



УДК 581.1

Развитие программируемой клеточной гибели в суспензионной культуре клеток озимой пшеницы *Triticum aestivum* (L.) при действии низкой положительной и отрицательной температур

И. В. Любушкина^{1,2}, О. И. Грабельных^{1,2}, Т. П. Побежимова^{1,2}, И. В. Федосеева¹,
А. В. Степанов¹, А. В. Федяева², Н. С. Павловская^{1,2}, Н. А. Королева¹,
В. К. Войников¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

²Иркутский государственный университет, Иркутск

Аннотация. Изучена возможность активации программируемой клеточной гибели (ПКГ) в суспензионной культуре клеток озимой пшеницы низкими положительными (4 и 8 °С) и отрицательной (-8 °С) температурами. Показано, что обработка температурой 8 °С способствует формированию механизмов низкотемпературной адаптации, в то время как температура 4 °С вызывает гибель клеток в культуре, которая усиливается после воздействия отрицательной температурой. Установлено, что процесс клеточной гибели сопровождается характерными признаками ПКГ, такими как конденсация протопласта и фрагментация ДНК.

Ключевые слова: программируемая клеточная гибель, суспензионная культура клеток, *Triticum aestivum*, низкая положительная температура, отрицательная температура, дегидрины, конденсация протопласта, дыхательная активность, фрагментация ДНК.

Введение

Программируемая клеточная гибель (ПКГ) – это генетически обусловленный процесс, присутствующий всем живым организмам [12; 27] и направленный на контролируемое и организованную ликвидацию лишних или поврежденных клеток. С тех пор, как в 1972 г. Дж. Керром с соавторами [15] были описаны морфологические особенности данного процесса, в этой области исследований достигнут значительный прогресс: на сегодняшний день ПКГ достаточно хорошо изучена у животных и появляется всё больше работ, посвященных изучению этого типа гибели у растений. Как и у животных, ПКГ в растительной клетке сопровождается рядом структурно-морфологических и биохимических изменений. К ним относятся: конденсация хроматина с последующим распадом ядра и межнуклеосомной фрагментацией ядерной ДНК, уплотнение и вакуолизация цитоплазмы, уменьшение клетки в объёме и отставание протопласта от клеточной стенки, переход фосфатидилсерина из внутреннего монослоя цитоплазматической мембраны в наружный, выход цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму, активация эндонуклеаз и каспазоподобных белков, образование активных форм

кислорода (АФК), сохранение целостности цитоплазматической мембраны до поздних стадий клеточной гибели, а также зависимость процесса гибели от уровня АТФ в клетке и синтеза белка *de novo* [2; 23]. Многочисленные работы, проведенные в последние годы, свидетельствуют о том, что у растений ПКГ является ключевым событием в реализации не только программы развития, но и функций иммунной системы, а также в реакции растительного организма на широкий спектр абиотических стрессоров: высоких температур, засухи, засоления и различных токсикантов [13; 14; 17; 18; 25; 26].

Имеющиеся в современной литературе данные по возможности индукции и развития ПКГ в условиях холодной обработки очень немногочисленны [9; 21]. В этих работах исследовалась возможность развития ПКГ при действии низких положительных температур. О способности отрицательных температур выступать индуктором ПКГ у растений в настоящее время неизвестно.

В связи с этим целью исследования явилось изучение условий активации ПКГ в суспензионной культуре озимой пшеницы при действии низких положительных температур и возможности развития ПКГ при действии отрицательной температуры.

Материалы и методы

В работе использовали суспензионную культуру клеток озимой пшеницы *Triticum aestivum* (L.), полученную из зрелых зародышей, выращиваемую при 26 °С на МС-среде [20], содержащей 3 % сахарозы; 1,0 мг/л тиамина; 0,5 мг/л пиридоксина; 0,5 мг/л никотиновой кислоты; 2,5 мг/л 2,4-Д; 0,01 % инозитола и 0,0005 % диэтилдитиокарбамата натрия. Культуру пересевали каждые 14 дней с разведением свежей средой в 3,5 раза. Для экспериментов использовали 8-суточную культуру, что соответствовало ранней экспоненциальной фазе, характеризующейся наибольшей физиологической активностью клеток. Культура на протяжении всего пассажа в контрольных условиях характеризовалась высокой жизнеспособностью (85–90 %), хотя имела довольно низкую скорость прироста биомассы: стационарная фаза начиналась на 21-е сутки культивирования. Суспензионную культуру клеток подвергали длительному воздействию низкой положительной температурой: 4 и 8 °С в течение 7 суток и кратковременному воздействию отрицательной температурой (-8 °С, 6 ч), по окончании которого помещали в контрольные условия (26 °С) на 3, 6 и 10 суток.

