

УДК 581.196.143.6

ВАРЬИРОВАНИЕ УРОВНЯ СВОБОДНОГО ПРОЛИНА У W-УСТОЙЧИВОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ СОИ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА РАЗЛИЧНОМ СТРЕССОВОМ ФОНЕ

С.И. МИХАЛЬСКАЯ, Е.И. ПОРЕЦКАЯ, Л.Е. СЕРГЕЕВА

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17
e-mail: dubrovny@ukr.net

В W-устойчивой клеточной линии сои, которую культивировали в присутствии анионов WO_4^{2-} ; VO_3^- ; ClO_3^- и на контрольной среде изучали динамику содержания уровня свободного пролина. Селективные среды с ионами вольфрама или ванадия содержали только нитраты; селективные среды с $KClO_3$ содержали либо нитратную, либо аммиачную форму азота. Уровень свободного пролина в клетках при культивировании в стрессовых условиях превышал контрольный показатель от 1,5 до 4,9 раз. Однако комплексная устойчивость линии сои связана скорее с реализацией зависимых от условий культивирования механизмов его синтеза/деградации, отражающейся в различном характере колебаний уровня свободного пролина.

Ключевые слова: соя, пролин, ионы вольфрама и ванадия, хлораты, устойчивость

Вступление. Для гарантированного отбора клеточных линий с повышенным уровнем устойчивости к какому-либо стрессору (комплексу стрессовых факторов) необходим выбор адекватного маркера селекции. Это особенно актуально, поскольку некоторые авторы предполагают, что стресс-устойчивость контролируется всем генотипом растения [1].

Одним из признанных маркеров устойчивости растения считается пролин. Многочисленные публикации свидетельствуют в пользу его протекторного действия при стрессах. Одни авторы подчеркивают осморегулирующие свойства пролина [2, 3]. Другие исследователи указывают на данную аминокислоту как на источник энергии, углерода и азота в условиях вызванного стрессом дефицита ресурсов и снижения активности ферментов синтеза [4–6]. Установлены также другие функции пролина, в том числе его роль в экспрессии генов [7,8].

В настоящее время известны два пути биосинтеза пролина: глутаматный и орнитинный [9]. Изучается катаболизм пролина и его регуляция [10, 11]. Однако имеется немало публикаций, в которых отмечен минорный вклад пролина в поддержание стресс-устойчивости генотипов [12, 13]. В особенности это касается стрессов, вызванных действием ионов тяжелых металлов. Подавляющее большинство авторов связывают детоксикацию этих стрессовых агентов с образованием фито-

хелатинов [14, 15]. Индукцию этих соединений вызывают практически все изучаемые в настоящее время ионы металлов.

Проблема устойчивости к ионам тяжелых металлов, несмотря на очевидные достижения, далека от исчерпания. Во-первых, по причине чрезвычайного генотипически зависимого разнообразия уровней чувствительности к различным ионам. Во-вторых, вследствие незначительного числа экспериментально полученных форм растений. Иногда устойчивостью к ионам тяжелых металлов отличались формы, экспериментально отобранные по признаку увеличения какого-либо биохимического показателя, например пролина [16]. В-третьих, изложенное выше касается исключительно катионов тяжелых металлов. В том случае, если металл присутствует в составе аниона, что делает его гораздо более токсичным, сведения о механизмах устойчивости вообще отсутствуют. До настоящего времени известны единичные публикации, описывающие результаты получения форм, устойчивых к анионам тяжелых металлов. К тому же это касается прокариот [17].

В наших экспериментах впервые получены клеточные линии растений, устойчивые к анионам вольфрама и ванадия [18, 19]. В течение всего срока культивирования отобранные линии сои отличались комплексной устойчивостью. Эти клоны росли на селективных средах с ионами WO_4^{2-} ; VO_3^- , усваивая только нитратную форму азота. Признак устойчивости у них сохраняется более пяти лет. Такие условия культивирования (сочетание W^{+6} и NO_3^- либо V^{+5} и NO_3^-) совершенно исключены при выращивании нормальных клеточных культур, ввиду полного ингибирования нитратредуктазы (НР) — пер-

вого фермента в цепи усвоения нитратов. Кроме того, концентрации ионов тяжелых металлов, используемые в эксперименте, летальны для культур дикого типа (“абсолютный селектирующий фактор”).

Чтобы установить, сопряжена ли устойчивость экспериментально отобранных клеточных линий сои с накоплением свободного пролина, анализировали динамику его содержания в течение пассажа. Для данной клеточной линии этот вопрос представляет исключительный интерес. Ранее было установлено отрицательное воздействие пролина на активность нитратредуктазы [20, 21]. Устойчивая клеточная линия растет, используя нитраты даже в присутствии неорганических ингибиторов НР. Следовательно, и биохимическая цепь метаболизма пролина должна определяться активностью систем усвоения азота вообще и с НР, в частности.

Материалы и методы

Объектом исследования выступали длительно культивируемые W-устойчивые клеточные линии сои сорта Киевская-27. Ранее они были отобраны на модифицированной селективной среде B_5 Гамборга, содержащей азот только в форме нитрата и вольфрамат-анион в концентрации 1мМ, летальной для клеточных культур дикого типа. До начала эксперимента данные клоны культивировали на различных средах: контрольной и четырех селективных (1W; 1V; $KClO_3$; $KClO_3$ -м). Селективные среды 1W и 1V различались селективными анионами: 1мМ ионов вольфрама либо ванадия, соответственно. Культуральные среды $KClO_3$ и $KClO_3$ -м различались формами азота в своих составах: в первом случае присутствовал азот только в аммиачной форме, во

втором — только нитратной. Стрессором выступал хлорат калия (20 мМ $KClO_3$). Количество азота были равны во всех видах сред, кроме среды с $KClO_3$, концентрации ионов WO_4^{2-} ; VO_3^- ; ClO_3^- были летальны для клеточных культур дикого типа.

Пролин определяли в течение пассажа по модифицированной методике Чинарда [22]. Навеску растительной ткани растирали в 10%-ном растворе сульфосалициловой кислоты и фильтровали. К 2,0 мл фильтрата прибавляли 2,0 мл нингидринового реактива, приготовленного без нагревания (к 1,25 г нингидрина прибавляли 30,0 мл ледяной уксусной кислоты, 20,0 мл 6М раствора ортофосфорной кислоты) и 2,0 мл ледяной уксусной кислоты. Реакционную смесь выдерживали на водяной бане при 100 °С в течение 1 часа. По истечении времени смесь быстро охлаждали до комнатной температуры и переносили в делительную воронку с 4,0 мл толуола. После встряхивания окрашенный слой отделяли и колориметрировали против толуола при длине волны $\lambda=520$ нм. Калибровочную кривую строили по кристаллическому пролину. Статистическую обработку проводили по Рокицкому [23].

Результаты и обсуждение

Уровень свободного пролина — показатель чрезвычайно динамичный [9, 24]. В связи с этим оценивать этот параметр представляется целесообразным, соотнося со стадией развития клеточной культуры. На рис. 1 и 2 представлены данные по содержанию свободного пролина, измеренные на 7, 14 и 21 день пассирования. Первая точка соответствует началу стадии максимального деления клеток, которая длится до 14 дня. Период с 14 по 21 день отражает стадию стационарного

роста клеток. С 21 дня культура начинает стареть, а среда соответственно истощается и подсыхает.

