

УДК 581.143.6

СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНОГО ПРОЛИНА У КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ СОИ, КУЛЬТИВИРОВАННЫХ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ

С. И. МИХАЛЬСКАЯ, Л. Е. СЕРГЕЕВА

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
 Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17

На селективных средах с токсической концентрацией ионов бария отобраны устойчивые клеточные линии сои. Устойчивые клоны культивировали в условиях стрессового действия различных факторов: ионов бария; солей морской воды и сульфата натрия. В каллусе измеряли содержание свободного пролина. При культивировании клеток на селективных средах с добавлением ионов бария наблюдали низкое содержание свободного пролина как в контроле, так и в устойчивом каллусе. В условиях засоления содержание пролина у клеточных линий было различным. В контроле низкое содержание пролина отмечено при культивировании на средах с добавлением Na_2SO_4 у Va-устойчивых линий, наоборот, на средах содержащих морскую соль. Альтернативное засоление вызывало у линий обратную реакцию. Предполагается реализация различных механизмов устойчивости.

Ключевые слова: соя, ионы бария, засоление, пролин.

ВВЕДЕНИЕ. Проблема стресса, вызванного действием засоления, и устойчивости к нему растительных организмов в последнее время становится одной из наиболее приоритетных. Около $9 \cdot 10^8$ га, что составляет более 25% всей площади почв планеты, занимают земли с повышенным содержанием солей [1]. В Украине таких угодий более 4 млн га [2]. Острая потребность в солеустойчивых растениях стимулирует развитие различных направлений научного поиска.

Использование культуры тканей и клеток для генетического улучшения сельскохозяйственных культур применяется давно и успешно. Начиная с первых шагов в клеточной селекции и до настоящего времени получены клеточные линии значительного числа видов растений, отличающиеся высокой и сверхвысокой солеустойчивостью [3, 4].

Успешный результат во многом зависит от создания адекватной системы отбора, что предусматривает выбор селектирующего соеди-

нения и его концентрации. Как правило, в качестве базового компонента получения солеустойчивых форм используют различные соли [5, 6]. Как альтернативу в отдельных случаях используют молекулярные осмотики, такие как ПЭГ, М.М. 4000–8000, маннит, декстран [3, 7]. В результате появляется возможность отбора форм с комплексной устойчивостью, что значительно перспективнее.

В наших экспериментах для отбора клеточных линий с повышенным уровнем солеустойчивости были использованы селективные среды с ионами тяжелого металла бария [8]. Отобранные Ва-устойчивые клеточные линии табака, подсолнечника, сои росли в условиях хлоридного и сульфатного засоления. В условиях поглощения ионов Na^+ и Cl^- их вакуолярная компартментация вызывает изменение осмотического статуса клетки и обязательно требует его компенсации за счет увеличения пула синтезирующихся в цитоплазме соединений. Первостепенную роль в этом процессе многие ученые отводят пролину [9].

Отмечается прямая зависимость между содержанием пролина в растениях, каллусе и устойчивостью к засолению [3]. Такое свойство пролина, как высокая растворимость может способствовать увеличению растворяющего объекта клетки, тем самым понижая концентрацию солей в цитозоле [9].

Накапливаясь в больших количествах, пролин стабилизирует осмотический баланс клетки. Поскольку ионы тяжелых металлов для клеточной селекции используются в микроколичествах и влияют на осмотический статус клетки не могут, представляется интересным изучение накопления свободного пролина в случае комп-

лексной устойчивости к засолению и ионам Ba^{2+} .

Материалы и методы

В эксперименте использовали ранее полученные нами устойчивые к ионам бария клеточные линии сои сорта Киевская-27. Отобранные варианты испытывали в условиях различного моделированного засоления [10]. Клеточные линии сои росли в присутствии 1,0% NaCl , Na_2SO_4 или солей морской воды. Такая концентрация засоления считается летальной даже для клеточных культур люцерны, как известно отличающихся большим уровнем солеустойчивости, чем соя [11].

