

niedzwetzkyana Dieck ex Koehne, Cercis chinensis Bunge and Liquidambar styraciflua L.), 23 species – as highly decorative species and four – as species of middling decorativeness. The results of decorativeness evaluation of rare arboreal plants *ex situ* of Nature Reserve Fund of the Steppe of Ukraine are support the view of the necessity of their widespread use in landscape gardening.

Key words: assessment of decorativeness, rare arboreal plants, *ex situ*, Steppe of Ukraine.

Стаття надійшла до редколегії
09.03.2016 р.

УДК 581.1:58.02

Лариса Сергєєва,
Лариса Броннікова

Стійкість до модельованого водного стресу R2 рослин тютюну, отриманих у результаті клітинної селекції з іонами важких металів

Методом клітинної селекції із використанням катіонів Cd^{2+} отримано клітинні лінії й рослини R0, R1, R2 тютюну. Усі рослинні форми відзначалися стійкістю до летальних водних стресів. Стійкість варіантів була координувана з підвищеним рівнем вільного проліну, який змінювався залежно від величини стресового тиску. Осмос-тійкість варіантів є генетично обумовленою ознакою.

Ключові слова: тютюн, клітинна селекція, катіони кадмію, водний дефіцит, стійкість, пролін.

Постановка наукової проблеми та її значення. Суттєва глобальна зміна клімату починає створювати помітний стресовий тиск на природні біосистеми та культивовані види навіть у тих регіонах, котрі раніше були придатними для росту та розвитку рослин. Отже зростає потреба в рослинних формах із підвищеним рівнем стійкості. З огляду на це дослідження різних аспектів стійкості до абіотичних стресів стає першочерговим у низці наукових проблем. При цьому виділяються окремі напрями: біологічні, екологічні, гуманітарні. Однак, оскільки наявні підходи не завжди відповідають рівню поставленого завдання, то виникає необхідність у висуненні нових ідей. Їх перспективність обумовлюватиметься низкою умов, а саме: універсальністю, екологічною безпекою, технологічністю, можливістю модифікацій. Їм відповідає клітинна селекція.

Аналіз досліджень із цієї проблеми. Клітинну селекцію багато років застосовують для виділення рослинних форм із покращеними властивостями [1–3]. Однак, як будь-який метод, вона потребує постійного вдосконалення. Тому нами було висунуто ідею застосування летальних доз іонів важких металів (ІВМ, НМІ) у клітинній селекції для отримання генетично змінених форм рослин.

ІВМ відносять до категорії стресових чинників, котрі викликають різноманітні ураження організму. При цьому вони діють малими, а нерідко навіть залишковими кількостями. Це стосується фізіологічно неактуальних іонів Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} . [4]. Відомо, що іони кадмію можуть чинити широкий шкодочинний вплив на рослини [5]. Цікавим є факт, що іони Cd^{2+} можуть аналогічно діяти як на інтактні рослини, так і на клітинні культури [6, 7].

Катіони Cd^{2+} негативно впливають на окремі компартменти рослин [7], особливо на дегідрини [8]. Дегідрини відносяться до білків пізнього ембріогенезу, LEA (*late embryogenesis abundant proteins*) [9, 10]. Повністю функції LEA не встановлені, але вважається, що, накопичуючись при зневодненні, вони попереджують денатурацію макромолекул. Тобто простежуємо координацію механізмів у нормально функціонуючого організму.

Отже, маючи на увазі вказані властивості іонів Cd^{2+} , ми використали їх при відборі рослинних форм із підвищеним рівнем стійкості до водного стресу.

На селективних середовищах, котрі містили летальні для клітинних культур дози катіонів Cd^{2+} , виділено стійкі клітинні лінії. Різнопланове тестування за дії / зміни різних умов культивування підтвердило висунуту гіпотезу, а саме: клітинні лінії відрізнялися стійкістю не лише до ІВМ, але й до

летальних осмотичних стресів [11]. Універсальність запропонованої гіпотези проявилася при використанні різних культур – тютюну, сої, соняшнику.

При дослідженні отриманих клітинних варіантів встановлено, що їхня комплексна стресостійкість забезпечувалася за рахунок зростання вмісту вільного проліну [11]. Це явище спостерігали для всіх культур. Про те, що пролін може виступати неспецифічним протектором за дії різних стресових чинників, неодноразово повідомлялося [12–14].

Зі стійких клітинних ліній тютюну були регенеровані рослини. В експериментах із клітинної селекції завжди актуальна реалізація мети: стійка клітинна лінія – стійка рослина. З огляду на це регенеранти тестували на стійкість до осмотичних стресів: рослини, регенеровані з Cd-стійких варіантів, витримували водний стрес *in vitro* та *in vivo* [11]. Вимірювання вмісту вільного проліну в рослинах показало його зростання при вирощуванні за стресових умов. Тобто спостерігали аналогію між стійкими клітинними культурами та стійкими рослинами. Це, на нашу думку, може вказувати на користь реалізації «клітинних» механізмів стійкості.

Підтвердженням генетичної природи змін є успадкування бажаної ознаки в поколіннях. Були отримані R1 рослини тютюну. Вони відзначалися підвищеним рівнем стійкості до модельованих осмотичних стресів. Тестування проростків R1 за дії модельованого водного стресу, а також при кардинальній зміні умов культивування: стрес → н.у.; стрес I → стрес II показало, що життєдіяльність рослин за різних умов також координується зі змінами рівня проліну [11]. Тобто простежено аналогію в реакціях рослин R0 і R1. Таке явище, на нашу думку, є генетично обумовленим.

Для підтвердження спадкових особливостей стійкості експериментально отриманих рослинних форм уважали доцільним оцінити характер розподілу вільного проліну рослин R2.

Мета й завдання дослідження. Уміст вільного проліну є динамічним показником. Він може змінюватися не лише залежно від умов вирощування, але й в онтогенезі. Пролін є єдиною амінокислотою, яка спроможна регулювати власний рівень через системи синтезу / окиснення / транспорту. За стресових умов координація цих систем забезпечує оптимальний уміст проліну. У зв'язку з цим **метою** нашої роботи було встановлення ролі проліну в підтриманні життєдіяльності рослин за стресових умов. Ключове **завдання** статті – порівняльний аналіз рівня вільного проліну в молодих рослин тютюну R2, культивованих за дії модельованих водних стресів та при зміні умов вирощування.

Виклад основного матеріалу й обґрунтування отриманих результатів дослідження. Об'єктом дослідження були молоді рослини R2. