

## ПРОЛИН У РАСТЕНИЙ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР КУКУРУЗЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ОСМОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ *IN VITRO*

Прогрессирующее ухудшение состояния окружающей среды, существенное изменение климата, дефицит пресной воды ставят под вопрос возможность выращивания традиционных хозяйственных культур, а также существенно снижают природное биоразнообразие. Возникает необходимость получения форм растений, сочетающих устойчивость к разнообразным стрессам с удовлетворительными потребительскими показателями. Это, в первую очередь, касается кукурузы, которая была и остаётся одной из наиболее важных сельскохозяйственных культур. Потребности текущего момента определяют направления научного поиска и стимулируют развитие новых методов исследования.

Среди абиотических стрессов наибольший спектр патологических изменений вызывают осмотические стрессы – засоление и водный дефицит. Нередко они действуют совместно, что только снижает возможность выживания организма.

Растения как прикрепленные биообъекты выработали многочисленные механизмы адаптации к стрессовым условиям. Они реализуются в комплексе на уровне интактного растения, на клеточном и молекулярном уровнях. Поскольку уровень стрессоустойчивости может в значительной степени меняться в онтогенезе, то приоритет механизмов также варьирует во времени. Однако в то же время известны ряд осмотически активных соединений, которые при любых обстоятельствах способствуют поддержанию жизнедеятельности растений, действуя на различных уровнях. К таким соединениям относится пролин [1, 2].

Пролин – пирролидин-2-карбоновая кислота – обладает рядом особенностей, которые делают его неспецифическим стрессовым протектором [1]. Высокая растворимость пролина способствует увеличению растворяющего объёма клетки, за счёт чего поддерживается гидратационная сфера клеточных полимеров. Гидрофобное пирролиновое кольцо молекулы взаимодействует с аналогичными по свойствам частями про-

теинов. При этом несущие заряд участки 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 [3]. Уровень пролина определяется синтезом/катаболизмом/транспортом [4]. Таким образом, пролин рассматривается как наиболее адекватный показатель устойчивости к осмотическим стрессам.

С другой стороны, имеются факты, указывающие на отсутствие взаимосвязи между повышенным содержанием пролина и стрессоустойчивостью; некоторые авторы даже настаивают на отрицательном влиянии пролина [5]. В связи с неоднозначностью оценок возникает необходимость исследовать роль пролина *in situ* на различных иерархических уровнях.

Следует иметь в виду, что однозначная интерпретация реакций тканей растения сложна ввиду морфологических и функциональных особенностей органов. С другой стороны, клеточная культура состоит из недифференцированных единообразно растущих клеток. Стрессовое воздействие аналогичной силы и продолжительности и сравнение полученных данных может стать весомым аргументом при оценке роли пролина в жизнедеятельности растений в условиях стресса.

Целью настоящей работы было исследование роли пролина у молодых растений кукурузы и клеточных культур, инициированных из них, в нормальных условиях и при моделированных осмотических стрессах.

### Материалы и методы

В качестве объекта исследования были привлечены инбредные линии кукурузы Л-250 и Л-390 селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины. Исследовали зерновки, молодые проростки, а также каллусные куль-

туры, полученные из незрелых зародышей (14 суток после опыления).

Стандартизированные зерновки кукурузы проращивали на воде в течение двух недель, после чего для опыта вторично отбирали растения одного размера. Каллус индуцировали и наращивали в течение нескольких пассажей на агаризованной культуральной среде FS1 [6].

Растения на устойчивость тестировали в водных культурах, добавляя соли морской воды (25,0 г/л, 2,5 мв) либо маннит (0,8 м) в двух вариантах. В первом случае – это были просто водные растворы. Во втором – стрессоры вносили в ½-разбавленный раствор макроэлементов по Мурасиге-Скугу [7]. Такие концентрации вносимых веществ создают жёсткий осмотический стресс, приводящий к летальному исходу при длительном воздействии. При испытании каллусных культур такие же количества моделирующих веществ прибавляли к среде FS1.