В каллусной массе клеток, культивируемых в условиях различного стресса, изучали содержание пролина. Анализ производили по модифицированной методике Чинарда, суть которой заключается в том, что при взаимодействии пролина с нингидриновым реактивом образуется хромофор, определяемый колориметрически при $\lambda = 520$ нм. Навеску растительной ткани гомогенизировали с 10 мл водного раствора сульфосалициловой кислоты для осаждения белков. Гомогенат фильтровали. К 2,0 мл фильтрата добавляли 2,0 мл нингидринового реактива, приготовленного без нагревания (1,25 г нингидрина; 30 мл ледяной уксусной кислоты; 20 мл 6М раствора H_3PO_4) и 2,0 мл ледяной уксусной кислоты. Реакционную смесь выдерживали в течение 1 часа на водяной бане при $t = 100$ °С, поддерживая уровень воды выше уровня жидкости в пробирках. После часовой инкубации реакционную смесь быстро охлаждали на лед и содержимое пробирок переносили в делительную воронку с 4,0 мл толуола. Встряхивали в течение 20 се-

кунд. Нижний водный слой отбрасывали, а верхний — прозрачный, окрашенный в розово-малиновый цвет. Колориметрировали в видимой области спектра ($\lambda = 520$ нм). В качестве контроля при колориметрировании использовали толуол [12]. Стандартную кривую строили по кристаллическому пролину. Уровень аминокислоты определяли 1 раз в неделю в трех биологических повторностях.

Результаты и обсуждение

Ранее было установлено, что уровень свободного пролина является динамическим параметром, который может существенно изменяться в течение пассажа [3]. Максимальные его значения могут не совпадать (по срокам) у клеточных культур с различной степенью солеустойчивости при их культивировании при стрессовых условиях. С другой стороны, у солеустойчивых вариантов, выращиваемых на средах с различными типами засоления, возрастание и убывание содержания этой аминокислоты также отмечено в разные дни [3]. Следовательно, по нашему мнению сравнивать уровень свободного пролина у клеточных культур целесообразнее всего по окончании наиболее активной стадии развития, отражающий жизнеспособность клеток, т.е. логарифмической фазы роста. Для различных культур — это приходится на 12–15 день [3, 7].

Соответствующий уровень пролина в таком случае может указывать на его роль в поддержании устойчивости клетки.

У Ba^{2+} -устойчивых клеточных линий сои и в контроле измеряли уровень свободного пролина при культивировании в стрессовых условиях. В таблице 1 приводятся данные, полученные при культивировании клеточных культур на селективных средах, содержащих 2 мМ ионов бария. Ранее нами было показано, что такая концентрация данного катиона летальна для клеточных культур дикого типа [10]. Очевидно, что в данном случае каллус контроля потерял жизнеспособность в первые дни после помещения в стрессовые условия. Низкий уровень пролина, измеренный на 14 день (завершение лог-фазы) свидетельствует в пользу такого предположения. Еще большее уменьшение содержания аминокислоты в конце пассажа (28 день) подтверждает факт полного отсутствия жизнедеятельности.

У Ba -устойчивой клеточной линии КС-27 при культивировании в условиях стрессового давления, создаваемого ионами Ba^{2+} , также отмечено невысокое содержание свободного пролина, на 14-й день абсолютные величины этого параметра сравнимы с контролем, а к концу пассажа, в отличие от контроля, повышаются. Поскольку

Таблица 1. Содержание свободного пролина (мг/г сырой массы) у клеточных линий сои, культивируемых на селективной среде с токсическими концентрациями ионов бария

	Дни пассажа	
	14 день	28 день
Линия КС-27 №9	1,88±0,26	2,98±0,98
Контроль	1,74±0,34	0,72±0,16

биомасса каллуса увеличивается (клеточная линия растет) можно предположить, что такой уровень пролина является оптимальным для данных условий, т.е. устойчивость клеточной линии поддерживается за счет других механизмов. Это вполне согласуется с литературными данными [13].

Сложнее и более неоднозначна реакция клеточных культур на стрессовое воздействие засоления. Для проверки солеустойчивости была выбрана 1,0%-ная концентрация солей. Такое количество признано чрезвычайно токсичным даже для клеточных культур люцерны, отмечающихся, как известно, большей солеустойчивостью чем соя [11]. Уровень свободного пролина отражает характер жизнедеятельности клеток культивируемых при засолении (табл. 2). Содержание свободного пролина в каллусе дикого типа существенно зависит от типа воздействующего стрессового фактора: пул аминокислоты более чем в 3 раза выше в клетках, культивируемых на средах с добавкой солей морской воды, чем на средах с сульфатом натрия. Очевидно, что клетки подвергаются сильному стрессовому давлению. В обоих случаях контроль не переживал и одного пассажа (30–35 дней) культивирования [10]. Однако, снижение жизнеспособности и гибель культур происходили с различной скоростью: в равных концентрациях соли морской воды менее токсичны чем Na_2SO_4 [3].