Жизнеспособность клеток культуры определяли с помощью красителя Эванса голубого (0,25 % раствор) через 0, 3, 6 и 10 суток после воздействия [8]. Количество окрашенных клеток и клеток с конденсированным протопластом подсчитывали на световом микроскопе Axiostar plus («Carl Zeiss», Германия). Подсчёт проводили в пяти полях, содержащих, по меньшей мере, 50 клеток. Каждый образец анализировали в трёх повторностях. Микрофотографии получали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver Z1 («Carl Zeiss», Германия) с цифровой монохромной камерой AxioCam MRm3 и пакетом программного обеспечения «AxioVision Rel.4.7.2».

Определение скорости поглощения кислорода клетками проводили полярографически при 26 °С, используя платиновый электрод закрытого типа в ячейке объемом 1,4 мл. В ячейку с культурой клеток последовательно добавляли 40 мкМ антимицин А (ингибитор III комплекса дыхательной цепи), 0,8 мМ цианид калия (ингибитор IV комплекса дыхательной цепи) и 2 мМ салицилгидроксамовую кислоту (ингибитор альтернативной оксидазы). Поглощение кислорода, оставшееся после добавле-

ния ингибиторов, считали неспецифическим и не принимали в расчёт дыхательной активности.

Для выделения суммарного белка и ДНК суспензионную культуру отфильтровывали и отщипывали по 1 г. Затем образцы ткани замораживали в жидком азоте и хранили при -70 °С. ДНК выделяли по методике [26] с некоторыми модификациями. Замороженные клетки растирали в жидком азоте, ресуспендировали в буфере экстракции (140 мМ сорбитол, 220 мМ трис-НСl, рН 8,0, 22 мМ ЭДТА, 800 мМ NaCl, 1 % саркозил, 0,8 % цетилтриметиламмоний бромид, 10 мМ β-меркаптоэтанол) и инкубировали при 65 °С в течение 15 мин. Нуклеиновые кислоты экстрагировали равным объемом смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24:1) при мягком покачивании 10 мин при комнатной температуре. Для осаждения дебриса и белков образцы центрифугировали 10 мин при 11500 g. Из супернатанта осаждали нуклеиновые кислоты равным объемом изопропанола в течение ночи при -20 °С с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 11500 g. Полученный осадок промывали 65%-, 70%-, 85%- и 90%-ным этанолом, высушивали и перерастворяли в буфере TE, содержащем 10 мМ трис-НСl (рН 7,5) и 1 мМ ЭДТА. Затем инкубировали с РНКазой А («Fermentas», Латвия) 2 ч при 37 °С. Очистку ДНК проводили экстракцией смесью фенол/хлороформ (1:1) и хлороформом. Из водной фазы ДНК осаждали двумя объемами 96%-ного этанола в присутствии ацетата калия. После центрифугирования (15 мин, 11500 g) полученный осадок дважды промывали 70%-ным этанолом. Осадок высушивали и перерастворяли в буфере TE. Одинаковые количества ДНК разделяли электрофоретически в 1,5%-ном агарозном геле. Гель окрашивали бромистым этидием (0,5 мг/л) и фотографировали в УФ-свете с помощью GelDoc («BioRad», США).

При выделении суммарного белка клетки ресуспендировали в буфере для выделения белка (0,1 М Трис-НСl, 0,003 М ДДС-Na, 0,001М β-меркаптоэтанол, рН 7,4–7,6), в соотношении 1:4, добавляли 0,5–1 мМ фенолметилсульфонилфлюорид для ингибирования протеаз, замораживали жидким азотом и растирали с кварцевым песком. Грубые клеточные компоненты удаляли центрифугированием при 15000 g в течение 15 мин. Белок из супернатанта осаждали трехкратным объемом охлажденного ацетона. Осадок белка растворяли в буфере для образца (0,625 М Трис-НСl, 0,008 М ДДС-Na, 0,1 М β-меркаптоэтанол, 10 % глицерин,

0,001 % бромфеноловый синий, рН 6,8), инкубировали 5 мин при 100 °С, центрифугировали 15 мин при 5000 g. Концентрацию белка определяли по методу О. Лоури [22]. Белки фракционировали электрофоретически в 12,5%-ном ПААГ с ДДС-Na в модифицированной системе Laemmli [16], используя прибор Mini-PROTEAN III Electrophoretic Cell («BIO-RAD», США). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану («Sigma», США) проводили в приборе Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell («BIO-RAD», США) по прилагаемой инструкции. В работе использовали антитела против дегидринов (любезно предоставлены Т. Клоузом, США).

