

СЕРГЕЕВА Л. Е.[✉], ДЫКУН М. О., БРОННИКОВА Л. И.Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17[✉] Zlenko_lora@ukr.net, (095) 616-43-04

БЕЛКОВЫЙ СТАТУС КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ ОЗИМОЙ С КОМПЛЕКСНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ

Цель. Клеточные линии пшеницы озимой, отобранные на селективной среде с добавлением летальных доз катиона Cd^{2+} , демонстрировали стабильный рост при осмотическом стрессе. Целью работы было установление особенностей белкового статуса устойчивых клеток при культивировании в различных условиях. **Методы.** Культура клеток: Cd-устойчивые клеточные линии пшеницы озимой сорта Фаворитка культивировали в нормальных условиях и в присутствии летальных доз маннита и Cd^{2+} , соответственно: стрессы I и II. Из каллусных культур одного пассажа выделяли препараты суммарного белка, которые разделяли электрофорезом в системе Лэммли. **Результаты.** Cd-устойчивые клеточные линии пшеницы озимой демонстрировали стабильный рост в условиях любого летального (ионного, осмотического) стресса. Электрофореграммы выявили особенности накопления фракций протеинов, зависящие от возраста культуры и типа стрессора. **Выводы.** У Cd-устойчивых клеточных линий пшеницы озимой при выращивании в условиях различных летальных для культур дикого типа стрессах (ионы Cd^{2+} , маннит) не происходило обеднение общего белкового пула. Количественное накопление отдельных белковых фракций коррелировало с типом стрессового фактора и особенно проявлялось в присутствии маннита. Белковый статус Cd-устойчивых клеточных линий пшеницы озимой является отражением адаптивных реакций, определяющих их комплексную устойчивость.

Ключевые слова: пшеница озимая, клеточная селекция, ионы кадмия, осмотический стресс, устойчивая клеточная линия, белок.

В последнее время *in vitro* биотехнологии по своей приоритетности начинают опережать традиционные методы получения генетически измененных вариантов. Их используют в целях улучшения различных видов растений, в том числе пшеницы озимой.

Безусловно, установлен факт комплексного воздействия системы *in vitro*, изменяющего генетическую программу растений. Создание специализированных систем отбора только способствует повышению эффективности методологии. Использование селективных систем для выделения отдельных генетически измененных клеток в массиве популяции дикого типа, получение клеточных линий, регенерация из них растений может существенно ускорить селекционный процесс. Такими возможностями характеризуется клеточная селекция.

Клеточная селекция гарантированно доказала свою перспективность при получении растений с улучшенными физиологическими показателями, в частности стрессоустойчивостью *in vitro* [1]. Нами была предложена и апробирована гипотеза использования ионов тяжелых металлов для получения форм растений с повышенным уровнем устойчивости к абиотическим стрессам [2]. Этот подход был использован в клеточной селекции пшеницы озимой для повышения устойчивости генотипов к водному стрессу.

Функционирование растений в условиях дефицита влаги обеспечивается различными физиологическими реакциями. Известно, что в таких условиях может накапливаться ряд протеинов, в том числе дегидрины. Высказано предположение о том, что они могут функционировать аналогично шаперонам, предупреждая денатурацию молекул при недостатке влаги. Дегидрины – это большая группа протеинов, к которой относятся LEA (*late embryogenesis abundant proteins*), белки поздней стадии эмбриогенеза [3–5]. Их обнаруживают в ядре, цитоплазме, митохондриях. Благодаря присутствию гистидина предполагается также возможность связывания с ионами тяжелых металлов [5]. В то же время было показано, что катионы кадмия (Cd^{2+}) в значительной мере угнетают LEA [6].

Этот факт позволил нам использовать ионы Cd^{2+} для создания системы отбора клеточ-

ных вариантов пшеницы с повышенным уровнем устойчивости к водному стрессу. Такие варианты были получены и протестированы в условиях прямого действия моделированного летального водного стресса. Каллус устойчивых клеточных линий рос на селективных средах с ионами кадмия и низким осмотическим давлением. Исследовали белковые пулы Cd-устойчивых клеточных линий пшеницы озимой.

