

УДК 581.143.6

ОСМОРЕГУЛЯЦИЯ Cd-УСТОЙЧИВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ТАБАКА И ИХ РЕГЕНЕРАНТОВ В УСЛОВИЯХ ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА *in vitro*

Л. Е. Сергеева
Л. И. Бронникова
Е. Н. Тищенко

Институт физиологии растений и генетики
НАН Украины, Киев

E-mail: oltyko@gmail.com

Решение проблемы стресс-устойчивости к продолжительному водному дефициту требует создания новых биотехнологических методов. Перспективным направлением является клеточная селекция с использованием ионов тяжелых металлов. Клеточные линии, отобранные на селективных средах с ионами тяжелых металлов и их растения-регенеранты отличаются комплексной устойчивостью.

Определяли содержание свободного пролина у клеточных культур и растений табака при культивировании на средах с летальными дозами маннита. В норме уровень пролина в клетках Cd-устойчивых генотипов и контроля был невысокий. Его динамика в растущем каллусе и листьях растений соответствовала основным показателям организма. В условиях стресса содержание пролина у всех генотипов возрастало. В контроле в клетках каллуса в пределах пассажа этот параметр не изменялся, а в листьях — был стабильным до 14-го и падал к 21-му дню. Высокий пул внутриклеточного пролина создавался вследствие деградации клеточных компартментов, что приводило к гибели контроля. У устойчивых линий в этих условиях содержание пролина было выше, чем у дикого типа, отмечались также его колебания как в клетках каллуса, так и листьев. Аккумуляция/убыль пролина свидетельствует о его активном метаболизме. Предполагается участие пролина в осморегуляции Cd-устойчивых линий табака и регенерантов при культивировании в условиях осмотического стресса *in vitro*.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum* L., ионы кадмия, клеточные линии, регенеранты, осмотический стресс, устойчивость, пролин.

До настоящего времени засуха остается постоянным препятствием, существенно ограничивающим урожайность. Потребность в растениях, резистентных к продолжительному осмотическому стрессу, возрастает. Для решения этой задачи совершенствуются апробированные и создаются новые биотехнологии. С целью отбора устойчивых форм нами была предложена идея использовать ионы тяжелого металла кадмия (Cd^{2+}). Методом клеточной селекции были отобраны линии табака, устойчивые к летальным концентрациям Cd^{2+} . Из длительно культивируемых Cd-устойчивых клеточных вариантов регенерированы растения. Каллус и растения культивировали в условиях моделированного стресса *in vitro*.

Осмотический стресс, возникающий вследствие обезвоживания, развивается как цепь отрицательных изменений, вызывающих видимые нарушения водного статуса и роста. На клеточном уровне отмечается сни-

жение осмотического потенциала, активности систем ионного поглощения и переноса [1]. Для ослабления негативного эффекта в клетках происходит активная аккумуляция соединений, которые способствуют поддержанию/сохранению осмотического баланса цитоплазмы [2]. К таким соединениям относятся: полиамины, глицинбетаин, D-онитол, фруктаны, пролин. Особый интерес вызывает пролин (Pro), поскольку эта аминокислота имеет собственную систему метаболизма [3]. В растениях пролин синтезируется из глутамата (Glu) или орнитина. Биосинтез из глутамата — основной путь образования данной аминокислоты при осмотическом стрессе. Цепь превращений Glu-Pro объединяет ряд промежуточных продуктов: γ -глутамилфосфат, глутамат- γ -семиальдегид (GSA) и Δ^1 -пирролин-5-карбоксилат, катализируемых двумя ферментами: Δ^1 -пирролин-5-карбоксилатсинтетазой (P5CS) и Δ^1 -пирролин-5-карбоксилатредук-

тазой (P5CR) [2]. Аккумуляция пролина наблюдается не только у растений, но и у простейших, беспозвоночных, некоторых бактерий [4, 5]. Отмечена корреляция между повышенным синтезом пролина и устойчивостью к осмотическим стрессам.

Так, трансгенные растения пшеницы, отличающиеся высоким содержанием пролина, демонстрировали повышенную устойчивость к солевому стрессу [6]. Свехэкспрессия генов *NtHAL3* приводила к увеличению синтеза пролина и повышению устойчивости к солевому и осмотическому стрессам, а также к ионам лития [7]. У фасоли обыкновенной при водном дефиците в растворимой фракции клеточных стенок аккумуляровались два богатых пролином гликопротеида — P³³ и P³⁶, способных образовывать олигомер с М.м. 240 кД. Предполагают, что такие модификации индуцируются в активно растущих клетках в ответ на лимитирование воды [8].