При культивировании на среде с морской солью стрессовое угнетение в клетках дикого типа (клеточной популяции) развивалось и усиливалось постепенно, в течение пассажа. В пользу этого предположения указывает высокий уровень пролина, не убывающий до конца пассажа. Однако, такой уровень аминокислоты поддерживается за счет деградации клеточных белков, но не повышенного синтеза, поскольку (как указывалось выше) культура дикого типа погибала. Такое событие повышения содержания пролина при стрессе часто наблюдается и отмечено в других публикациях [3].

При культивировании контроля на средах с сульфатным засолением уровень пролина существенно не увеличивался, что говорит о сильном стрессовом угнетении и скорой гибели клеток. Такое воздействие Na_2SO_4 оказывает и на другие культуры [3, 14].

Va-устойчивая клеточная линия сои росла на селективных средах с любым типом засоления. Уровень свободного пролина отражает реакцию клеток на стрессовое давление. Относительно невысокий уровень аминокислоты, измеренный в каллусе при культивировании культуры в присутствии солей морской воды, может указывать на отсутствие стрессового угнетения либо на реализацию иных механизмов устойчивости.

Рост Va-устойчивой клеточной линии на среде с добавлением сульфата

Таблица 2. Содержание свободного пролина (мг/г сырой массы) у клеточных линий сои, культивируемых на селективных средах с различным типом засоления

	1% морской соли		1% Na_2SO_4	
	14 день	28 день	14 день	28 день
Линия КС-27 №9	6,77±0,44	4,55±0,45	39,13±20,99	42,76±0,49
Контроль	14,51±11,00	22,09±16,61	3,73±3,68	6,72±1,19

натрия сопровождается поддержанием стабильно высокого уровня свободного пролина. Вероятно в этом случае пролин выступал в качестве осморегулирующего соединения, стабилизирующего осмотический потенциал клетки [9].

Солеустойчивость растений — это полигенный признак. Используя метод прямой селекции в системе *in vitro*, как правило, получают осмоустойчивые формы. Клеточные линии (и растения-регенеранты) характеризуются повышенным синтезом свободного пролина, обеспечивающим и повышенный уровень солеустойчивости [3, 6, 11]. В случае использования ионов тяжелого металла бария существует возможность отбора клеточных линий растений с комплексной устойчивостью, которая может поддерживаться за счет реализации различных механизмов устойчивости (как это видно в данном случае). В этом состоит оригинальность данного метода и перспективность использования ионов тяжелых металлов в клеточной селекции.

Выводы

1. Установлено, что Ва-устойчивость клеточных линий сои не сопровождается повышением пула свободного пролина.

2. Показано, что устойчивость к различным типам засоления у Ва-резистентных линий сои обеспечивается, вероятно, за счет различных механизмов устойчивости.

Список литературы

1. Zhu J.K. Plant salt tolerance // *Trends Plant Sci.* — 2001. — Vol. 6. — P. 66–71.
2. Кэркевич Л.Н., Потопальський А.І., Задорожний Б.О. Оцінка зразків жита різної плідності на стійкість до засолення субстрату // *Досягнення і проб-*

леми генетики, селекції та біотехнології. — К., Логос, — Т. 2. — 2007. — С. 225–229.