Содержание пролина определяли на 14-е сутки в сыром веществе по стандартной методике [8]. Электрофорез проводили по методу Ф. Поперели с модификациями [9]. Полученные первичные данные статистически обрабатывали.

### Результаты и обсуждение

Растения кукурузы испытывали в условиях моделированного осмотического стресса *in vitro*. В любом случае стрессовому воздействию подвергали корневую систему, а далее изменения охватывали всё растение. Такое развитие событий отражается и при аккумуляции пролина. На рис. 1 показано распределение аминокислоты в

надземной и корневой частях растения на примере генотипа Л-390.

Заметно общее явление: содержание пролина в надземной части всех растений невелико и практически одинаково. Низкое количество аминокислоты может указывать на отсутствие её синтеза. В то же время в корнях этот параметр существенно различается в зависимости от типа стресса. У вариантов 1 и 4 содержание пролина в исследуемых частях растений аналогично. Наивысший показатель отмечен у варианта 2 (0,8 М/мс-2), уровень пролина в корнях пятикратно превосходил показатель проростков. Уровень пролина в корнях варианта 3 (2,5 мв) больше в полтора раза. Высокое (вариант 2) и низкое (вариант 4) содержание пролина наблюдалось в растениях, потенциально имеющих доступ к трофическим компонентам среды Мурасиге-Скуга.

Этот разброс по вариантам, по нашему мнению, можно объяснить происхождением пролина. Во всех случаях данная аминокислота была следствием деградации пролин-содержащих белков клеточных мембран. Обогащённые пролином протеины (proline rich proteins, PRPs) задействованы в формировании клеточных стенок [10–12]. В их молекулах остатки пролина организованы в повторяющиеся мотивы, к которым добавляется гидроксипролин. Два PRP-субсемейства (экстензины и Р/Н RGP) имеют большое значение в устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам. Это обусловлено стресс-индуцированным окислением, во время которого формируются меж- и внутримолекулярные перекрёстные связи, укрепляющие структуру клеточной стенки [11]. Разновидность PRPs – 8СМ-НупРР – прикреплен к мембране тремя трансмембранными консервативными доменами и отличается наличием восьми типичных цистеиновых остатков [12].

Кроме пролиновых и цистеиновых остатков, белки клеточной стенки могут содержать значительные количества глицина и треонина [13].

В нашем эксперименте на 14-е сутки происходила деградация всех белков, которая приводила к гибели растений. Это подтверждается электрофореграммой, приведенной на рис. 2.

Таким образом, можно сделать заключение, что абсолютные значения содержания пролина у растений кукурузы не могут служить адекватным показателем их устойчивости, что ранее было показано нами на примере других растений [14].