Материалы и методы

Объектом исследования были полученные методом клеточной селекции линии пшеницы озимой сорта Фаворитка селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины. Клеточные линии были отобраны на среде В5 Гамборга с добавлением летальных доз Cd^{2+} [7]. Биомассу наращивали в течение трех пассажей в присутствии токсиканта. Перед проведением эксперимента каллус культивировали в нормальных условиях один пассаж, после чего ткань делили на части. Каллус в равных количествах переносили на среды В5 Гамборга (нормальные условия, н. у.); В5 Гамборга с добавлением летальных доз маннита либо Cd^{2+} (стрессы I, II соответственно).

Анализировали образцы суммарного белка в клетках, растущих в разных условиях. Пробы белка отбирали на стадии логарифмического роста и в конце пассажа (12-е и 35-е сутки соответственно). Каллусную ткань растирали в буфере, состава: глицерин, 10 % SDS, 1M трис-HCl, вода. Экстракцию вели при комнатной температуре в течение 12 часов. Белки разделяли электрофорезом в системе по Лэммли согласно стандартному протоколу в течение 4-х часов [8]. Повторность опыта трехкратная.

Результаты и обсуждение

На селективной среде, содержащей летальные дозы Cd^{2+} , были отобраны устойчивые клеточные линии пшеницы озимой, которые испытывали в условиях моделированного водного стресса. В этих условиях Cd-устойчивые варианты стабильно увеличивали каллусную массу. Использование компонентов питательной среды, их метаболизм и усвоение в обязательном случае происходили с активным образованием белков клеток. При этом логично предположить, что широта белкового спектра может свидетельствовать в пользу разнообразия метаболизма, которое, в свою очередь, может указывать на степень устойчивости варианта.

Ранее нами было установлено, что электрофорез по Лэммли может быть достоверным показателем метаболической активности клеточной культуры [9]. На рисунке 1 представлен белковый спектр двух Cd-устойчивых клеточных линий пшеницы озимой, культивированных в различных условиях (12-е сутки). В это время клеточная культура проходит стадию логарифмического роста, которая характеризуется максимальным количеством митозов. Биомасса культуры растет за счет увеличения числа структурных элементов системы [2].

Представленная на рисунке электрофореграмма отображает имевшийся белковый статус исследованных тканей. Четко прослеживаются два факта. Во-первых, при культивировании в стрессовых условиях обеднения белкового пула, относительно контрольных показателей, не происходило (треки 1, 2, 4, 5). Во-вторых, отмечается отчетливая корреляция между накоплением отдельных белковых фракций и типом стресса. Так, стресс I (летальные дозы маннита) вызывал усиленную аккумуляцию некоторых из них. Можно предположить, что данные белки каким-то образом ассоциированы с поддержанием осмоустойчивости клеток, поскольку это явление отмечалось у обеих Cd-устойчивых клеточных линий. Это особенно актуально для молодых клеток, поскольку у них слабо организованы вакуоли – основные компартменты, ассоциированные с поддержанием осмоустойчивости.

Н. Терлецкая (2012) исследовала влияние суммарных препаратов пептидов, выделенных из растений пшеницы, различающихся по осмоустойчивости, и каллусных культур, инициированных из них, на активность перемещения хлоропластов *Elodea densa*. Было установлено, что осмоустойчивые варианты оказывали больший стимулирующий эффект на тест-объект [10]. Предполагается связь этого события с качественным составом полипептидов. В другой публикации, посвященной исследованию экспрессии белков под воздействием абиотических стрессов, наблюдали такое явление: у проростков гороха после погружения в 0,22 M/l раствор NaCl происходило увеличение концентрации белка – фактора элонгации трансляции (translation elongation factor, EF-2), превышающие контрольные показатели в 2,7 раза. Авторы объясняют этот факт активацией клеточного ответа в процессе адаптации к неблагоприятным воздействиям [11].