Данные обработаны статистически с использованием MS Excel. Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа [3].

Результаты и обсуждение

В настоящее время многие параметры ПКГ, как структурно-морфологические, так и биохимические, используются для доказательства активного характера гибели клеток. Межнуклеосомная фрагментация ДНК и определение каспазной (каспазо-подобной) активности занимают ведущее место в исследованиях по изучению ПКГ как у животных, так и у растений [2]. Однако развитие ПКГ не всегда сопровождается фрагментацией ДНК и может протекать без участия каспаз [11]. Поэтому судить о характере гибели можно лишь по совокупности нескольких параметров: как биохимических, так и структурно-морфологических. Микроскопические исследования морфологии клетки при развитии ПКГ у растений выявляют такие особенности активного процесса гибели, как конденсация протопласта [23; 24] и разрушение ядер с сохранением клеточной стенки [4]. В то же время важным биохимическим подтверждением активного характера гибели может служить, например, энергообеспеченность клетки, зависящая от интенсивности дыхания.

В нашей работе основное внимание было сосредоточено на выявлении различий при действии низких положительных температур разной интенсивности на физиологическое состояние клетки, что в конечном счёте приводило либо к формированию эффективных механизмов низкотемпературной адаптации, позволяющих клеткам противостоять последующему жёсткому стрессовому воздействию, либо к активной гибели клеток, которая ускорялась при дальнейшей обработке отрицательной температурой.

Известно, что в основе всех адаптивных преобразований, которые происходят в клетке, как на уровне ферментативных процессов, так и на уровне структурных изменений лежит синтез белков холодового шока, гены которых экспрессируются под действием низкой адаптирующей температуры [6]. В частности, к белкам холодового шока относятся дегидрины, служащие факторами защиты от деградации макромолекул клеточных структур при обезвоживании [1; 6]. В ходе наших исследований показано, что обработка суспензионной культуры озимой пшеницы разными по интенсивности низкими положительными температурами (4 и 8 °С) приводила к накоплению дегидринов (рис. 1), что свидетельствует о формировании механизмов низкотемпературной адаптации. После длительного экспонирования при данных температурах (7 суток) были обнаружены белки с молекулярной массой 61, 52,5 и 47 кДа, при этом наиболее значительным было содержание белка с молекулярной массой 52,5 кДа (рис. 1).

Однако, несмотря на то, что накопление стрессовых белков происходило и при 4 °С, и при 8 °С, реакция суспензионных культур, закаливавшихся при разных температурах, на перемещение их в контрольные условия и последующую обработку отрицательной температурой значительно различалась. Так, во время обработки культуры при 8 °С погибали около 15 % клеток, а на протяжении последующих десяти суток экспонирования при температуре 26 °С дальнейшей гибели клеток не происходило (рис. 2, А). В пользу эффективности закаливания свидетельствует и тот факт, что последующий холодовой шок (обработка отрицательной температурой, XIII) не вызывал массовой гибели клеток, и на протяжении всего эксперимента доля живых клеток в культуре, подвергнутой предварительному закаливанию при 8 °С, а затем холодовому шоку, была лишь на 10–15 % меньше, чем в контроле (см. рис. 2, А). По сравнению с контрольной культурой, обработка которой отрицательной температурой вызывала гибель 15 % клеток во время экспонирования и ещё 45 % после перемещения культуры в контрольные условия (см. рис. 2, А), в культуре, закаленной длительной экспозицией при 8 °С, отчетливо проявились защитные механизмы, позволившие клеткам успешно противостоять жёсткому стрессированию.

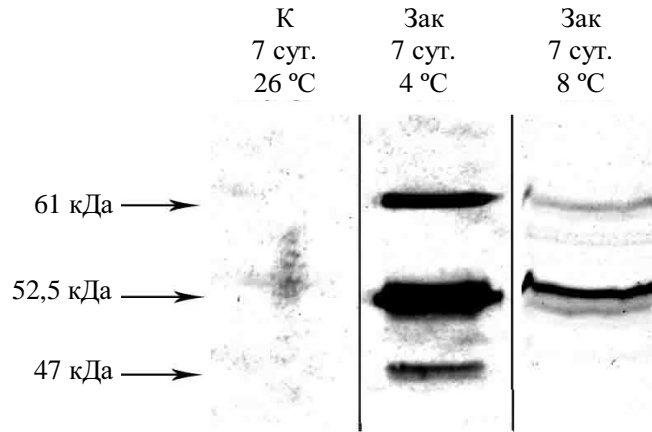


Рис. 1. Изменение содержания дегидринов в клетках суспензионной культуры озимой пшеницы под действием низкой положительной температуры (иммуноблоттинг с антителами против дегидринов). К – контрольная культура, выращенная при 26 °C в течение семи суток; Зак – культура, подвергнутая холодовому закаливанию (4 или 8 °C) в течение семи суток

