

СЕРГЕЕВА Л.Е., ДЫКУН М.О., БРОННИКОВА Л.И.✉

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,

Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: Zlenko_lora@ukr.net

✉ Zlenko_lora@ukr.net, (096) 753-16-32, (095) 127-91-32

РЕАКЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР КУКУРУЗЫ НА ДЕЙСТВИЕ ЖЕСТКИХ ОСМОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ

Радикальные изменения климата, возрастающий дефицит пресной воды делают затруднительным выращивание ценных народнохозяйственных культур. Среди абиотических стрессов наибольший спектр патологических изменений вызывают осмотические стрессы – засоление и водный дефицит. Нередко они действуют совместно, что еще более снижает возможность выживания организма. Возникает необходимость получения форм растений, сочетающих устойчивость к разнообразным стрессам с удовлетворительными потребительскими качествами.

Это относится к кукурузе, которая является одной из наиболее важных сельскохозяйственных культур. Культура кукурузы *in vitro* была и есть проблемным объектом, вследствие присущего ей существенного полиморфизма каллусных тканей, низкого морфогенетического потенциала, утери регенерационной способности при длительном выращивании. Это в первую очередь касается высокотехнологичных продуктивных сортов. Для вовлечения кукурузы к клеточным и генным биотехнологиям необходимо детальное исследование культуры на всех стадиях клеточного цикла в норме и при стрессе, определение ключевых показателей жизнедеятельности, создание экспериментальных систем культивирования, обеспечивающих надежное тестирование и однозначную трактовку полученных результатов.

Потребности текущего момента определяют направления научного поиска и стимулируют развитие новых методов исследования. В настоящее время активно формируются и развиваются новые биотехнологические методы, использующие микро и даже нанотехнологии. При этом приоритетной становится идеология экологической безопасности; как самого метода, так и продукта, им производимого.

Одним из наиболее перспективных способов решения проблемы получения стрессо-

устойчивых форм растений считают генетическую инженерию. Однако, как любая технология, данный метод нуждается в постоянном совершенствовании. Особенно необходимо учитывать различные аспекты, вызывающие недоверие при использовании данной методологии [1]. Массовое получение трансгенных растений требует комплексного исследования генетически модифицированного организма, что существенно ограничено *in vivo*. В то же время использование системы *in vitro* может гарантировать постоянный контроль параметров воздействия и адекватность ответных реакций тестируемого объекта. Использование клеточных культур, изучение их поведения в различных условиях обеспечит объективность информации о состоянии жизнедеятельности клеток на протяжении всего цикла развития. Клеточные культуры кукурузы различного происхождения, культивируемые в нормальных условиях и при действии стрессов, становятся перспективным объектом исследования. Во-первых, эксперимент может предоставить актуальные данные о фундаментальных процессах стресса/устойчивости, а также выявить новые маркеры устойчивости. Во-вторых, модификации условий культивирования дадут возможность установить специфические характеристики культуры, повысить ее тотипотентность. В-третьих, будет сформирован базис для последующих манипуляций, направленных на получение форм с другими генетическими изменениями.

Целью настоящей работы было получение и изучение реакций клеточных культур кукурузы при воздействии сильных осмотических стрессов.

Материалы и методы

Объектом исследования были клеточные культуры, полученные из растений кукурузы Л-390 (селекции ИФРиГ НАН Украины), трансформированной *in planta* с использованием

обезоруженного агробактериального штамма, несущего плазмиду pVi2E. Конструкция включала обращенный повтор, состоящий из фрагментов первого экзона гена пролиндегидрогеназы, ПДГ, арабидопсиса, разъединенных его первым интроном (дцРНК-супрессор гена ПДГ [2]. (Рекомбинантный штамм был получен сотрудником Института цитологии и генетики СО РАН А.В. Кочетовым). Каллус был индуцирован из незрелых зародышей (14 суток после опыления) семенного поколения T2 и нарастал на питательной среде FSI [3].