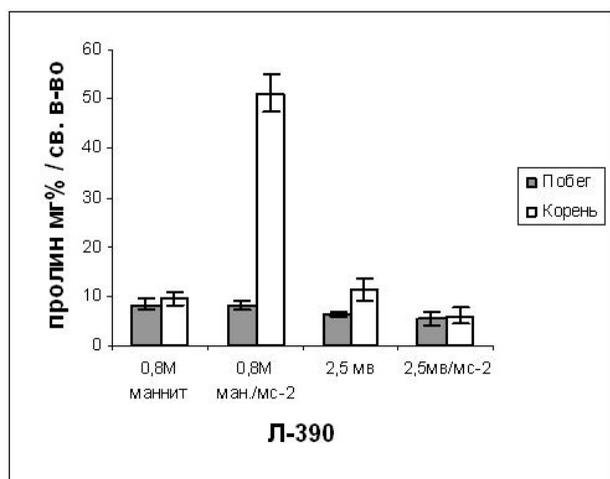
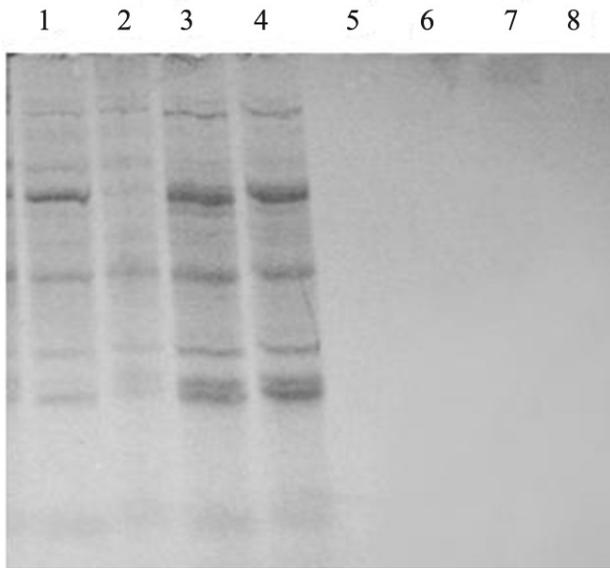
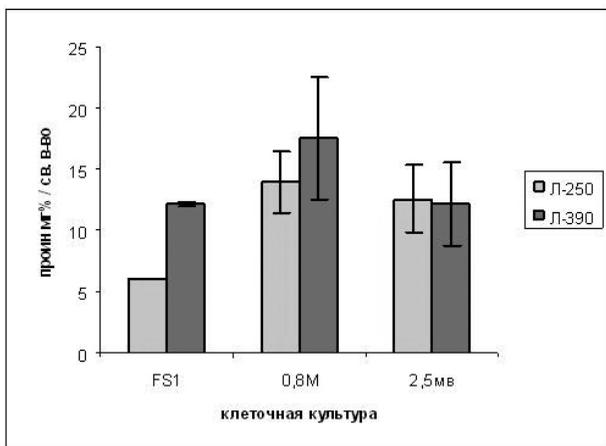


Рис. 1. Содержание свободного пролина в растениях кукурузы на 14-е сутки воздействия моделированных осмотических стрессов



**Рис. 2.** Электрофореграмма белков растений кукурузы: нормальные условия (1–4); осмотический стресс (5–8); 1, 2, 5, 6 – генотип Л-390, 3, 4, 7, 8 – генотип Л-250



**Рис. 3.** Содержание свободного пролина в каллусных культурах, полученных из инбредных линий кукурузы

В этой связи исследовали содержание свободного пролина в клеточных культурах, полученных из генотипов кукурузы. На рис. 3 представлены данные, отражающие аккумуляцию аминокислоты в каллусе на 14-е сутки опыта.

Наблюдалась полная тождественность в реакциях обоих генотипов: возрастание уровня пролина при культивировании в стрессовых условиях; у генотипа Л-390 – более подчеркнутое при действии маннита. Различия по абсолютной величине можно отнести на счёт генотипических особенностей, не связанных с уровнем

устойчивости. При этом следует добавить, что накопление пролина происходило вследствие активизации его синтеза. Это прослеживалось при продолжении культивирования. Каллус был перенесен в нормальные условия для проверки его жизнеспособности. 14-е сутки опыта совпадают с окончанием стадии логарифмического роста, которая характеризуется максимумом митозов. Далее следовала бы стадия растяжения. Однако прерывание клеточного цикла на любой стадии возвращает культуру к первичной lag-фазе. Если культура жизнеспособна, её цикл восстанавливается. В нашем случае клеточные культуры продолжили развитие без каких-либо визуальных отклонений. Вполне возможно, что поддержание осмотического статуса отдельной клетки требует меньшего количества пролина. Очевидно, что недифференцированная культура, довольно идентичная по своим составляющим – клеткам, обладает более высоким потенциалом жизнеспособности. Это, по нашему мнению, можно объяснить именно отсутствием специализированных тканей, присущих интактному растению, требующих индивидуальных (кроме пролина) механизмов защиты. В то же время следует заметить, что уровень стрессоустойчивости клеточных культур был сравним с уровнем растения: продолжение культивирования каллуса в заданных стрессовых условиях приводило к гибели вариантов.