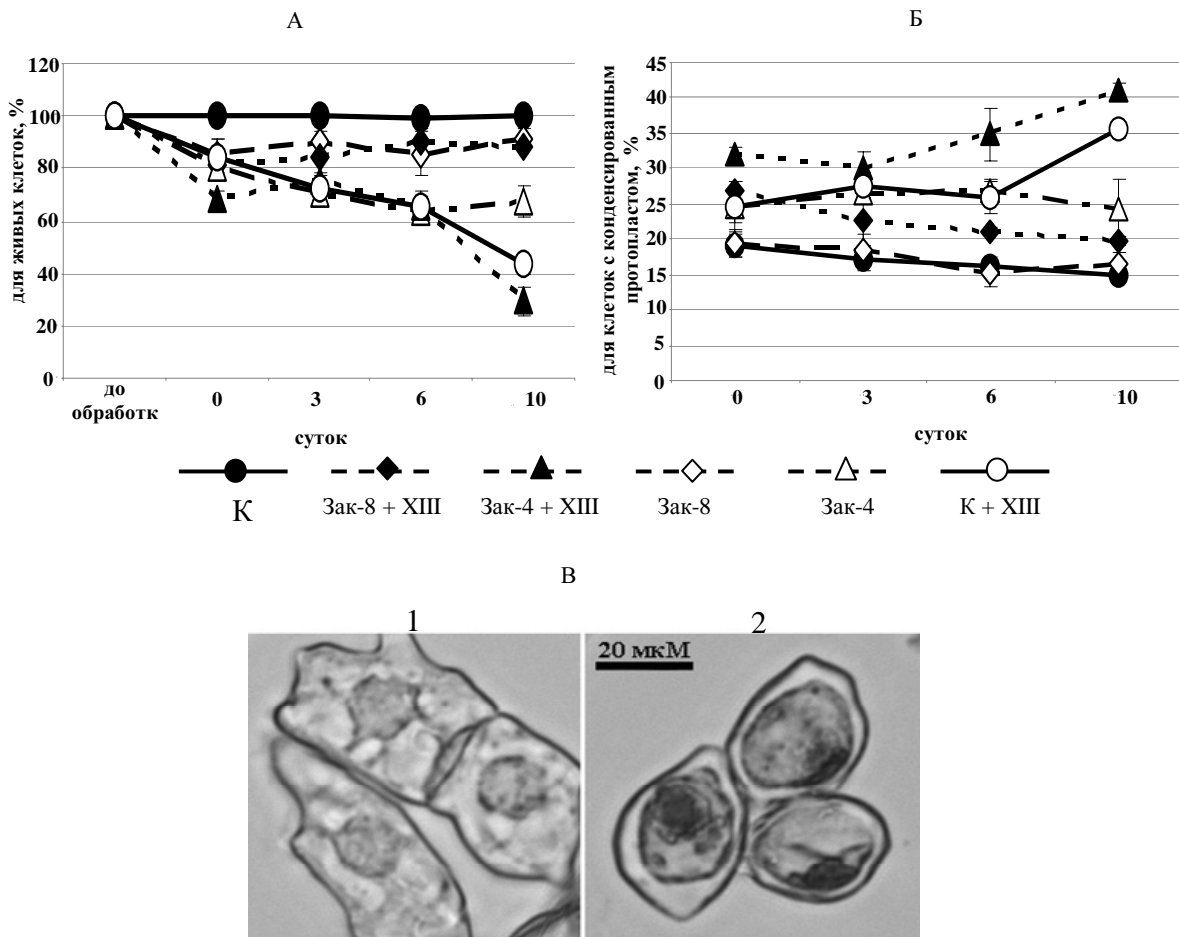


Рис. 2. Влияние низкотемпературной обработки на динамику гибели и процесс конденсации протопласта клеток суспензионной культуры озимой пшеницы. А – динамика гибели клеток; Б – процесс конденсации протопласта клеток после стрессовой обработки; В – микрофотографии клеток озимой пшеницы в светлом поле: 1 – живые клетки, 2 – клетки с конденсированным протопластом. К – контрольная культура, выращенная при 26 °C в течение семи суток; Зак – культура, подвергнутая холодовому закаливанию (4 или 8 °C) в течение 7 суток; ХШ – холодовой шок (-8 °C, 6 ч). $M \pm m$, $n = 3-6$

В связи с этим можно предположить, что метаболическое состояние клеток определяет их дальнейшее существование (путь гибели или способность к адаптации). Известно, что на первых этапах процесс ПКГ является обратимым, поэтому после помещения культуры в нормальные условия в течение первых шести суток погибают только те клетки, у которых развитие ПКГ уже прошло «точку невозврата», а те, у которых сформировались механизмы адаптации или развитие ПКГ находилось на обратимых начальных стадиях, постепенно возвращаются к нормальной жизнедеятельности [10].