Анализ каллусных культур и проростков горчицы выявил сопряженность между содержанием пролина и уровнем устойчивости к ионам кадмия [9]. Ранее нами на селективных средах, содержащих летальные дозы ионов кадмия, были отобраны устойчивые клеточные линии табака [10]. Из устойчивых линий регенерировали растения. И клеточные культуры, и растения-регенеранты отличались устойчивостью к моделированному *in vitro* водному стрессу. В связи с этим представлялось актуальным исследовать роль пролина в их устойчивости.

Материалы и методы

Устойчивые клеточные линии табака (*Nicotiana tabacum* L.) до начала эксперимента культивировали на селективных средах, содержащих летальные для клеточных культур дозы ионов кадмия. Регенеранты выращивали *in vitro* на питательной среде Мурасиге–Скуга без регуляторов роста [11]. В культуре *in vitro* моделировали осмотический стресс, добавляя в среду маннит в концентрации 0,8 М для клеточных культур и 0,5 М для растений. Осмотики *in vitro* в первую очередь воздействуют на водный баланс клеток, показателями которого являются тургор и рост (растяжение клеток). Выбранные концентрации, как было установлено прежде, вызывали гибель контроля вследствие обезвоживания. На селективные среды с маннитом переносили каллус и растения без корней. Пролин определяли в каллусной массе и листьях растений в динамике на 7-й, 14-й, 21-й дни опыта. Для ус-

тойчивых клеточных культур — это период максимальной активности, стадии роста и растяжения; у устойчивых растений шел процесс корне- и побегообразования.

Свободный пролин определяли по модифицированной методике Чинарда [12]. Установленную навеску растительной ткани растирали в 10 мл 3,0% -го раствора сульфосалициловой кислоты для осаждения протеинов. Гомогенат фильтровали. К 2,0 мл фильтрата приливали 2,0 мл нингидринового реактива, приготовленного без нагревания (1,25 г нингидрина, 30 мл ледяной уксусной кислоты, 20 мл 6 М раствора H₃PO₄), и 2,0 мл ледяной уксусной кислоты. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч на водяной бане при 100 °С. По окончании смесь быстро охлаждали до комнатной температуры, переносили в делительную воронку с 4,0 мл толуола и встряхивали. Верхний окрашенный слой (хромофор) колориметрировали против толуола при длине волны λ = 520 нм. Калибровочную кривую строили по кристаллическому пролину. Содержание пролина (мг% /на сырую массу) рассчитывали по формуле:

$$a \cdot c \cdot v \cdot 100 / a^1 \cdot v^1 \cdot n \cdot 1000,$$

где *a* — экстинкция опытного раствора, *a*¹ — экстинкция стандарта, *c* — концентрация стандарта (мкг), *v* — разведение (10 мл), *n* — навеска, *v*¹ — объем, взятый для цветной реакции (2,0 мл), 100 — расчет в %, 1000 — перевод в мг.

Измерения проводили в трехкратной биологической и двукратной аналитической повторностях. Данные представлены как средние значения ± стандартные отклонения. Контролем служили клеточные культуры и растения табака сорта Дюбек. Достоверность между показателями дикого типа и устойчивых вариантов не представляли, поскольку в условиях действия летальных концентраций стрессоров изменения уровня пролина являются отражением выживаемости устойчивых особей.

Результаты и обсуждение

Клеточные линии табака, устойчивые к катионам кадмия, и полученные из них растения испытывали в условиях моделированного водного стресса *in vitro*. На фотографиях 1, А, Б и 2 представлены устойчивые и контрольные клеточные культуры и растения, тестируемые в эксперименте: на 21-й день проявляются различия между генотипами.