Культуры на устойчивость тестировали, добавляя соли морской воды (25,0 г/л, 2,5 м) либо маннит (0,8 М, 0,8 м)

Содержание пролина определяли в сыром веществе по стандартной методике [4]. Электрофорез проводили по методу Ф. Поперели с модификациями [5]. Полученные первичные данные статистически обрабатывали.

Результаты и обсуждение

Идеология эксперимента предполагала создание жёстких (летальных) осмотических стрессов. Поэтому перед постановкой проблемы определяли жизнеспособность тестируемых вариантов. Для этого проводили анализ электрофоретического спектра водорастворимых белков, к группе которых относятся многие функциональные протеины [6]. Как видно по электрофореграмме, представленной на рисунке 1, протеиновый спектр зерна кукурузы достаточно репрезентативен и аналогичен у всех генотипов.

Каллус, полученный из зародышей кукурузы, переносили в стрессовые условия на 35 суток. Это максимальный срок отдельного дискретного пассажа даже в оптимальных условиях, поскольку культура стареет, а трофические ресурсы исчерпываются. Стрессовое давление существенно влияло на развитие культур, и к концу пассажа можно было визуально увидеть различия между вариантами (рис. 2).

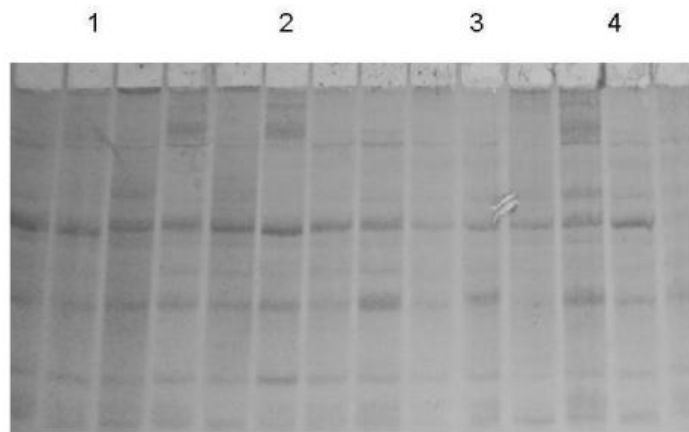


Рис. 1. Электрофореграмма водорастворимых белков зерна кукурузы: 1, 2, 3 – зерновки T2 растений кукурузы; 4 – зерновка контрольного растения Л-390.

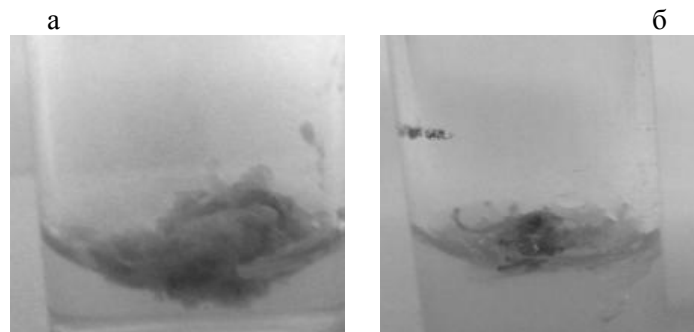


Рис. 2. Каллусные культуры кукурузы, культивированные при засолении, 35-е сутки: а – культура, полученная из T2 растений; б – контроль.

Растения выработали многочисленные механизмы адаптации к стрессовым условиям, многие из которых реализуются на клеточном и молекулярном уровнях. Поскольку уровень стрессоустойчивости может в значительной степени варьировать в онтогенезе, то приоритет механизмов также может меняться во времени. Однако в то же время известен ряд осмотически активных соединений, которые при любых обстоятельствах способствуют поддержанию жизнедеятельности. К таким соединениям относится пролин [7, 8]. Пролин рассматривается как наиболее адекватный показатель устойчивости к осмотическим стрессам.