В то же время следует отметить постепенный, протяжённый во времени характер гибели клеток, вызванной обработкой низкой положительной и отрицательной температурами. Данный процесс, как можно видеть из рис. 2, А, развивался в течение нескольких суток, и, главным образом, не во время жёсткой стрессовой обработки, а после неё, что и позволило нам предположить активный характер гибели клеток суспензионной культуры.

Таким образом, проявился один из важных параметров, характеризующих активную, генетически запрограммированную гибель клеток – развитие процесса во времени. Известно, что ПКГ у растений является более медленным процессом, чем у животных и развивается в течение нескольких часов, но редко занимает период больше суток [2; 23]. В наших экспериментах процесс гибели клеток занимал ещё больше времени – до десяти суток после обработки. Скорее всего, это связано с особенностями используемых в работе стрессовых факторов: низкой положительной и отрицательной температур.

Как свидетельствуют многочисленные публикации, ПКГ и у растений, и у животных зависит от активности большого числа ферментов, тесно связана с синтезом белка и АТФ [19; 28]. Однако при работе с отрицательными температурами или температурами, близкими к 0 °С, происходит денатурация значительной части ферментов в клетке вследствие снижения гидрофобного давления, обеспечивающего их функциональную активность: в частности, происходит распад АТФ-синтазного комплекса, обеспечивающего клетки необходимой для всех процессов энергией [5]. Следует отметить, что при холодной денатурации у белков наблюдается формирование не «расплавленной» глобулы, как в случае тепловой денатурации, а «вскипание» белка, и восстановление после холодной обработки нарушенных связей в пространственной структуре занимает большой

период времени вследствие более значительных повреждений в белковой молекуле [7], чем и объясняется более медленное протекание процесса гибели в наших экспериментах. Однако представляется интересным, что в работе В. Koukalová с соавторами [9] была показана возможность развития ПКГ при обработке культуры клеток табака низкой положительной температурой в течение пяти недель, т. е. на протяжении ещё более длительного промежутка времени.

В дальнейшем были изучены некоторые наиболее важные структурно-морфологические и биохимические особенности развития ПКГ в суспензионной культуре клеток озимой пшеницы: конденсация протопласта и фрагментация ДНК.

Сокращение клетки в объёме, конденсация протопласта и отставание его от клеточной стенки являются одним из часто используемых в исследованиях признаков ПКГ [23], поскольку подобные изменения в структуре клетки легко наблюдать в световой микроскоп (рис. 2, В). В наших экспериментах доля клеток с конденсированным протопластом в суспензионной культуре, закаливавшейся при 8 °С, оставалась на уровне контроля, в то время как после обработки при температуре 4 °С гибель клеток сопровождалась увеличением данного параметра на 15–18 % (рис. 2, Б). Последующее содержание при отрицательной температуре приводило к усилению конденсации протопласта как в контрольной культуре клеток, так и в культуре, предварительно закаливавшейся при 4 °С (см. рис. 2, Б), что согласуется с полученными ранее данными по динамике гибели клеток после низкотемпературной обработки: наиболее активный процесс гибели наблюдался при обоих типах обработки (см. рис. 2, А).

Изучение активности дыхания клеток суспензионной культуры озимой пшеницы показало, что усиление дыхания, свидетельствующее об интенсивной стрессовой нагрузке, происходило лишь после обработки культуры при температуре 4 °С, а также в результате последующего воздействия отрицательной температуры (рис. 3). Обработка культуры клеток при температуре 8 °С, как и последующий холодовой шок, не вызывали усиления поглощения кислорода клетками (см. рис. 3).

Полученные результаты говорят о том, что для формирования механизмов низкотемпературной адаптации температура 8 °С являлась более эффективной, поскольку последующий холодовой шок не вызывал гибели клеток и практически не влиял на интенсивность дыхания (см. рис. 2 и 3).