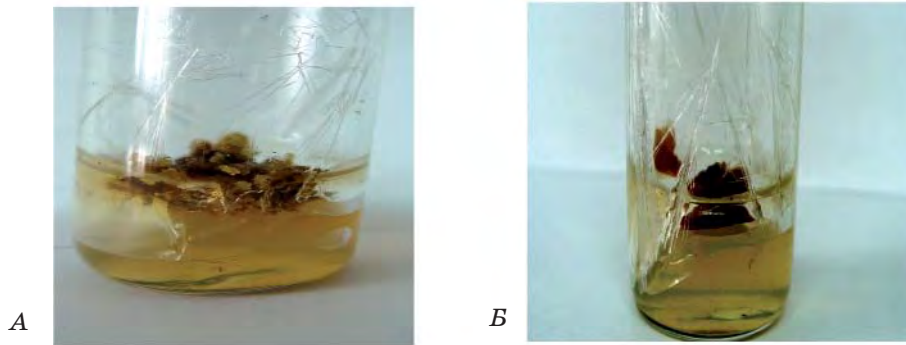


Фото 1. Клеточные культуры табака, культивированные на среде с летальной концентрацией маннита: А — Cd-устойчивая клеточная линия; Б — контроль



Фото 2. Растения-регенеранты табака, культивированные на среде с летальной концентрацией маннита:

А — регенерант из Cd-устойчивой клеточной линии; Б — контроль

Осмотический стресс *in vitro* ингибирует рост многих культур. В суспензионной культуре клеток моркови с уменьшением водного потенциала отмечали снижение сырой и сухой массы неадаптированных клеток [13]. У гетеротрофных и фотомиксотрофных каллусов сосны водный стресс (особенно при водном потенциале $-2,5$ МПа) также вызывал торможение роста и уменьшение клеточного объема [14].

Между устойчивыми и неустойчивыми формами проявлялись различия и в содержании свободного пролина (рис. 1, 2). Диаграммы отражают динамику колебаний уровня пролина в клетках каллуса и растений в течение пассажа. При культивировании в оптимальных условиях содержание пролина в клетках всех генотипов было невысоким (рис. 1, а, б, в). Абсолютные значения количества свободного пролина в клеточных культурах и листьях растений существенно не различались. Амплитуда колебаний измеряемого параметра также была незначительной. Снижение содержания пролина в каллусе на 21-й день (особенно отчетливо выражено у устойчивой

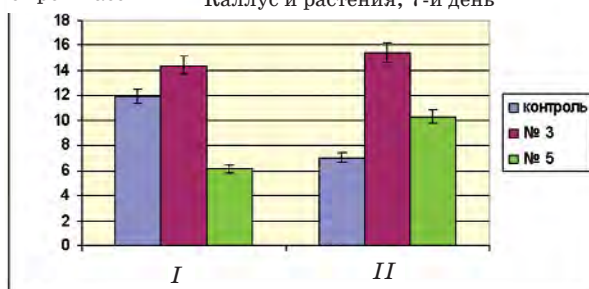
линии Д. № 3) — закономерное явление при убывании трофических ресурсов среды, возникающем вследствие активного клеточного роста, и ослабевании метаболической активности в клетках стареющей культуры.

Иная картина отмечалась при тестировании генотипов на селективных средах: содержание пролина в клетках возрастало и превышало показатели, измеренные в нормальных условиях (рис. 2, а, б, в). При этом у устойчивых линий Д. №3 и Д. №5 уровень свободного пролина в клетках и каллуса, и листьев был выше, чем в неустойчивых клетках контроля.

Аккумуляция свободного пролина в ответ на снижение осмотического потенциала является одной из наиболее эффективных защитных реакций. При осмотическом стрессе пролин может одновременно выступать как соединение: а) регулирующее внутриклеточный осмотический потенциал; б) контролирующее рН цитоплазмы; в) стабилизирующее структуру клеточных мембран [15].

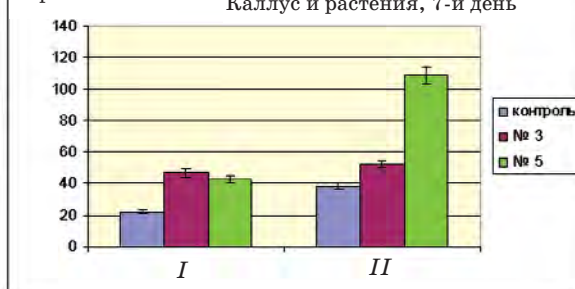
В то же время накопление пролина может быть следствием разнонаправленных процессов: повышения биосинтеза; снижения деградации; изменения транспорта; разложения обогащенных пролином протеинов [16–18]. Первые два процесса возможны в случае активного метаболизма клеток, адаптации к окружающим стрессовым условиям. Следствием этих событий будут жизнеспособность, устойчивость генотипа. Так, у трансформированных растений табака, характеризующихся конститутивной сверхэкспрессией гена энзима биосинтеза пролина Δ^2 -пирролин-5-карбоксилат синтетазы (*P5CSF129A*), отмечали значительное увеличение синтеза пролина, совпадающее со снижением осмотического потенциала в клетках листьев [19]. Поскольку линии Д. № 3 и Д. № 5 отличались устойчивостью к летальным концентрациям маннита, можно