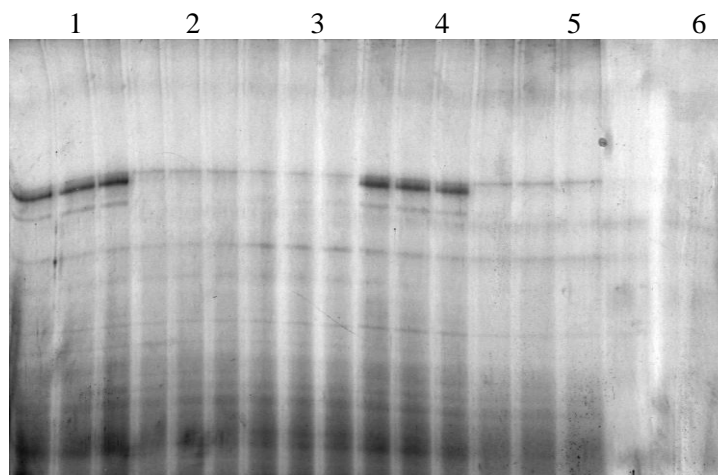


Рис. 1 Белковый спектр каллуса Cd-устойчивых клеточных линий пшеницы озимой. 1–3 линия – № 3; 4–6 линия – № 5; 1, 4 –маннит; 2, 5 – Cd^{2+} ; 3, 6 – нормальные условия.

Поскольку в нашем случае наблюдаемое событие имело место в период прохождения стадии логарифмического роста (12-е сутки пассажа), можно предположить, что оно имело прямое отношение к поддержанию клеточного деления.

В остальном пептидный состав у клеточных линий был аналогичным, не зависел от условий культивирования. Особенно это касается белкового спектра обеих Cd-устойчивых линий пшеницы озимой, проявившегося в присутствии летальных доз Cd^{2+} . Это важное обстоятельство, указывающее, по нашему мнению, на отсутствие стрессовой реакции на действие этих катионов.

Ранее мы отмечали особый феномен, связанный с устойчивостью к ионам кадмия, а именно: увеличение дозы катиона до трехкратно летальной приводило к усилению роста и увеличению накопления сырой биомассы каллуса у Cd-устойчивых клеточных линий табака [2]. Для клеточных вариантов пшеницы такого эксперимента не проделывали. Поэтому нет возможности оценить влияния белка/белков на устойчивость исключительно к Cd^{2+} . В то же время имеется достаточно аргументов в пользу предположения о том, что в результате клеточной селекции с использованием ионов Cd^{2+} отбираются варианты с комплексной устойчивостью, реализующие неспецифические реакции адаптации.

Увеличение срока культивирования влияло на характер белкового пула (рис. 2). Электрофореграмма отображает белковый пул на 35-е сутки культивирования. Отмечается заметное количественное уменьшение мажорной фракции

при культивировании на среде с маннитом. Поскольку это событие отмечали у обеих Cd-устойчивых клеточных линий, то можно предположить, что это является проявлением неспецифических механизмов адаптации, реализованным в процессе роста культуры. Возможно также, что снижение количества белка было вызвано ослаблением синтетических процессов у стареющей культуры.

В то же время радикального качественного изменения белкового пула не происходило. Существенных различий между электрофореграммами белков, проявившихся при воздействии катионов кадмия на разных стадиях развития клеточных культур, не отмечено.

Такие факты, по нашему мнению, могут свидетельствовать в пользу отсутствия стрессового поражения/торможения жизнедеятельности Cd-устойчивых клеточных линий пшеницы озимой т. е. их комплексной устойчивости.

Выводы

У Cd-устойчивых клеточных линий пшеницы озимой при выращивании в условиях различных летальных для культур дикого типа стрессах (ионы Cd^{2+} , маннит) не происходило обеднение общего белкового пула.

Количественное накопление отдельных белковых фракций коррелировало с типом стрессового фактора и особенно проявлялось в присутствии маннита.

Белковый статус Cd-устойчивых клеточных линий пшеницы озимой является отражением адаптивных реакций, определяющих их комплексную устойчивость.