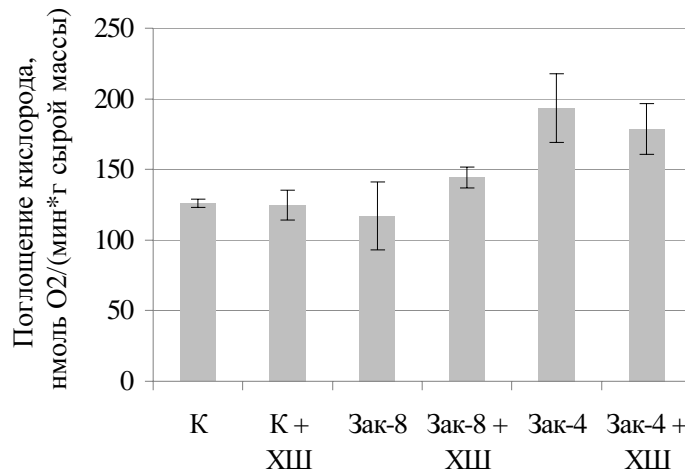


Рис. 3. Влияние низкотемпературной обработки на скорость дыхания клеток суспензионной культуры озимой пшеницы. Обозначения см. рис. 2. $M \pm m$, $n=3-6$

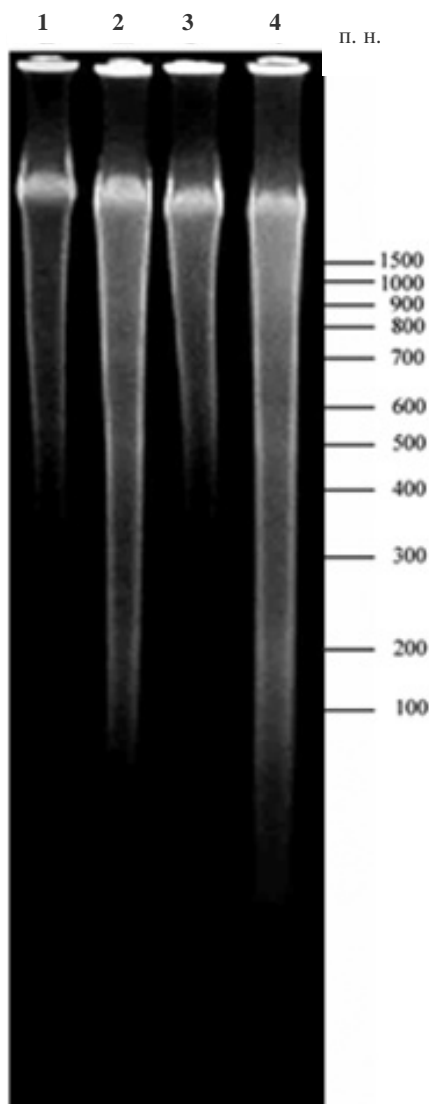


Рис. 4. Электрофореграмма ДНК, выделенной из суспензионной культуры клеток озимой пшеницы. 1 – ДНК из контрольной культуры, выращенной

при 26 °С в течение 17 суток; 2 – ДНК из контрольной культуры, подвергнутой последующей обработке отрицательной температурой (-8 °С, 6 ч) и последующей инкубации при 26 °С в течение 10 суток; 3 – ДНК из культуры, подвергнутой холодovому закаливанию при 4 °С в течение 7 суток и последующей инкубации при 26 °С в течение 10 суток; 4 – ДНК из закаленной при 4 °С культуры, подвергнутой последующей обработке отрицательной температурой (-8 °С, 6 ч) и последующей инкубации при 26 °С в течение 10 суток; М – маркеры молекулярного веса ДНК, п. н

Однако особенно интересным представляется тот факт, что на протяжении всего процесса гибели клеток скорость дыхания клеток суспензионной культуры озимой пшеницы сохранялась на высоком уровне (данные не представлены). Поскольку ПКГ – это энергетически зависимый процесс, то дыхание должно сохраняться на высоком уровне до последних стадий гибели, что и наблюдалось в экспериментах при использовании низкой положительной температуры 4 °С с последующим холодovым шоком.

Окончательным доказательством того, что процесс гибели клеток в суспензионной культуре озимой пшеницы относится к ПКГ, явилась фрагментация (деградация) ДНК (рис. 4). Фрагментация хроматина является одним из главных проявлений апоптоза, её основой служит ферментативное расщепление ДНК вначале на более крупные фрагменты (700, 200–250 тыс. пар нуклеотидов (п. н.)), затем с каждым этапом на все более мелкие (50–70, 30–50 тыс. п. н.) [2]. На электрофореграммах в результате такого расщепления ДНК образуется так называемая «лестница» (см. рис. 4).

Заключение

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что низкая положительная температура может являться не только необходимым условием для формирования механизмов низкотемпературной адаптации, но и фактором для активации ПКГ в суспензионной культуре клеток озимой пшеницы. При этом ПКГ в условиях пониженных температур является достаточно длительным процессом, который сопровождается характерными для данного типа гибели структурно-морфологическими и биохимическими изменениями.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке проектов РФФИ (№ 08-04-01037, №10-04-00921) и молодёжного проекта СО РАН.