Пролин, мг% / г сырой массы Каллус и растения, 7-й день



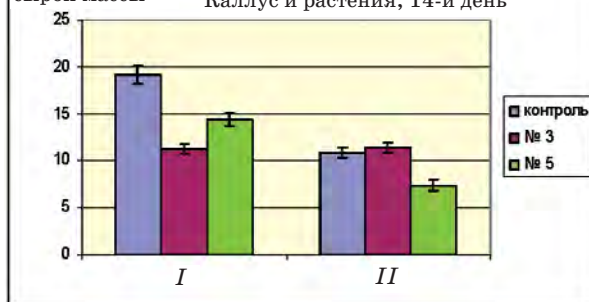
a

Пролин, мг% / г сырой массы Каллус и растения, 7-й день



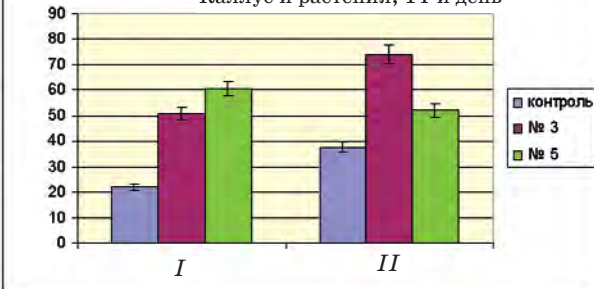
a

Пролин, мг% / г сырой массы Каллус и растения, 14-й день



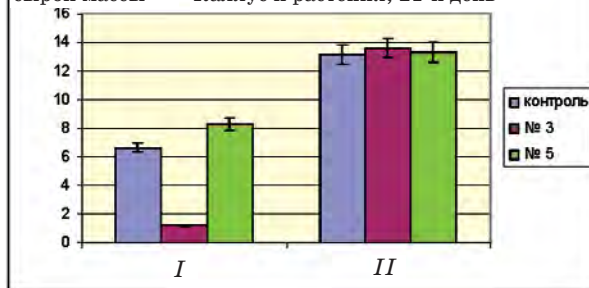
б

Пролин, мг% / г сырой массы Каллус и растения, 14-й день



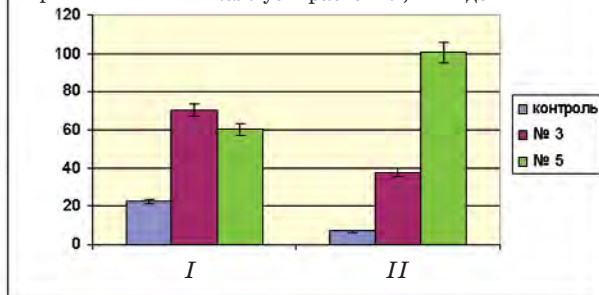
б

Пролин, мг% / г сырой массы Каллус и растения, 21-й день



в

Пролин, мг% / г сырой массы Каллус и растения, 21-й день



в

Рис. 1. Содержание пролина в клетках каллуса (I) и растений (II) при культивировании в нормальных условиях

Рис. 2. Содержание пролина в клетках каллуса (I) и растений (II) при культивировании на средах с маннитом

Примечание: содержание маннита для клеточной культуры — 0,8 М; для растений — 0,5 М.

предположить, что возрастание уровня пролина в клетках (при сохранении колебательного характера) происходило вследствие модификации активности энзимных систем синтеза/деградации.

Растения и клеточные культуры дикого типа (контроль) в конце пассажа погибали, несмотря на повышение содержания в них пролина. Высокий (относительно показаний, измеренных в норме) и стабильный уровень аминокислоты, по-видимому, был результатом одновременной деградации ряда структур, в частности обогащенных пролином протеи-

нов. На исчерпание ресурсов может указывать снижение содержания пролина в растениях контроля к 21-му дню стресса. Следствием обширной необратимой деградации клеточных структур всегда будет гибель организма.