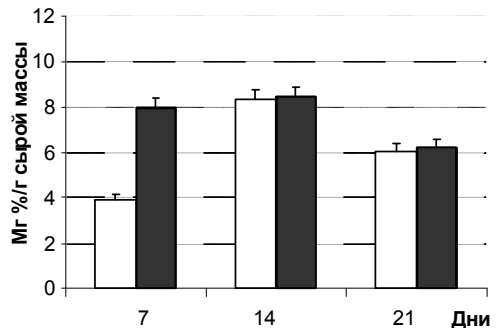


Рис. 1. Содержание свободного пролина в клетках W-устойчивой линии сои при культивировании на селективных средах с ионами W^{+6} и V^{+5}

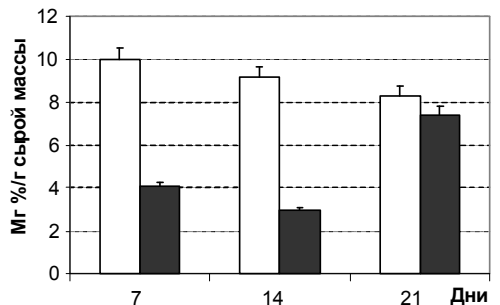


Рис. 2. Содержание свободного пролина в клетках W-устойчивой клеточной линии сои при культивировании на селективных средах с добавлением аммиачной (среда $KClO_3$) и нитратной (среда $KClO_3-M$) форм азота.

Рис. 1 отражает изменения уровня свободного пролина в каллусе W-устойчивой клеточной линии при ее культивировании в присутствии различных анионов стрессоров. Поскольку в составе сред азот присутствует только в виде нитратов, то весь измеряемый пролин эндогенного происхождения. Очевидно, что поддержание необходимого его уровня обеспечивается за счет его биосинтеза, а не за счет дегградации белков клетки, поскольку культура растет, увеличивая биомассу.

Однако интенсивность его синтеза (до 14 дня) различна, что скорее всего является результатом влияния вольфрамата и ванадата на поглощение нитратов и активность нитратредуктазы [25]. Не исключено также, что содержание пролина в начале стадии экспоненциального роста является ответной реакцией W-устойчивой клеточной линии на летальную дозу другого стрессора — оксианиона ванадия. Снижение уровня свободного пролина к 21 дню культивирования указывает на снижение синтетической активности клеток в стареющей культуре.

На рис. 2 отображены колебания уровня свободного пролина в клетках W-устойчивой линии сои при культивировании на средах с хлоратом калия, различавшихся по типу использования азота. Среда $KClO_3$ содержит только аммиачную форму, поэтому высокий уровень пролина в каллусе при выращивании на среде $KClO_3$ может поддерживаться и за счет его синтеза из аминокислотного пула по глутаматному пути, и за счет прямого потребления из культуральной среды. В среде $KClO_3$ -м присутствует азот только в нитратной форме. Поэтому весь имеющийся пролин эндогенного происхождения. Уровень аминокислоты колеблется в пределах пассажа. Наблюдаемая тенденция к ее снижению на 14 день может указывать на повышенное потребление пролина делящимися растущими клетками, поскольку на конец 2-ой недели культивирования приходится завершение стадии логарифмического роста. Далее уровень пролина снова растет. К концу пассажа (21 день) содержание пролина выравнивается за счет увеличения его синтеза у клеток, растущих на среде $KClO_3$ -м.

Селективные среды, на которых культивировали W-устойчивую клеточ-

ную линию сои, содержат химические соединения, оказывающие ингибирующее действие на фермент нитратредуктазу. Однако наблюдаемый в эксперименте синтез пролина в клетках каллуса, культивируемых на средах 1V; 1W; $KClO_3$ -м, прямо свидетельствует в пользу усвоения нитратов, т.е. наличия события ферментативной нитрат-редукции. В составе среды $KClO_3$ присутствует азот только в аммиачной форме. В тоже время говорить об отсутствии активности НР некорректно, поскольку субстратом для данного фермента являются не только ионы NO_3^- , но и ионы ClO_3^- . (На свойстве НР восстанавливать хлораты в хлориты основан метод отбора дефектных по нитратредуктазе клеточных линий растений). W-устойчивая линия сои растет (увеличивает биомассу) на всех вариантах селективных сред. Рост обеспечивается за счет активного функционирования ферментов метаболизма, что отражается, в том числе, и на динамике накопления/расходования свободного пролина.