Литература

1. Белки низкотемпературного стресса растений / В. К. Войников [и др.]. – Иркутск : Изд-во Ин-та географии СО РАН, 2004. – 129 с.
2. Ванюшин Б. Ф. Апоптоз у растений / Б. Ф. Ванюшин // Успехи биол. химии. – 2001. – Т. 41. – С. 3–38.
3. Лакин Г. Ф. Биометрия : учеб. пособие для биол. спец. вузов. / Г. Ф. Лакин. – М. : Высш. шк., 1990. – 352 с.
4. Программируемая клеточная смерть у растений: действие ингибиторов синтеза белка и структурные изменения в устьичных клетках гороха / Е. В. Дзюбинская [и др.] // Биохимия. – 2006. – Т. 71. – С. 493–504.
5. Сердюк И. Методы в молекулярной биофизике : структура, функция, динамика : учеб. пособие : в 2 т. / И. Сердюк, Н. Закаи, Дж. Закаи. – М. : КДУ, 2009. – Т. 1 – 568 с.
6. Трунова Т. И. Растение и низкотемпературный стресс / Т. И. Трунова. – М. : Наука, 2007. – 54 с.
7. Финкельштейн А. И. Физика белка / А. И. Финкельштейн, О. Б. Птицын. – М. : КДУ, 2005. – 456 с.
8. Baker C. J. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disk assay using Evans blue / C. J. Baker, N. M. Mock // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1994. – Vol. 39. – P. 7–12.
9. Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress / V. Koukalová [et al.] // FEBS Lett. – 1997. – Vol. 414. – P. 289–292.
10. Early stages of the apoptotic pathway in plant cells are reversible / I. E. W. O'Brien [et al.] // Plant J. – 1998. – Vol. 13. – P. 803–814.
11. Ferri K. F. Mitochondria – the suicide organelles / K. F. Ferri, G. Kroemer // BioEssays. – 2001. – Vol. 23. – P. 111–115.
12. From plants to animals; the role of plant cell death in ruminant herbivores / A. H. Kingston-Smith [et al.] // J. Exp. Bot. – 2008. – Vol. 59. – P. 521–532.
13. Heath M. C. Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response / M. C. Heath // European J. Plant Pathology. – 1998. – Vol. 104. – P. 117–124.
14. Jones A. M. Programmed cell death in development and defense / A. M. Jones // Plant Physiol. – 2001. – Vol. 125. – P. 94–97.
15. Kerr J. F. R. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics / J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie // Br. J. Cancer. – 1972. – Vol. 26. – P. 239–257.
16. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
17. Lin J. Salt stress-induced programmed cell death via Ca²⁺-mediated mitochondrial permeability transition in tobacco protoplasts / J. Lin, Y. Wang, G. Wang // Plant Growth Regulation. – 2005. – Vol. 45. – P. 243–250.
18. Malerba M. Fusicoccin induces in plant cells a programmed cell death showing apoptotic features / M. Malerba, R. Cerana, P. Crosti // Protoplasma. – 2003. – Vol. 222. – P. 113–116.
19. Morohashi Y. Appearance of alternative respiration in cucumber cotyledon mitochondria after treatment with cycloheximide / Y. Morohashi, T. Seto, T. Matsushima // Physiol. Plantarum. – 1991. – Vol. 83. – P. 640–646.
20. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Scoog // Physiol. Plantarum. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
21. Ning S.-B. Characterization of the early stages of programmed cell death in maize root cells by using comet assay and the combination of cell electrophoresis with annexin binding / S.-B. Ning, Y.-C. Song, P. Van Damme // Electrophoresis. – 2002. – Vol. 23. – P. 2096–2102.
22. Protein measurement with folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
23. Reape T. J. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes / T. J. Reape, E. M. Molony, P. F. McCabe // J. Exp. Bot. – 2008. – Vol. 59. – P. 435–444.
24. Reape T. J. Apoptotic programmed cell death in plants / T. J. Reape, P. F. McCabe // New Phytologist. – 2008. – Vol. 180. – P. 13–26.
25. Sorting out the role of reactive oxygen species during plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure / C. Gao [et al.] // Plant Signaling Behavior. – 2008. – Vol. 3. – P. 197–198.
26. Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells / I. Duval [et al.] // Planta. – 2005. – Vol. 222. – P. 820–831.

27. The programme of cell death in plants and animals – a comparison / K. V. Krishnamurthy [et al.] // *Cur. Science.* – 2000. – Vol. 79. – P. 1169–1181.