Водный стресс в растении, вегетирующем в естественных условиях, развивается во времени: зависит от продолжительности обезвоживания, температуры окружающей среды, времени суток. Осмотическое давление клеточного сока напрямую зависит от взаимодействия генотип — среда. Компенсировать динамические изменения осмотического потенциа-

ла клетка может, активизируя такие же динамичные физиологические реакции, в частности регулируя уровень пролина, поскольку он подвержен колебаниям даже в течение суток. Было отмечено, что трансформанты табака, отличающиеся повышенным содержанием пролина, характеризуются и более высоким (в 1,5–4 раза) осмотическим давлением клеточного сока [20]. Растущие на среде с давлением –2,8 мПа клеточные культуры табака также имели повышенное содержание пролина [21].

ЛИТЕРАТУРА

1. Kavi Kishor P. B., Sangam S., Amruta R. N. et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance // *Cur. Sci.* — 2005. — V. 88, N 3. — P. 424–436.
2. Cherian S., Reddy M. P., Ferreira R. B. Transgenic plants with improved dehydration-stress tolerance: progress and future prospects // *Biol. Plant.* — 2006. — V. 50, N 4. — P. 481–495.
3. Phang J. M., Pandhare J., Liu Y. The metabolism of proline as microenvironmental stress substrate // *J. Nutr.* — 2008. — V. 138. — P. 2008–2015.
4. McCue K. F., Hanson A. D. Drought and salt tolerance: towards understanding and application // *Trends Biotechnol.* — 1990. — V. 8. — P. 358–362.
5. Delauney A. J., Verma D. P. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants // *Plant J.* — 1993. — V. 4. — P. 215–223.
6. Sawahel W. A., Hassan A. H. Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline // *Biotechnol. Lett.* — 2002. — V. 75. — P. 721–725.
7. Yonamine I., Yoshida K., Kido K. et al. Overexpression of *NtHAL3* genes confers increased levels of proline biosynthesis and the enhancement of salt tolerance in cultured tobacco cells // *J. Exp. Bot.* — 2004. — V. 55. — P. 387–395.
8. Battaglia M., Solorzano R. M., Hernandez M. et al. Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seedlings // *Planta.* — 2007. — V. 225, N 5. — P. 1121–1133.
9. Shekhawat G. S., Verma K., Jana S. et al. In vitro biochemical evaluation of cadmium tolerance mechanism in callus and seedling of *Brassica juncea* // *Protoplasma.* — 2010. — V. 239. — P. 31–38.
10. Sergeeva L. E., Poretskaya E. I. Cell selection: from cell's heavy metal resistance to plant resistance to osmotic stresses // «Plant abiotic stress tolerance» Intern. Conf. Febr., 8–11 2009, Vienna Austria. — Proc. Doc. — Vienna, 2009. — P. 161.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* — 1962. — V. 15, N 13. — P. 473–497.
12. Андрющенко В. К., Саянова В. В., Жученко А. А. и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon* Tourn // Изв. Акад. наук Молд. ССР. — 1981. — Т. 4. — С. 55–60.
13. Fallon K., Phillips R. Responses to water stress in adapted and unadapted carrot cell cultures // *J. Exp. Bot.* — 1989. — V. 40, N 1. — P. 681–687.
14. Valluri J. V., Treat W. J., Castillon J., Soltes E. J. Comparison of photomixotrophic and heterotrophic callus and suspension cultures of *Pinus elliotii*. 2. Water stress-induced changes in callus volume and protein profiles // *Plant Physiol. Biochem.* — 1990. — V. 28, N 1. — P. 57–64.
15. Кузнецов В. В., Шемякова Н. И. Проллин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // *Физиол. раст.* — 1999. — Т. 46. — С. 321–336.
16. Чижикова О. А., Палладина Т. О. Активність ключових ферментів синтезу та розкладу проліну в проростках кукурудзи за умов засолення та обробки синтетичними регуляторами росту // Доп. НАН України. — 2007. — № 3. — С. 191–195.
17. Raymond M. J., Smirnoff N. Proline metabolism and transport in maize seedlings at low water potential // *Ann. Bot.* — 2002. — V. 89. — P. 813–823.
18. Yamada M., Morishita H., Urano K. et al. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress // *J. Exp. Bot.* — 2005. — V. 56, N 417. — P. 1975–1981.
19. Dobra J., Motyka V., Dober P. et al. Comparison of hormonal responses to heat, drought and combined stress in tobacco plants with elevated proline content // *J. Plant Physiol.* — 2010. — V. 167. — P. 1360–1370.
20. Кочетов А. В., Тимов С. Е., Колодяжная Я. С. и др. Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // *Генетика.* — 2004. — Т. 40, № 2. — С. 282–285.
21. Сергеева Л. Е. Изменение культуры клеток под действием стресса. — К.: Логос, 2001. — 100 с.