Очевидно, что колебания содержания свободного пролина в ходе эксперимента связано с изменениями состояния культуры. Изменения обусловлены двумя причинами. С одной стороны (как указывалось выше), это естественные “возрастные” изменения клеточной системы *in vitro*. С другой — это адаптация к конкретному стрессовому агенту. О реакции на присутствие стрессора указывало увеличение абсолютной величины измеряемого параметра. При культивировании в нормальных условиях уровень свободного пролина в точке максимума соответствовал $1,9 \pm 0,62$ мг %/г сырой массы, что меньше значений в стрессовых условиях от 1,5 до 4,9 раз (рис. 3). Полученные количественные показатели

содержания свободного пролина отвечают этим параметрам, приводимым другими исследователями, которые поддерживают гипотезу о ведущей роли пролина в стресс — устойчивости растений [9].

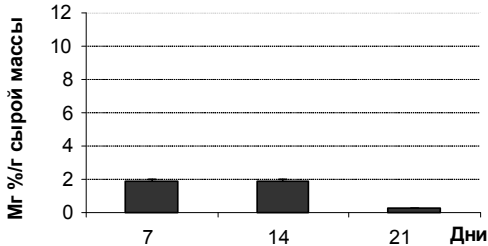


Рис. 3. Содержание свободного пролина в клетках W-устойчивой клеточной линии сои при культивировании в нормальных условиях.

Однако сравнение абсолютных величин содержания свободного пролина при стрессе и в нормальных условиях, с нашей точки зрения не вполне корректно, поскольку само по себе не дает ответа на вопрос о реальной роли пролина в устойчивости к конкретному стрессору. Ранее мы отмечали высокий уровень пролина у клеточных линий табака, культивируемых в условиях осмотического стресса [26]. Однако тогда это событие было следствием деградации эндогенных белков (вначале), а затем и структурных компартов клетки. В конце пассажа культура клеток табака погибала. В пользу устойчивости больше свидетельствует динамика содержания пролина, поскольку является следствием функционирования систем его синтеза/деградации у растущих культур. W-устойчивая клеточная линия сои росла в присутствии различных анионо-стрессоров. Увеличение клеточной биомассы — свидетельство резистентности культуры. В ходе роста на различном стрессовом фоне у данной линии отмечали различия в изменении

содержания свободного пролина. Динамика колебаний может указывать на различную активность и направленность физиологических процессов при комплексной устойчивости. Можно предположить, что характер изменений уровня свободного пролина на фоне действия различных стрессоров, может быть отражением комплексной устойчивости растительных клеток.

Выводы

Динамика изменений уровня свободного пролина в каллусе устойчивой линии сои связана со стадией развития культуры и типом селективного давления.

При культивировании каллуса на среде с ионами W^{+6} отмечалось последовательное возрастание (7–14 день) — убывание (14–21 день) содержания свободного пролина. При культивировании на среде с ионами V^{+5} наблюдали его постепенное убывание (14–21 день).

Уровни свободного пролина у устойчивой клеточной линии сои при культивировании на селективных средах с ионами W^{+6} и V^{+5} от начала стадии стационарного роста клеток (14 день) не различаются по абсолютной величине и динамике изменений, что указывает на аналогичные механизмы метаболизма эндогенного пролина.

Динамика изменения уровней свободного пролина у устойчивой клеточной линии сои при культивировании на средах, содержащих альтернативные (нитратную и аммиачную) формы азота, указывает на различное происхождение аминокислоты.

