

СЕРГЕЕВА Л.Е., БРОННИКОВА Л.И.✉

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,  
Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17*✉ *Zlenko\_lora@ukr.net, (096) 753-16-32, (095) 127-91-32, (095) 616-43-04*

## КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ С ИОНАМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ДЛЯ ОТБОРА ФОРМ ПШЕНИЦЫ И КУКУРУЗЫ, УСТОЙЧИВЫХ К ОСМОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ

**Цель.** Получение вариантов пшеницы и кукурузы, устойчивых к водному и солевому стрессам, методом клеточной селекции с использованием катионов тяжёлых металлов бария и кадмия. Катион бария нарушает клеточный транспорт ионов калия. Катион кадмия воздействует на дегидрины. Стабилизация этих параметров в стрессовых условиях способствует устойчивости растения. **Методы.** Селективные среды для первичной селекции создавали прибавлением летальных доз ионов тяжелых металлов. Проводили процедуру плейтинга суспензионных культур кукурузы и пшеницы на селективные среды. Устойчивость вариантов оценивали по измерению относительного прироста сырой биомассы каллуса. **Результаты.** Получены Ва-устойчивые и Cd-устойчивые клеточные линии растений. Эти варианты испытывались в условиях действия летальных для клеток дикого типа солевого и водного стрессов. Клеточные линии проявляли комплексную устойчивость к абиотическим стрессам. **Выводы.** Клеточная селекция с использованием ионов тяжелых металлов – новый способ отбора клеточных вариантов с повышенным уровнем устойчивости к осмотическим стрессам.

**Ключевые слова:** злаки, осмотические стрессы, клеточная селекция с ионами тяжелых металлов, комплексная устойчивость.

Проблема стресса/устойчивости организмов вообще и растений в частности была и будет одной из наиболее сложных среди фундаментальных проблем. Возрастающее ухудшение окружающей среды и резкая перемена климата в планетарном масштабе делают эту проблему первоочередной. Параллельно с решением теоретических вопросов возникает острая потребность в новых формах растений, отличающихся исключительными характеристиками, которые могли бы обеспечить выживание как в условиях постоянно действующего стресса, так и при смене параметров окружающей среды.

Очевидно, что традиционные способы достижения цели перестают удовлетворять возрастающие потребности. Возникает необходимость в выдвигании креативных идей. Приоритетные роли начинают играть альтернативные методы: биотехнологические методологии, клеточная селекция.

Клеточная селекция как таковая насчитывает не один десяток лет динамичного развития и положительных результатов [1]. Используется данный метод и для получения растений с повышенным уровнем устойчивости к абиотическим стрессам. В то же время за длительный период использования клеточная селекция нередко не давала ощутимых преимуществ. Рядом авторов отмечались ее существенные недостатки [2]. Поэтому назрела необходимость существенного расширения (пересмотра) данного метода в сторону новых направлений. Здесь, однако, как в любой другой методологии, следует учитывать некоторые ключевые позиции, а именно: выбор типа селективного агента, его начальную концентрацию, маркер селекции. Если в качестве селективного фактора использовать стрессор, отличающийся широким спектром токсического воздействия, можно отобрать варианты с комплексной стрессоустойчивостью. К тому же в этом случае эта характеристика будет следствием генетических изменений, но не физиологической адаптацией.

В ряде стрессовых агентов выделяются ионы тяжелых металлов (ИТМ), особенно токсичные в следовых количествах [3]. Они характеризуются широким спектром патологического действия. Опираясь на эти данные, нами была выдвинута (и подтверждена) гипотеза о целесообразности использования некоторых ИТМ для отбора клеточных вариантов, устойчивых к абиотическим стрессам [4]. Для первичной селекции были выбраны катионы бария ( $Ba^{2+}$ ) и кадмия ( $Cd^{2+}$ ).

Среди абиотических стрессов наиболее агрессивными считаются разновидности осмо-

© СЕРГЕЕВА Л.Е., БРОННИКОВА Л.И.

тического стресса – засоление и водный дефицит. В связи с наметившимся глобальным потеплением проблема дефицита влаги возникает даже в регионах, считавшихся прежде вполне благополучными. Речь идет уже о нехватке пресной воды для питья и нормальной жизнедеятельности людей, а не только для сельскохозяйственных нужд. Приоритетной становится задача получения растений с повышенным уровнем соле- и засухоустойчивости.