**ОСМОРЕГУЛЯЦІЯ Cd-СТІЙКИХ
КЛІТИННИХ ЛІНІЙ ТЮТЮНУ
ТА ЇХНІХ РЕГЕНЕРАНТІВ ЗА УМОВ
ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ *in vitro***

*Л. Є. Сергєєва
Л. І. Броннікова
О. М. Тищенко*

Інститут фізіології рослин і генетики
НАН України, Київ

E-mail: oltyko@gmail.com

Вирішення проблеми стрес-стійкості до тривалого водного дефіциту потребує створення нових біотехнологічних методів. Перспективним напрямом є клітинна селекція з використанням іонів важких металів. Клітинні лінії, відібрані на селективних середовищах із важкими металами, та їхні рослини-регенеранти відзначаються комплексною стійкістю.

Вимірювали вміст вільного проліну у клітинних культур і рослин тютюну при культивуванні на середовищі з летальними дозами маніту. В нормі рівень проліну в клітинах Cd-стійких генотипів і контролю був незначний. Його динаміка в калусі, що росте, і в листках рослин відповідали основним показникам організму. За умов стресу рівень проліну у всіх генотипів зростав. У контролі рівень проліну в клітинах калусу в межах пасажу не змінювався, а в листках — був стабільним до 14-го дня та знижувався до 21-го дня. Високий пул внутрішньоклітинного проліну створювався внаслідок деградації клітинних компартментів, що призводило до загибелі контролю. У стійких ліній за цих умов вміст проліну був вищий, ніж у дикого типу, відзначали також його коливання як у клітинах калусу, так і листків. Акумуляція/витрачання проліну вказує його на активний метаболізм. Припускається участь проліну в осморегуляції Cd-стійких ліній тютюну та регенерантів за культивування в умовах осмотичного стресу *in vitro*.

Ключові слова: *Nicotiana tabacum* L., іони кадмію, клітинні лінії, регенеранти, осмотичний стрес, стійкість, пролін.

**OSMOTIC REGULATION
OF Cd-RESISTANT TOBACCO CELL LINES
AND THEIR REGENERANTS UNDER
OSMOTIC STRESS CULTURING *in vitro***

*L. E. Sergeeva
L. I. Bronnikova
O. M. Tishchenko*

Institute of Plant Physiology and Genetics
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: oltyko@gmail.com

Solving the problem of stress-resistance to long-term water deficit needs new biotechnology methods. Cell selection with heavy metal ions is the advanced approach. Cell lines selected on media with heavy metal ions and their regenerated plants are characterized by combined resistance.

The free proline levels were measured in tobacco cell cultures and plants during their cultivation on media with addition of the mannitol in lethal doses. Under normal conditions the contents of free proline were small and similar in callus and plant cells of Cd-resistant and control genotypes. Fluctuations of free proline levels were adequate to organism basic parameters. Under osmotic stress the elevations of the free proline levels were marked in all genotypes. In wild type organisms the levels of free proline (within the passage) were stable in callus cells and reduced in leaf cells from 14 to 21 days of the osmotic stress. The high proline pool was the result of degradation of intracellular compartments. The last event led to death of control variants. Contents of the free proline in cells of the resistant lines exceeded the proline level of the wild type and changed both in callus and leaf cells within the passage. Proline accumulation/decrease indicated the activity of its metabolism. The idea about the proline implication in osmotic adjustment of Cd-resistant tobacco cell lines and their regenerants was suggested.

Key words: *Nicotiana tabacum* L., cadmium ions, cell lines, regenerants, osmotic stress, resistance, proline.