Пролин – пирролидин-2-карбоновая кислота – отличается рядом свойств, которые делают его неспецифическим стрессовым протектором [7]. Высокая гидрофильность пролина

способствует увеличению растворяющего объема клетки, за счет чего поддерживается гидратационная сфера клеточных полимеров. Гидрофобное пирролиновое кольцо молекулы взаимодействует с аналогичными по свойствам частями протеинов, вследствие чего несущие заряд структуры ориентируются в нужном направлении, стабилизируя водный статус. Установлен также факт аккумуляции пролина как совместимого осмолита при засолении. Тем самым при действии различных осмотических стрессов достигается лучшая растворимость белка в воде и в целом формируется термодинамически устойчивая структура [9].

Проводили анализ содержания свободного пролина в динамике: в середине и конце пассажа (14-е и 34-е сутки соответственно.) (рис. 3 а, б).

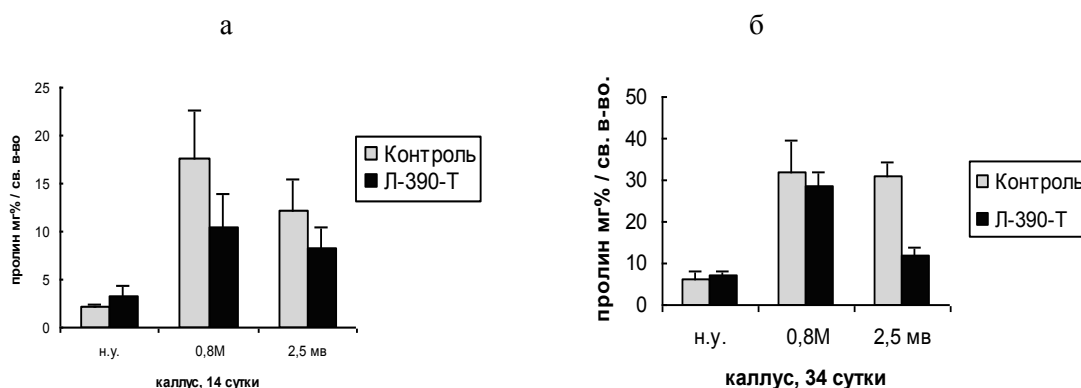


Рис. 3. Содержание свободного пролина в каллусных культурах кукурузы, культивированных при действии сильных осмотических стрессов (а, б).

Содержание свободного пролина в клетках различных генотипов кукурузы в норме было незначительным с превышением у варианта Л-390-Т в середине пассажа и выравниванием в конце срока культивирования. Засоление и водный стресс вызывали резкое возрастание содержания свободного пролина уже на 14-е сутки. У контрольного варианта уровень аминокислоты увеличивался в большей мере и существенно зависел от типа стрессора. У варианта Л-390-Т уровни пролина в каллусе, культивированном на селективных средах, различались между собой незначительно (рис. 3 а).

Увеличение срока стрессового воздействия вызывало дальнейшее возрастание содержания пролина у обоих вариантов. Однако на 34-е сутки у контрольной культуры уровень

пролина выравнивался, тогда как у генотипа Л-390-Т он становился зависимым от типа стрессового фактора, т.е. сложилась ситуация, обратная наблюдаемой в середине пассажа (рис. 3 б). Это событие могло быть следствием различной скорости аккумуляции свободного пролина.

Известно, что увеличение уровня свободного пролина может быть обусловлено различными (противоположными) причинами. Клеточная культура Л-390-Т развивалась в условиях действия осмотических стрессов. Рисунок 2 (а) фиксирует это событие, происходящее при засолении. (Аналогичная ситуация наблюдалась при действии маннита). Таким образом, можно предположить, что возрастание содержания пролина было следствием увеличения его синтеза.

14-е сутки опыта совпадают с окончанием стадии логарифмического роста, которая характеризуется максимумом митозов. Для поддержания деления клеток в условиях стресса требовалось определенное количество пролина. Поэтому, по нашему мнению, отмечалась аналогичная его аккумуляция в клетках культуры Л-390-Т на 14-е сутки (рис. 3 а). За ней следует стадия растяжения. Биомасса увеличивается за счет увеличения объема клеток. При этом объем клеток, культивируемых при засолении, невелик, что является показателем солеустойчивости [8]. Для поддержания жизнедеятельности таких клеток требовалось меньшее количество протекторного соединения. При засолении отмечали меньшую аккумуляцию пролина в каллусе в сравнении с каллусом, растущим в присутствии маннита (рис. 3 б). Клеточная культура Л-390-Т росла в условиях жесткого стресса, синтезируя пролин в процессе развития, адаптируясь к типу стрессора.