28. Williams B. Plant programmed cell death: can't live with it; can't live without it / B. Williams,

M. Dickman // *Mol. Plant Path.* – 2008. – Vol. 9. – P. 531–544.

The programmed cell death in suspension cell culture of winter wheat *Triticum aestivum* (L.) under low and subzero temperature

I. V. Lyubushkina^{1,2}, O. I. Grabelnych^{1,2}, T. P. Pobezhimova^{1,2}, I. V. Fedoseeva¹, A. V. Stepanov¹, A. V. Fedyaeva², N. S. Pavlovskaya^{1,2}, N. A. Koroleva¹, V. K. Voinikov¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

²Irkutsk State University, Irkutsk

Abstract. The possibility of activating programmed cell death in suspension culture of winter wheat with low temperatures (4 и 8 °C) and temperature subzero (-8 °C) has been investigated. It has been shown, that treatment with the temperature 8 °C promoted to forming of adaptation mechanisms, whereas the temperature 4 °C led to cell death in suspension culture, which has been increased after treatment with the temperature below zero. It has been established, that process of death has been accompanied by protoplast condensation, decreasing of respiration activity and DNA fragmentation.

Key words: programmed cell death, suspension cell culture, *Triticum aestivum*, low temperature, temperature below zero, dehydrins, protoplast condensation, respiratory activity, DNA fragmentation.

Любушкина Ирина Викторовна
Иркутский государственный университет
664003, Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5
ведущий инженер
тел. (395 2) 24–18–55
E-mail: estel_86@mail.ru

Lyubushkina Irina Victorovna
Irkutsk State University
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003
leading engineer
phone: (3952) 24-18-55
E-mail: estel_86@mail.ru

Грабельных Ольга Ивановна
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
кандидат биологических наук,
научный сотрудник
тел. (3952) 42–46–59, факс (3952) 51–07–54,
E-mail: grolga@sifibr.irk.ru

Grabelnych Olga Ivanovna
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033
Ph. D. of Biology, research scientist
phone: (3952) 42–46–59, fax: (3952) 51–07–54
E-mail: grolga@sifibr.irk.ru

Побежимова Тамара Павловна
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
доктор биологических наук, старший научный сотрудник
тел. (3952) 42–46–59, факс (3952) 51–07–54,
E-mail: pobezhimova@sifibr.irk.ru

Pobezhimova Tamara Pavlovna
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
D. Sc. in Biology, senior research scientist
phone: (3952) 42–46–59, fax: (3952) 51–07–54
E-mail: pobezhimova@sifibr.irk.ru

Федосеева Ирина Владимировна
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
младший научный сотрудник
тел. (3952) 42–46–59, факс (3952) 51–07–54,
E-mail: fedoseeva@sifibr.irk.ru

Fedoseeva Irina Vladimirovna
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
junior research scientist
phone: (3952) 42–46–59, fax: (3952) 51–07–54
E-mail: fedoseeva@sifibr.irk.ru

Степанов Алексей Владимирович
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
кандидат биологических наук, младший научный
сотрудник
тел. (3952) 42-46-59, факс (3952) 51-07-54,
E-mail: stepanov@sifibr.irk.ru

Федяева Анна Валерьевна
Иркутский государственный университет
664003, Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5
студент
тел. (395 2) 24-18-55
E-mail: fedyaeva.anna@mail.ru

Павловская Наталья Сергеевна
Иркутский государственный университет 664003,
Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5
кандидат биологических наук, доцент
тел. (3952)
E-mail: pavnatser@mail.ru

Королева Нина Анатольевна
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
ведущий инженер
тел. (3952) 42-46-59, факс (3952) 51-07-54,
E-mail: malus-55@mail.ru

Войников Виктор Кириллович
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
доктор биологических наук, директор института
тел. (3952) 42-46-59, факс (3952) 51-07-54,
E-mail: vvk@sifibr.irk.ru

Stepanov Alexey Vladimirovitch
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
Ph. D. of Biology, junior research scientist
phone: (3952) 42-46-59, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: stepanov@sifibr.irk.ru

Fedyaeva Anna Valerievna
Irkutsk State University
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003
student
phone: (3952) 24-18-70
E-mail: fedyaeva.anna@mail.ru

Pavlovskaya Natalya Sergeevna
Irkutsk State University
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003
Ph. D. of Biology, ass. prof.
phone: (3952) 24-18-70
E-mail: pavnatser@mail.ru

Koroleva Nina Anatolyevna
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
leading engineer
phone: (3952) 42-46-59, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: malus-55@mail.ru

Voinikov Victor Kirillovitch
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
D. Sc. in Biology, Director of the Institute
phone: (3952) 42-67-21, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: vvk@sifibr.irk.ru