В поддержании устойчивости клеточной линии сои при ее культивировании на различном стрессовом фоне имеет значение не абсолютная величина содержания свободного пролина, а

колебания его уровня, свидетельствующие в пользу активности его механизмов синтеза/деградации.

Список литературы

1. Жученко А.А. Стратегия адаптивной интенсификации сельского хозяйства (концепция). Путино: ОНТИ ПНЦ РАН. — 1994. — 148 с.
2. Jancey P.H., Clark M.E., Hand S.C. Living with water stress: evolution of osmolyte systems // *Science*. — 1984. — 217. — P. 1214–1217.
3. Csonka L.N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress // *Microbiol. Review*. — 1989. — 53. — P. 121–147
4. Ben-Hayyim G., Vaadia G., Williams B.G. Protein associated with salt adaptation in citrus and tomato cells: involvement of 26 kDa polypeptides // *Physiologia Plantarum*. — 1989. — 77. — P. 332–340.
5. El-Enany A.E. Proline effect on shoot organogenesis and protein synthesis in salinity-stressed tomato cultures // *J. of Islamic Academy of Sciences*. — 1995.- 8, №3. — P.213–224.
6. Elthon T.E., Stewart C.R. Proline oxidation in corn mitochondria // *Plant Physiology*. — 1982. — 70. — P. 567–572.
7. Smirnoff N., Cumbes Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes // *Phytochemistry*. — 1989. — 28. — P. 1057–1060.
8. Lyers S., Caplan P. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice // *Plant Physiology*. — 1998. — 116. — P. 203–211
9. Кузнецов Вл. В., Шевякова Н.И. Проллин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // *Физиология растений*. — 1999. — 46, №2. — С. 321–326.
10. Manis., Van de Cotte D., Van Montagu M., Verbruggen N. Altered level of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in Arabidopsis // *Plant Physiology*. — 2002. — 128. — P. 73–83.
11. Кочетов А.В., Титов С.Е., Колодяжная Я.С., Комарова М.Л., Коваль В.С., Макарова Н.Н., Илинский Ю.Ю., Трифонова Е.А., Шумный В.К. Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // *Генетика*. — 2004. — 40, №2. — С. 282–285.
12. Gibbs J., Dracup M., Greenway H., McComb J.A. Effects of high NaCl on growth, turgor and internal solutes of tobacco callus // *J.Plant Physiology*. — 1989. — 134. — P. 61–69.
13. Ginzburg B.Z., Cohen M., Ginzburg M. Detection of protein specific to high-salt *Dunaliella* cells // *J.Plant Physiology*. — 1990.- 137. — P. 247–249.
14. Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H. Phytochelalins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants // *Science*. — 1985. — 230. — P. 674–676.
15. Maitani T., Kubata H., Sato K., Yamada T. The composition of metal bound to class III metallothionein (Phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum* // *Plant Physiology*. — 1996. — 110. — P. 1145–1150.
16. Колодяжная Я.С. Исследования стрессоустойчивости генетически модифицированных растений табака (*Nicotiana tabacum*), экспрессирующих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы. Автореф. ... канд.биол.-наук., Новосибирск 2007, 15 с.
17. Singh H.N., Vaishampayan A., Sonie K.C. Mutation from molybdenum dependent growth to tungsten dependent growth and further evidence for a genetic determinant common to nitrogenase and nitrate reductase in blue-green alga *Nostoc muscorum* // *Mut. Research*. — 1978. — 50. — P. 427–432.
18. Сергеева Л.Е., Труханов В.А. Получение клеточных линий растений устойчивых к вольфраму // *Физиология и биохимия культ. растений*. — 1997. — 29. — С. 51–55.