3. Сергеева Л.Е. Изменения культуры клеток под действием стресса. — К., Логос, — 2001. — 100 с.
4. Hasegawa P.M., Bressan R.A., Handa A. Cellular mechanisms of salinity tolerance // *Hort Science.* — 1986. — Vol. 21, № 6. — P. 1317–1324.
5. Dix P.J., Street H.E. Sodium chloride — resistant cultured cells from *Nicotiana tabacum* and *Capsicum annum* // *Plant Sci. Lett.* — 1975. — 5, № 4. — P. 231–237.
6. Ben — Hayyim G., Kafkafi U., Ganmore-Neumann R. Role of internal potassium in maintaining growth of cultured citrus cells on increasing NaCl and CaCl₂ concentrations // *Plant Physiol.* — 1987. — Vol. 85, № 2. — P. 459–463.
7. Dracup M. Why does *in vitro* cell selection not improve the salt tolerance of plants // *Genetic aspects of plant mineral nutrition / P.J. Randal et al.* — Amsterdam: Kluwer Akad. Public., 1995. — P. 137–142.
8. Сергеева Л.Е. Новая селективная среда с ионами бария — альтернативная система для отбора солеустойчивых клеточных линий // *Биотехнология.* — 2002. — № 2. — С. 47–51.
9. Шевякова Н.И. Метаболизм и физиологическая роль пролина при водном и солевом стрессе // *Физиология растений.* — 1983. — Т. 30, № 4. — С. 768–783.
10. Сергеева Л.Е., Михальская С.И. Солеустойчивость Ва²⁺-резистентных клеточных линий растений // *Физиология и биохимия культурных растений.* — 2006. — Т. 38, № 6. — С. 491–497.
11. Stavarek S.J., Rains D.W. The development of tolerance to mineral stress // *Hort Science.* — 1984. — Vol. 19, № 3. — P. 377–388.
12. Андрищенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А., Дьяченко А.И., Чиликина Л.А., Дроздов В.В., Корочкина С.К., Череп С.К., Медведев В.В., Нютин Ю.И. Модификация метода определения пролина

- для виявлення засухоустойчивих форм *Lycopersicon Tourne* // Известия Академии Наук Молдавской ССР.— 1981.— Т. 4.— С. 55–60.
13. *Niu X., Bressan R.A., Pardo J.M.* Ion homeostasis in NaCl stress environments // *Plant Physiol.*— 1995.— Vol. 109, № 3.— P. 735–742.
14. *Шевякова Н.И., Парамонова Н.В., Кузнецов В.В.* Аккумуляция пролина в солеустойчивых клетках табака в связи с изменениями структуры митохондрий // *Физиология растений.*— 1998.— Т. 45, № 6.— С. 850–858.

Представлено М.В. Кучуком
Надійшла 11.09.2007

ВМІСТ ВІЛЬНОГО ПРОЛІНУ У КЛІТИННИХ ЛІНІЯХ СОІ, КУЛЬТИВОВАНИХ В УМОВАХ ДІЇ РІЗНИХ СТРЕСОВИХ ЧИННИКІВ

С.І. Михальська, Л.Е. Сергеева

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
Україна, 03022, м. Київ,
вул. Васильківська, 31/17

На селективних середовищах із токсичною концентрацією іонів барію відібрано стійкі клітинні лінії сої. Стійкі клони культивували в умовах стресової дії різних чинників: іонів барію; солей морської води та сульфату натрію. У калюсі вимірювали вміст вільного проліну. При культивуванні клітин на селективних середовищах із додаванням іонів барію спостерігали низький вміст вільного проліну як у контролі, так і в стійкому калюсі. В умовах засолення вміст проліну в клітинних лініях був різним. У контролі низь-

кий вміст проліну виявляли при культивуванні на середовищах з додаванням Na_2SO_4 , у Ва-стійких ліній, навпаки, на середовищах, які містять морську сіль. Альтернативне засолення викликало у лінії зворотню реакцію. Припускається реалізація різноманітних механізмів стійкості.
Ключові слова: соя, іони барію, засолення, пролін.

FREE PROLINE CONTENT OF SOYBEAN CELL LINES CULTIVATED UNDER STRESS PRESSURE OF VARIOUS AGENTS

S.I. Mykhalskaya, L.E. Sergeeva

Institute of Plant Physiology
and Genetics NAS of Ukraine,
Ukraine, 03022, Kiev, Vasilkivska, 31/17

On selective media with toxic concentrations of barium-ions resistant cell lines of soybean were obtained. The resistant clones are cultivated under stress pressure of various agents: barium-ions, sea water salts, sodium sulfate. The levels of free proline were measured in soybean calli. The levels of free proline in resistant and control cells during cultivation on selective media with the addition of barium-ions were low. Under salinity conditions free proline contents in cell lines essentially differed. The proline level of control line was low, during its cultivation on the medium, with the addition of Na_2SO_4 . Such proline level in resistant cells was observed during its cultivation on medium with the addition of sea water salts. The alternative type of the salinity provoked contrary cell reactions. It is assumed the realization of different resistant mechanisms.

Key words: soybean, barium ions, salinity, proline.