Ионы  $Cd^{2+}$  широко изучены. Так, было обнаружено, что данные катионы отличаются разносторонним отрицательным действием [5]. Негативное влияние  $Cd^{2+}$  оказывает на белки поздней стадии эмбриогенеза (LEA). К LEA относятся дегидрины, обогащенные глицином, гистидином, лизином протеины. Установлено, что защитная роль дегидринов состоит в предупреждении коагуляции молекул и поддержании целостности клеточных мембран [68]. Это становится особенно актуальным при обезвоживании.

Напротив, ионы  $Ba^{2+}$  изучены односторонне, а именно с точки зрения их конфликта с физиологически актуальными катионами  $K^+$ . Ионы  $Ba^{2+}$  влияют на транспорт  $K^+$  через клеточные мембраны [9]. С другой стороны, известно, что засоление приводит к радикальной потере ионов калия.

Это послужило базисом для наших дальнейших действий. Исходя из имеющихся данных, мы использовали ИТМ в клеточной селекции для отбора форм, устойчивых к осмотическим стрессам. Клеточные культуры табака, полученные таким способом, выдерживали летальные дозы засоления и водного стресса, а растения-регенеранты и семенное потомство, полученное из них, по уровню устойчивости были сопоставимы с природными ксерофитами и галофитами [4]. Этот подход мы решили использовать в клеточной селекции кукурузы и пшеницы.

### Материалы и методы

В качестве объекта эксперимента были выбраны генотипы кукурузы инбредной линии Л-250 и пшеницы сортов Достаток и Володарка. Оригинатором исходного материала является Институт физиологии растений и генетики НАН Украины. Отобранные зрелые зерновки стерилизовали и в асептических условиях проращивали на безгормональной среде Мурасиге-Скуга [10]. По достижению проростками длины 0,8–

1,5 см проростки разрезали на сегменты толщиной 0,1 см и переносили на агаризованную питательную среду В5 Гамборга [11]. После индукции каллуса его наращивали в течение трех пассажей, а затем переносили в жидкую среду того же состава. После двух пассажей в жидкой среде получали суспензионную культуру, состоящую из единичных клеток и мелкоклеточных кластеров. Такую культуру подвергали процедуре плейтинга в селективных условиях.

Для первичной селекции с ИТМ были созданы селективные системы отбора. С этой целью к питательной среде В5 прибавляли летальные дозы ионов  $Ba^{2+}$  либо  $Cd^{2+}$ , подсчитанных в предварительных экспериментах. Такими концентрациями считали минимальные количества токсикантов, элиминирующих клеточные культуры дикого типа.

Процедура плейтинга состоит в равномерном распределении клеточной суспензии между двумя слоями селективной среды [12]. Таким образом вся платированная клеточная масса подвергается летальному стрессовому давлению, вследствие чего нормальные клетки элиминируют. Выживают исключительно генетически измененные варианты. На их статус указывает частота образования ( $\sim 10^{-6}$ ). Выжившие клетки образуют клеточные линии, соответственно маркированные как Cd-устойчивые, Cd-УКЛ и Ba-устойчивые, Ba-УКЛ клеточные линии.

В течение 2–3 пассажей клеточные варианты культивировали на контрольной среде В5 для ускорения нарастания биомассы каллуса. Образовавшуюся каллусную массу делили на части и в равной мере перемещали в селективные условия. Ими были среды, содержащие ИТМ, и среды с добавлением летальных доз засоления либо маннита. В дальнейшем культивирование проводили в различных условиях. Каждый дискретный пассаж мог быть аналогичным предыдущему либо отличаться. При этом вариации могли быть нескольких типов: (стресс  $\rightarrow$  норма; норма  $\rightarrow$  стресс; стресс1  $\rightarrow$  стресс2). Ротация сред была произвольная.

Маркером устойчивости служил относительный прирост свежей биомассы каллуса, (Дм), определяемый:  $Дм = (m_k - m_i) / m_i$ , где  $m_i$  и  $m_k$  – исходная и конечная массы каллуса соответственно [12–14].

### Результаты и обсуждение

На селективных средах, содержащих

ИТМ, были отобраны устойчивые клеточные линии кукурузы и пшеницы. По достижении необходимой массы линии начинали тестировать в различных условиях. В таблицах 1, 2 в качестве примера проиллюстрированы отдельные примеры таких испытаний.

Как видно из таблиц, отобранные на селективных средах с ИТМ клеточные линии от-

личались комплексной устойчивостью к абиотическим стрессам. Следует отметить, что показатель относительного прироста биомассы, измеренный в отсутствие стрессов, превышает показатели, отмеченные в стрессовых условиях. Однако здесь следует корректно оценивать происшедшие события, поскольку они могут подчеркивать либо отрицать явление устойчивости.

