrez-Alcala G., Gotor C., Meyer A.J. et al. Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis* trichome cells // *PNAS.* 2000. V. 97. P. 11108–11113.
- Habig W.H., Pabst M.S., Jakoby W.B. et al. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. P. 7130–7139.
- Imin N., Kerim T., Weinman J.J. et al. Characterisation of rice anther proteins expressed at the young microspore stage // *Proteomics.* 2001. V. 1. P. 1149–1161.
- Jiang K., Meng Y.L., Feldman L.J. Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment // *Development.* 2003. V. 130. P. 1429–1438.
- Kerk N.M., Jiang K., Feldman L.J. Auxin metabolism in the root apical meristem // *Plant Physiol.* 2000. V. 122. P. 925–932.
- Kuriyama H., Fukuda H. Developmental programmed cell death in plants // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002. V. 2. P. 568–573.
- Lin L.-S., Varner J.E. Expression of ascorbic acid oxidase in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.) // *Plant Physiol.* 1991. V. 96. P. 159–165.
- Maughan S., Foyer H.C. Engineering and genetic approaches to modulating the glutathione network in plants // *Physiol. Plant.* 2006. V. 126. P. 382–397.
- Neill S., Desikan R., Hancock J. Hydrogen peroxide signaling // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002. V. 5. P. 388–395.
- Pellny T.K., Locato V., Diaz Vivancos P. Pyridine nucleotide cycling and control of intracellular redox state in relation to poly (ADPribose) polymerase activity and nuclear localisation of glutathione during exponential growth of *Arabidopsis* cells in culture // *Molecular Plant.* 2009. V. 2. P. 442–456.
- Reichheld J.P., Khaf M., Riondet C. et al. Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in *Arabidopsis* development // *Plant Cell.* 2007. V. 19. P. 1851–1865.
- Ruiz J.M., Blumwald E. Salinity-induced glutathione synthesis in *Brassica napus* // *Planta.* 2002. V. 214. P. 965–969.
- Sanchez-Fernandez R., Fricker M., Corben L.B., et al. Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997. V. 94. P. 2745–2750.
- Sharifi G., Edrahimzadeh H., Ghareyazie B. et al. Identification of differentially accumulated proteins associated with embryogenic and non-embryogenic calli in saffron (*Crocus sativus* L.) // *Proteome Science.* 2012. V. 10. P. 1–15.
- Shi Z.Z., Osei-Frimpong J., Kala G. et al. Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000. V. 97. P. 5101–5106.
- Tybursky J., Tretyn A. Ascorbate and glutathione in organogenesis, regeneration and differentiation in plant *in vitro* cultures // In (eds. N.A. Anjum, M.-T. Chan, S. Umar) *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants.* Berlin: Springer Science+Business Media B.V. 2010. P. 55–90.
- Vernoux T., Wilson R.C., Seeley K.A. et al. The *ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development // *Plant Cell.* 2000. V. 12. P. 97–110.
- Verma S., Dubey R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants // *Plan. Sci.* 2003. V. 64. P. 645–655.
- Zhang J., Kirkham M.B. Enzymatic responses of the ascorbate-glutathione cycle to drought in sorghum and sunflower plants // *Plant Sci.* 1996. V. 113. P. 139–147.

Effect of *D,L*-Buthionine-*S,R*-Sulfoximine on the Ratio of Glutathione Forms and the Growth of Tatar Buckwheat Calli

L. R. Nigmatullina, N. I. Rumyantseva, and Yu. A. Kostyukova

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, ul. Lobachevskogo 2/31, Kazan, Tatarstan, 420111 Russia

e-mail: nat_rumyantseva@mail.ru

Received May 7, 2013; in final form, September 9, 2013

Abstract—We studied the intracellular content of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione, glutathione reductase activity, glutathione-*S*-transferase, and ascorbate peroxidase in morphogenic and non-morphogenic Tatar buckwheat calli during the culture cycle as well as under the treatment with *D,L*-buthionine-*S,R*-sulfoximine (BSO), an inhibitor of γ -glutamylcysteine synthase, the first enzyme of glutathione biosynthesis. We found that, during passaging, cultures only slightly differed in total glutathione content; however, the content of GSH was higher in the morphogenic culture, whereas the content of GSSG was higher in the nonmorphogenic culture. In the morphogenic callus, the glutathione-*S*-transferase activity was 10–20 times higher and the glutathione reductase activity was 2–2.5 times lower than in the nonmorphogenic callus. Under the treatment with BSO, the decrease in the GSH content in the morphogenic callus was temporary (on day 6–8 of passage), whereas that in the nonmorphogenic callus decreased within a day and remained lower than in the control throughout the entire passage. In the morphogenic callus, BSO did not affect the content of GSSG, whereas it caused GSSG accumulation in the nonmorphogenic callus. These differences are probably due to the fact that, in the BSO-containing medium, glutathione reductase is activated in the morphogenic callus and, conversely, inhibited in the nonmorphogenic callus. Although BSO caused a decrease in the total glutathione content only in the nonmorphogenic culture, the cytostatic effect of BSO was more pronounced in the morphogenic callus. In addition, BSO also had a negative effect on the differentiation of proembryonic cell complexes in the morphogenic callus. The role of the glutathione redox status in maintaining the embryogenic activity of cultured plant cells is discussed.

Keywords: *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn., morphogenic callus, nonmorphogenic callus, GSH, GSSG, glutathione reductase, glutathione-*S*-transferase, *D,L*-buthionine-*S,R*-sulfoximine, somatic embryogenesis