Таким образом, можно сделать заключение, что 14-е сутки стрессового воздействия были критическими для растений, но не для клеточных культур. Однако и при оценке устойчивости клеточных культур также нельзя опираться на абсолютные величины, определяющие накопление пролина. Ранее нами было показано, что более весомые аргументы появляются при анализе колебаний уровня пролина, коррелирующих со стадиями развития культуры [14]. Необходимо также учитывать вероятность появления других протекторных осмотически активных веществ, особенно у растений [15].

### Выводы

1. Пролин является эффективным протектором для клеточных культур кукурузы, поддерживая их жизнеспособность в течение 14-ти суток действия летального засоления или водного стресса.

2. Абсолютные величины, отражающие содержание пролина, не могут служить адекватным подтверждением устойчивости генотипов кукурузы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sci. – 2010. – 15. – P. 89–97.
2. 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.
3. Балнокин Ю.В. Ионный гомеостаз и осморегуляция у галотолерантных микроводорослей // Физиология растений. – 1993. – 40. – С. 567–576.
4. Kavi Kishor P.B., Sangam S., Amruhta R.N., Sri Laxmi P., Naidu K.R., Rao K.R.S.S. Rao Sreenath, Reddy K.J., Theriappan P., Sreenivasulu N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance // Current Science. – 2005. – 88, № 3. – P. 424–436.
5. Maggio A., Miyazaki S., Veronese P., Fujita T., Ibeas J., Damsz B., Narasimhan M.L. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction // Plant J. – 2002. – 31. – P. 699–712.
6. Green C.E., Phillips R.L. Plant regeneration from tissue cultures of maize // Crop Sci. – 1975. – 15. – P. 417–421.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1962. – 15. – P. 473–497.
8. 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* Tourm // Известия Академии наук Молдавской ССР. – 1981. – № 4. – С. 55–60.
9. Попереля Ф.А., Асыка Ю.А. Методические указания по электрофорезу зерна кукурузы для определения процента гибридности семян F1. – М., 1988. – С. 4–6.
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.
13. Harrak H., Chamberland H., Plante M. A proline-, threonine-, and glycine-rich protein down-regulated by drought is localized in the cell wall of xylem elements // Plant Physiol. – 1999. – 121. – P. 557–564.
14. Сергеева Л.Е. Клеточная селекция с ионами тяжёлых металлов для получения генотипов растений с комплексной устойчивостью к абиотическим стрессам. – К.: Логос, 2013. – 211 с.
15. Сакало В.Д., Ларченко К.А., Курчій В.М. Синтез і метаболізм сахарози в листках проростків кукурудзи за умов водного дефіциту // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – 41, № 4. – С. 305–313.

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

*Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: Zlenko\_lora@ukr.net*

**PROLIN IN CORN PLANTS AND CELL CULTURES, CULTIVATED UNDER OSMOTIC STRESS *IN VITRO***

**Aim.** Young corn inbred line plants and cell cultures, obtained from those lines, were cultivated under salinity (25.0 g/l sea water salts) or water stress (0.8 M mannitol). The role of proline in those variants was investigated. **Methods.** We added stress compounds to water or ½ Murashige-Skoog medium (for plants) to S1 medium (for cell cultures) and tested corn variants. The free proline levels were estimated on the 14<sup>th</sup> day of stress pressure. **Results.** The level of free proline rose in plants, cultivated on nutrition medium with the addition of mannitol and in calli tissues, cultivated under both types of osmotic stresses. The plant proline content elevated after the degradation of proline rich proteins, PRPs. But at the same time cell proline was the product of biosynthesis. **Conclusions.** The absolute values of proline levels are not indices of plant stress tolerance.

**Keywords:** *Zea mays*, intact plants, cell culture salinity, water stress, proline.