Таблица 1. Относительный прирост биомассы каллуса генотипов кукурузы при выращивании в различных условиях

Условия культивирования	Клеточные культуры кукурузы, ( $\Delta m$ )		
	Контроль, Л-250	Л-250, Cd-УКЛ № 1	Л-250, Cd-УКЛ № 4
Нормальные условия	4,16 ± 0,11	5,21 ± 0,09	3,44 ± 0,31
Cd <sup>2+</sup>	Гибнет	4,24 ± 0,16	2,96 ± 0,23
0,8М маннит	Гибнет	0,98 ± 0,21	1,02 ± 0,11

Таблица 2. Относительный прирост биомассы каллуса Ва-устойчивых клеточных линий злаков при выращивании в разных условиях

Генотип, (УКЛ)	Относительный прирост биомассы, ( $\Delta m$ )			
	Пит. среда, В5, норм. условия	В5 + Ва <sup>2+</sup>	В5 + соли мор. воды	В5 + сульфат натрия
<b>Кукуруза</b> , Л-250 Ва-УКЛ № 1	1,77 ± 0,09	1,38 ± 0,18	0,34 ± 0,07	0,19 ± 0,01
ВаУКЛ № 3	0,73 ± 0,15	0,52 ± 0,10	0,24 ± 0,02	0,33 ± 0,02
<b>Пшеница</b> Володарка				
Ва-УКЛ № 2	0,64 ± 0,09	0,36 ± 0,03	0,12 ± 0,04	0,15 ± 0,02
Достаток				
Ва-УКЛ № 2	1,49 ± 0,13	0,43 ± 0,10	0,39 ± 0,03	0,48 ± 0,09

Стрессоустойчивость как характеристика не является абсолютом. В природе существует широкий спектр растений, различающихся по уровню устойчивости. Эта градация существует даже в пределах генотипов с повышенным уровнем устойчивости (галофитов, ксерофитов). Для определения устойчивости мы выбрали летальные концентрации стрессовых агентов. Поэтому рост и развитие культур в таких жестких условиях, по нашему мнению, адекватно указывает на их устойчивость. На активную адаптацию также указывают различия в абсолютных величинах показателя  $\Delta m$ , измеренного на фоне действия различных стрессов.

Так,  $\Delta m$  у Cd-УКЛ наименьший при культивировании в условиях водного стресса (табл. 1). Наши предыдущие эксперименты подробно показали причину этого события, а именно некоторое обезвоживание клеток, не достигающее, однако, критического порога [4]. Стабилизация водного статуса, возможно, была следствием новых качеств дегидринов. Показа-

тельно также явление роста культур на средах, содержащих катионы кадмия. Такое событие наблюдалось для устойчивых клеточных линий других растений. А Cd-УКЛ табака характеризовались даже усилением пролиферации в таких условиях [4]. Возможно, это связано со структурной аналогией между ионными радиусами Ca<sup>2+</sup> и Cd<sup>2+</sup>, а также их транспортом общими каналами [15, 16].

В таблице 1 приведены показатели, относящиеся к устойчивым линиям кукурузы. Аналогичные ростовые характеристики демонстрировали и варианты пшеницы. Поэтому можно высказать предположение о системности адаптационных процессов, поддерживающих рост клеток при водном стрессе.

Имеют отличительные черты и Ва-УКЛ. При культивировании в стрессовых условиях происходило также уменьшение относительного прироста свежей биомассы относительно нормальных условий (табл. 2). У Ва-УКЛ кукурузы, культивированных на селективных средах, наи-

большее по абсолютной величине значение Дм отмечали в присутствии катионов бария. У Ва-УКЛ пшеницы этот параметр превышал либо был сопоставим с другими значениями. Нами было показано, что присутствие  $\text{Ba}^{2+}$  в культуральной среде приводит к активной аккумуляции  $\text{K}^+$  в клетках каллуса [4]. Имеются сведения о том, что быстрый выброс  $\text{K}^+$  может снижать активность метаболизма [17]. Очевидно, наличие катионов  $\text{K}^+$  способствовало пролиферации.

Засоление существенно снижало Дм. П. Хасегава с соавторами (2000) указывали на эту особенность солеустойчивых клеточных культур [18]. Таким образом, такое событие только подтверждало характеристику солеустойчивости, проявленную вариантами в наших экспериментах. Что касается реакции на тип засоления (соли морской воды – сульфатно-хлоридное

засоление и сульфат натрия), то мы видим реакции конкретных линий. Возможно, таким образом клетки реагируют на присутствие токсических анионов.