Противоположный процесс происходил в клетках дикого типа. Рис. 2 (б) фиксирует полное отсутствие роста, культура элиминировалась. Однако при этом в клетках происходило возрастание содержания свободного пролина. Логично предположить, что данное событие не было следствием синтеза.

Аминокислота могла образоваться вследствие деградации пролин-содержащих белков. Обогащенные пролином протеины (**proline rich proteins, PRPs**), участвуют в формировании клеточных стенок [10–12]. В их молекулах остатки пролина организованы в повторяющиеся моти-

вы, к которым добавляется гидроксипролин. Два PRP – субсемейства (экстенсины и P/H RGP) – имеют большое значение в устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам. Это обусловлено стресс-индуцированным окислением, во время которого формируются меж- и внутримолекулярные перекрестные связи, укрепляющие структуру клеточной стенки [11]. Разновидность PRPs – 8СМ-НyPRP – прикреплен к мембране тремя трансмембранными консервативными доменами – отличается присутствием восьми цистеиновых остатков [12].

Вероятно, у варианта Л-390 в процессе патогенеза происходила деградация клеточных компартментов, в результате которой высвобождалось значительное количество свободного пролина. При увеличении продолжительности осмотического стресса масштаб разрушения также увеличивался, уровень пролина возрастал. При жестком стрессе тип стрессора не играл никакой роли, уровень пролина был аналогичным по абсолютной величине (рис. 3 б). В пользу такого предположения свидетельствует рисунок 4.

Электрофореграмма, приведенная на рисунке 4, отображает состояние протеинового статуса у исследуемых вариантов кукурузы. Наблюдается поддержание биосинтеза в клетках генотипа Л-390-Т и деградация клеточных компартментов в каллусе контроля. Ограниченный белковый пул в клетках Л-390-Т, по нашему мнению, может указывать на специфичность метаболизма, протекающего при жестком стрессовом давлении.

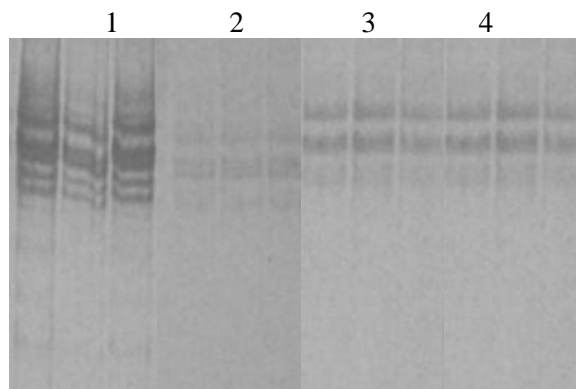


Рис. 4. Электрофореграмма водорастворимых белков клеточных культур кукурузы, растущих в условиях осмотических стрессов: 1, 3 – генотип Л-390-Т; 2, 4 – контроль; 1, 2 – засоление (2,5 мв); 3, 4 – водный стресс (0,8 м).

Таким образом, становится очевидным, что реакции тестируемых культур на действие сильных осмотических стрессов различны. Метаболизм культуры Л-390-Т обеспечивает жизнеспособность клеток и является проявлением клеточной адаптации. Поскольку культура была получена из трансформированных растений, можно считать, что ее стрессоустойчивости способствовал интегрированный трансген. Что касается культуры дикого типа, то наблюдаемые стресс-индуцированные реакции были отображением развивавшейся клеточной патологии, приведшей к гибели контроля.