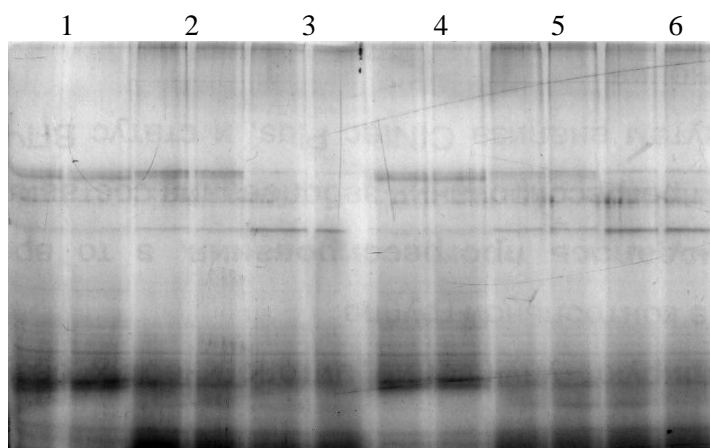


Рис. 2 Белковый спектр каллуса Cd-устойчивых клеточных линий пшеницы озимой. 1–3 линия – № 3; 4–6 линия – № 5; 1, 4 – маннит, 2, 5 – Cd²⁺; 3, 6 – нормальные условия.

References

- Sidorov V.A. Biotekhnologiya rastenii. Kiev: Naukova dumka, 1990. 280 s. [in Russian]. / Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. К.: Наукова думка. 1990. 280 с.
- Sergeeva L.E. Kletochnaya selektsia s ionami tyazholih metallov dlya polucheniya genotipov rastenii s kompleksnoi ustoichivostiu k abioticheskim stressam. Kiev: Logos, 2013. 211 s. [in Russian] / Сергеева Л.Е. Клеточная селекция с ионами тяжелых металлов для получения генотипов растений с комплексной устойчивостью к абиотическим стрессам. К.: Логос, 2013. 211 с.
- Qiang G., Zhai X.-G., Han Z.-X. Cloning and sequence analysis of new gene coding drought tolerance, LEA3 from Tibet hull-less barley. *Zuowu xuebao=Acta Agr. Sin.* 2007. Vol. 33. P. 292–296.
- Tioleter D., Jaquinod M., Mangavel C., Passirani C., Saulner P., Manon S., Teyssier E., Payet N., Avelange-Macherel M.-H., Macherel D. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein by desiccation. *Plant Cell.* 2007. Vol. 19. P. 1580–1587.
- Hu X.-y., Tan X.-f., Tian X.-m. Cloning kDNA, sequences and presumed physiological role of dehydrin-like protein from *Camellia oleifera*. *Xibei zhiwu xuebao=Acta Bot. Boreali-occid. Sin.* 2008. Vol. 28, № 8. P. 1541–1548.
- Seriogin I.V., Ivanov V.B. Fiziologicheskie aspekty toksicheskogo deistviya kadmiya i svintsa na vysshie rasteniya. *Fiziologiya rastenii.* 2002. T. 48. S. 606–630. [in Russian] / Серегин И.В., Иванов В.Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения. *Физиология растений.* 2002. Т. 48. С. 606–630.
- Gamborg J.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean roots. *Exp. Cell Res.* 1968. Vol. 509. P. 151–158.
- Laemmli V.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970. Vol. 227. P. 52–59. P.680.
- Sergeeva L., Dykun M., Bronnikova L. Biotekhnologiya pshenytsi. Proteinovi pul tkanyh roslyn i klitynnykh kultur. *Naukovyi visnyk Sakhidnoevropeiskogo natsionalnogo universitetu im. Lesi Ukrainky Biologichni nauky.* 2017. № 13 (362). S. 32–36. [in Ukrainian] / Сергеева Л., Дыкун М., Бронникова Л. Биотехнология пшеницы. Протеиновый пул тканей растений и клеточных культур. *Научный вестник Северо-восточного национального университета им. Леси Украинки. Биологические науки.* 2017. № 13 (362). С. 32–36.
- Terletskaia N.V. *Nespetsificheskie reaktsii zernovykh zlakov na abioticheskie stressy in vivo i in vitro.* Almaty, 2012. 207 s. [in Russian] / Терлецкая Н.В. Неспецифические реакции зерновых злаков на абиотические стрессы *in vivo* и *in vitro*. Алматы, 2012. 207 с.
- Nesterenko O.G., Litvinov S.V., Rashydov N.M. Zmina ekspresii bilkiv pid chas vzaemodii sygnalnykh system u prorostkiv gorokhu pid vplyvom stresovykh faktoriv. *Faktory eksperymentalnoi evoliutsii organizmiv: zbirnyk nauk. prats.* 2018. T. 22. S. 154–161. [in Ukrainian] / Нестеренко О.Г., Литвінов С.В., Рашидов Н.М. Зміна експресії білків під час взаємодії сигнальних систем у проростків гороху під впливом стресових факторів. *Фактори експериментальної еволюції організмів: збірник наук. праць.* 2018. Т. 22. С. 154–161.