Устойчивость к осмотическим стрессам – это полигенная характеристика. В ее реализации задействованы множественные механизмы. В результате наших экспериментов становится очевидным, что комплексная устойчивость может гарантировать жизнедеятельность как при постоянном стрессе, так и при смене условий культивирования.

### Выводы

Клеточная селекция с использованием ионов тяжелых металлов – новый способ отбора клеточных вариантов с повышенным уровнем устойчивости к осмотическим стрессам.

### Литература

1. Maliga P. Isolation and characterization of mutants in plant cell culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1984. 35. P. 519–542.
2. Dracup M. Why does in vitro cell selection not improve the salt tolerance of plants? Genetic aspects of plant mineral nutrition / Eds. Randall P.J. et al. Kluwer Academic Publishers, 1993. P. 137–142.
3. Nies D.H. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999. 51. P. 730–750.
4. Сергеева Л.Е. Клеточная селекция с ионами тяжелых металлов для получения генотипов растений с комплексной устойчивостью к абиотическим стрессам. К.: Логос, 2013, 211 с.
5. Серёгин И.В., Иванов В.Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения. *Физиология растений.* 2001. 48. С. 606–630.
6. Campbell S., Close T.J. Dehydrins: Genes, proteins and association with phenotypic traits. *New Phytol.* 1997. 137. P. 61–74.
7. Аллагулова Ч.Р., Гималов Ф.Р., Шакирова Ф.М., Вахитов В.А. Дегидрины растений: их структура и предполагаемые функции. *Биохимия.* 2004. 68. С. 1157–1165.
8. Hara M., Fujinaga M., Kuboi M. Metal binding by citrus dehydrin with histidine rich domains. *J. Exp. Bot.* 2005. 56. P. 2695–2703.
9. Fan L.-M., Wu W.-H., Yang Y.-Y. Identification and characterization the inward  $\text{K}^+$  channel in the plasma membrane of *Brassica* pollen protoplasts. *Plant and Cell Physiol.* 1999. 40, № 8. p. 859–865.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 1962. 15. P. 473–497.
11. Gamborg J.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean roots. *Exp. Cell Res.* 1968. 509. P. 151–158.
12. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. К.: Наукова думка, 1990. 280 с.
13. Сергеева Л.Е. Изменения культуры клеток под действием стресса. К.: Логос, 2001. 100 с.
14. Meredith C.P. Selection and characterization of aluminum-resistant variants from tomato cell cultures. *Plant Sci. Lett.* 1978. 12. P. 25–34.
15. Dziubinska H., Filek M., Krol E., Trebacz K. Cadmium and selenium modulate slow vacuolar channels in rape (*Brassica napus*) vacuoles. *J. Plant. Physiol.* 2010. 167. P. 1566–1570.
16. Bondgaard M., Bjerregaard P. Association between cadmium and calcium uptake and distribution during the moult cycle of female shore crabs *Carcinus maens*: an in vivo study. *Aquat. Toxicol.* 2005. 72. P. 17–28.
17. Мелехов Е.И., Анев В.Н. Обратимый выход  $\text{K}^+$  из клетки как защитная реакция на неблагоприятные воздействия. *Журн. общей биол.* 1991. 52. С. 14–26
18. 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.

### References

1. Maliga P. Isolation and characterization of mutants in plant cell culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1984. 35. P. 519–542.
2. Dracup M. Why does in vitro cell selection not improve the salt tolerance of plants? Genetic aspects of plant mineral nutrition / Eds. Randall P.J. et al. Kluwer Academic Publishers, 1993. P. 137–142.
3. Nies D.H. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999. 51. P. 730–750.
4. Sergeeva L.E. Cell selection with heavy metal ions for obtaining plant genotypes with combined resistance to abiotic stresses. Kiev: Logos, 2013. 211 s.
5. Seregin I.V., Ivanov V.B. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on the higher plants. *Russ. J. Plant Phys.*