Литература

1. Лобов В.П., Томилин М.В., Веселов А.И. Генетически модифицированные растения: достижения, перспективы и ограничения // Вестн. Нижегородского ун-та, сер. Общая биология. – 2010. – № 2 (2). – С. 423–429.
2. Колодяжная Я.С. Исследование стрессоустойчивости генетически модифицированных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.), экспрессирующих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 2007. – 16 с.
3. Green S.E., Phillips R.L. Plant regeneration from tissue cultures of maize // Crop Sci. – 1975. – 15. – P. 417–421.
4. Андрищенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А., Дьяченко Н.И., Чиликина Л.А., Дроздов В.В., Корочкина С.К., Череп Г.И., Медведев В.В., Нютин Ю.И. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon Tournefortii* // Известия Академии Наук Молдавской ССР. – 1981. – № 4. – С. 55–60.
5. Попереля Ф.А., Асыка Ю.А. Методические указания по электрофорезам гелиантина зерна кукурузы для определения процента гибридности. – М., 1988. – С. 4–6.
6. Лапшин П.В., Бутенко Р.Г., Шевелуха В.С. Клеточная селекция яровой мягкой пшеницы на устойчивость к действию УФ-Б-радиации // Изв. ТСХА. – 2000. – № 2. – С. 136–144.
7. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sci. – 2010. – 15. – P. 89–97.
8. Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.-K., Bohnert H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2000. – 51. – P. 463–499.
9. Hassan N.S., Shaaban L.D., Hashem E.-S.A., Seleem E.E. *In vitro* selection for water stress tolerant callus line of *Helianthus annuus* L. cv. Myak // Int. J. Agr. Biol. – 2004. – 1. – P. 13–18.
10. Stein H., Honig A., Miller G., Erster O., Eilenberg H., Csonka L.N. Elevation of free proline and proline-rich protein levels by simultaneous manipulations of proline biosynthesis and degradation in plants // Plant Sci. – 2011. – 181. – P. 140–150.
11. Battaglia M., Solorzano R.M., Hernandez M., Cuellar-Ortiz S., Garcia-Gomez B., Marquez J., Covarrubias A.A. Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seedlings // Planta. – 2007. – 225. – P. 1121–1133.
12. Jose-Estaniol M., Gomis-Ruth F.X., Puigdomenech P. The eight-cysteine motif a versatile structure in plant proteins // Plant Physiol. Biochem. – 2004. – 42. – P. 355–365.

SERGEEVA L.E., DYKUN M.O., BRONNIKOVA L.I.

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17, e-mail: Zlenko_lora@ukr.net

REACTIONS OF CORN CELL CULTURES DURING HARD OSMOTIC STRESSES ACTION

Aim. There are corn cell cultures, obtained from plants of maize inbred line L-390 (control) and from T2 progeny (L-390-T) of plants transformed via *in planta* *Agrobacterium*-mediated transformation with *LBA4404* strain harboring pBi2E with double-stranded RNA-suppressor of the proline dehydrogenase gene. The reactions of cell variants, cultivated under hard osmotic stress pressure were investigated. **Methods.** 25.0 g/l of sea water salts or 0.8 M of mannitol were added to F1 cultural medium. Corn cell variants were tested under osmotic stress pressure. The free proline and protein levels were estimated on 14-th and 34-th days of the experiment. **Results.** L-390-T cell cultures maintained viability and wild type cultures died at the end of experiment. The levels of free proline rose in calli tissues, cultivated on nutrition medium with the addition of mannitol or salinity. At the same time the proline levels of L-390-T cells were products of biosynthesis. While the proline content in control cultures elevated after the degradation of proline rich proteins (PRPs). **Conclusions.** The L-390-T high level of osmotic stress tolerance is a possible result of transgene activity.

Keywords: *Zea mays*, cell cultures, *Agrobacterium*-mediated transformation salinity, water stress, proline.

Выводы

1. Клеточные культуры кукурузы Л-390-Т и Л-390 (дикий тип) по-разному реагируют на стрессовое воздействие засоления и водного стресса. Реакции генотипа Л-390-Т отражают адаптационные процессы клеток. Реакции культуры дикого типа указывают на сильное стрессовое поражение и последующую элиминацию.

2. Стрессоустойчивость генотипа Л-390-Т проявляется не только у растений трансформантов, но и в культуре, иницированной из них.

3. Система *in vitro* является надежным способом тестирования биотехнологических растительных форм.