19. Сергеева Л.Е., Михальська С.І. Дія оксианіонів вольфраму та ванадію на клітинні культури тютюну та сої // Международная научно-практическая конференция "Приемы повышения урожайности растений: от продуктивности фотосинтеза к современным биотехнологиям", Май 22, 2003г. Мат. конференции, Киев. — 2003, НАУ. — С. 167–169.
20. Сергеева Л.Е., Львов Н.П., Сафаралиев П.М., Левенко Б.А. Активность нитратредуктазы у растений табака, регенерированных из солеустойчивой клеточной линии // Физиология и биохимия культурных растений. — 1993. — 25, №6. — С. 587–591.
21. Heimer J.M., Filner P. Regulation of nitrate assimilation pathway of cultured tobacco cells. II Properties of a variant cell line // Biochim. Acta. — 1970. — 215. — P. 152–165.
22. Андрющенко 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 Tourn.* // Известия Академии Наук Молдавской ССР. — 1981.–4.–С. 55–60.
23. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Изд. 3-е, Минск, Высшая школа", 1973. — 158 с.
24. Sheveleva E., Chmara W., Bohnert H.J., Jensen R.G. Increased salt and drought tolerance by D-onitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* // Plant Physiology. — 1997. — 115. — P. 1211–1219.
25. Патент на корисну модель № 33964 Спосіб відбору клітинних ліній рослин із змінним типом нітратредуктази та характером засвоєння нітратів / Сергеева Л.Е., Михальська С.І., Тищенко О.М. зареєстровано 25.07.2008р.
26. Сергеева Л.Е. Изучение клеточных линий табака, устойчивых к солевому и

водному стрессам, и регенерантов из них // Автореф. дис. ... канд. биол. наук, Киев, 1991.– 21с.

Представлена О.В. Дубровной
Поступила 6.02.2009

ВАРІЮВАННЯ РІВНЯ ВІЛЬНОГО ПРОЛІНУ У W-СТІЙКОЇ КЛІТИННОЇ ЛІНІЇ СОЇ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ НА РІЗНОМУ СТРЕСОВОМУ ФОНІ

С.І. Михальська, О.І. Порецька,
Л.Е. Сергеева

Інститут фізіології рослин та генетики НАН України, Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17 e-mail: dubrovny@ukr.net

УW-стійкої клітинної лінії сої, яку культивували в присутності аніонів WO_4^{2-} ; VO_3^- ; ClO_3^- та на контрольному середовищі досліджували динаміку вмісту рівня вільного проліну. Селективні середовища з іонами вольфраму або ванадію містили лише нітрати; селективні середовища з $KClO_3$ містили або нітратну, або аміачну форму азоту. Рівень вільного проліну в клітинах при культивуванні за стресових умов перевищував контрольний показник від 1,5 до 4,9 разів. Однак, комплексна стійкість лінії сої пов'язана скоріше з реалізацією залежних від умов культивування механізмів синтезу/деградації, яка відображається в різному характері коливань рівня вільного проліну.

Ключові слова: соя, пролін, іони вольфраму та ванадію, хлорати, стійкість.

THE FREE-PROLINE LEVEL VARIATION IN THE W-RESISTANT SOYBEAN CELL LINE DURING CULTIVATION UNDER VARIOUS STRESS CONDITIONS

S.I. Mikhalskaya, E.I. Poretskaya, L.E. Sergeeva

Institute of Plant Physiology and Genetics NAS of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasilkovska str., 31/17 e-mail: dubrovny@ukr.net

There was investigated the free proline levels fluctuations in calli of the W-resistant soybean

cell line, cultivated at presence of WO_4^{2-} ; VO_3^- ; ClO_3^- anions and on the control medium. Selective media with tungsten or vanadium ions contained only nitrates, where as selective media with KClO_3 contained either nitrates or ammonium forms of nitrogen. The cell free proline levels during cultivation under stress conditions were from 1,5 to 4,9 times higher than the control one

was. However, the cell combined stress resistance is rather reflected through various types of proline level fluctuations. The lasts are the result of the developed condition-dependent mechanisms of the proline synthesis/degradation.

Key words: soybean, proline, tungsten and vanadium ions, chlorate, resistance.