2001. 48. S. 606–630.
6. Campbell S., Close T.J. Dehydrins: Genes, proteins and association with phenotypic traits. *New Phytol.* 1997. 137. P. 61–74.
  7. Allagulova Ch.R., Gimalov F.R., Shakirova F.M., Vakhitov V.A. Plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry (Moscow)*. 2004. 68. S. 1157–1165.
  8. Hara M., Fujinaga M., Kuboi M. Metal binding by citrus dehydrin with histidine rich domains. *J. Exp. Bot.* 2005. 56. P. 2695–2703.
  9. Fan L.-M., Wu W.-H., Yang Y.-Y. Identification and characterization the inward K<sup>+</sup> channel in the plasma membrane of *Brassica* pollen protoplasts. *Plant and Cell Physiol.* 1999. 40, № 8. p. 859–865.
  10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 1962. 15. P. 473–497.
  11. Gamborg J.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean roots. *Exp. Cell Res.* 1968. 509. P. 151–158.
  12. Sidorov V.A. Plant biotechnology. Cell selection. Kiev: Naukova dumka, 1990. 280 s.
  13. Sergeeva L.S. Changes of cell cultures under stress conditions. Kiev: Logos, 2001. 100 s.
  14. Meredith C.P. Selection and characterization of aluminum-resistant variants from tomato cell cultures. *Plant Sci. Lett.* 1978. 12. P. 25–34.
  15. Dziubinska H., Filek M., Krol E., Trebacz K. Cadmium and selenium modulate slow vacuolar channels in rape (*Brassica napus*) vacuoles. *J. Plant. Physiol.* 2010. 167. P. 1566–1570.
  16. Bondgaard M., Bjerregaard P. Association between cadmium and calcium uptake and distribution during the moult cycle of female shore crabs *Carcinus maenas*: an in vivo study. *Aquat. Toxicol.* 2005. 72. P. 17–28.
  17. Melekhov E.I., Anev V.N. Reversible efflux of K<sup>+</sup> from cell as a defense reaction to unfavourable conditions. *J. Gen. Biology (Moscow)*. 1991. 52. S. 14–26
  18. 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.

#### SERGEEVA L.E., 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*

#### CELL SELECTION WITH HEAVY METAL IONS FOR OBTAINING WHEAT AND MAIZE FORMS TOLERANT TO OSMOTIC STRESSES

**Aim.** The obtaining tolerant to salt and water stresses wheat and maize variants via cell selection with barium and cadmium heavy metal cations were the idea. Barium cations disrupt the cell potassium transport. Cadmium cations affect the dehydrins. The maintenance of these parameters under stress conditions provides the plant tolerance. **Methods.** Modified media for initial selection were developed by the supplement of the lethal doses of heavy metal ions. Wheat and maize suspension cultures were plated on selective media. The relative fresh biomass growth was the marker of variant stress tolerance. **Results.** Ba-resistant and Cd-resistant plant cell lines were obtained. Those variants were tested under salinity and water stress pressure at lethal for wild type cells doses. Cell lines demonstrated the combined tolerance to abiotic stresses. **Conclusions.** The cell selection with heavy metal ions – is a new approach for isolation cell variants with higher levels of osmotic stresses tolerance.

**Keywords:** cereals, osmotic stresses, cell selection with heavy metal ions, combined tolerance.

#### СЕРГЄЄВА Л.Є., БРОННІКОВА Л.І.

*Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: Zlenko\_lora@ukr.net*

#### КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ З ІОНАМИ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ ДЛЯ ВІДБОРУ ФОРМ ПШЕНИЦІ ТА КУКУРУДЗИ, СТІЙКИХ ДО ОСМОТИЧНИХ СТРЕСІВ

**Мета.** Отримання варіантів пшениці та кукурудзи, стійких до водного та сольового стресів, методом клітинної селекції з використанням катіонів важких металів барію та кадмію. Катіон барію порушує клітинний транспорт іонів калію. Катіон кадмію впливає на дегідрини. Стабілізація цих параметрів за стресових умов сприяє стійкості рослини. **Методи.** Селективні середовища для первинної селекції створювали додаванням летальних доз іонів важких металів. Здійснювали процедуру плейтингу суспензійних культур кукурудзи та пшениці на селективні середовища. Стійкість варіантів оцінювали вимірюванням відносного приросту сирої біомаси калусу. **Результати.** Отримані Ва-стійкі та Cd-стійкі клітинні лінії рослин. Ці варіанти випробовувались за умов дії летальних для клітин дикою типу сольового та водного стресів. Клітинні лінії проявляли комплексну стійкість до абіотичних стресів. **Висновки.** Клітинна селекція із використанням іонів важких металів – новий спосіб відбору клітинних варіантів із підвищеним рівнем стійкості до осмотичних стресів.

**Ключові слова:** злаки, осмотичні стреси, клітинна селекція з іонами важких металів, осмотичні стреси, комплексна стійкість.