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

Institute of Plant Physiology and Genetics, Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: Zlenko_lora@ukr.net

PROTEIN STATUS OF WINTER WHEAT CELL LINES WITH COMBINED TOLERANCE TO ABIOTIC STRESSES

Aim. Winter wheat cell lines were selected on medium with the addition of lethal doses of Cd²⁺ cations. Those variants demonstrated stable growth under osmotic stress pressure. The aim of the investigation was the estimation of cell protein status during cultivation under various conditions. **Methods.** Cd-resistant cell lines of winter wheat (cv. Favoritka)

were cultivated under normal conditions and on cultural media with addition of lethal doses of manitol or Cd^{2+} (stresses I, II). From calli tissues crude protein matter was obtained and detected by Laemmli system electrophoresis. **Results.** Cd-resistant winter cell lines showed stable growth under any abiotic stress pressure. Electrophoregrams demonstrated peculiar features of some protein fraction accumulation that correlated with the age of cultures and type of stress agent. **Conclusions.** There were no decrease of total protein pools in calli tissues during cell cultivation under any (manitol, Cd^{2+}) lethal stress pressure. The quantitative accumulation of some protein fractions were correlated with the type of stress agent. This event was especially manifested in variants, cultivated on media with manitol addition. Protein status of Cd-resistant cell lines of winter wheat is the reflection of their combined stress tolerance.

Keywords: winter wheat, cell selection, cadmium ions, osmotic stress, tolerant cell line, protein.

СЕРГЄЄВА Л. Є., ДИКУН М. О., БРОННІКОВА Л. І.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: Zlenko_lora@ukr.net

БІЛКОВИЙ СТАТУС КЛІТИННИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ ІЗ КОМПЛЕКСНОЮ СТІЙКІСТЮ ДО АБІОТИЧНИХ СТРЕСІВ

Мета. Клітинні лінії пшениці озимої, відібрані на селективному середовищі із додаванням летальних доз катіону Cd^{2+} , проявляли стабільний ріст за дії осмотичного стресу. Метою роботи було встановлення особливостей білкового статусу стійких клітин упродовж культивування за різних умов. **Методи.** Культура клітин: Cd-стійкі клітинні лінії пшениці озимої сорту Фаворитка культивували за нормальних умов і за наявності летальних доз маніту та Cd^{2+} , відповідно стреси I і II. Із калусних культур одного пасажу виділяли препарати сумарного білка, які розділяли електрофорезом у системі Леммлі. **Результати.** Cd-стійкі клітинні лінії пшениці озимої демонстрували стабільний ріст за умов будь-якого летального (іонний, осмотичний) стресу. Електрофореграми виявили особливості накопичення фракцій протеїнів, залежні від віку культури та типу стресового чинника. **Висновки.** У Cd-стійких клітинних ліній пшениці озимої під час вирощування за умов різних летальних для культур дикої типу стресів (іони Cd^{2+} , маніт) не відбувалося збіднення загального білкового пулу. Кількісне накопичення окремих білкових фракцій корелювало із типом стресового чинника та особливо проявлялось за наявності маніту. Білковий статус Cd-стійких клітинних ліній пшениці озимої є відображенням адаптивних реакцій, які визначають їхню комплексну стійкість.

Ключові слова: пшениця озима, клітинна селекція, іони кадмію, осмотичний стрес, стійка клітинна лінія, білок.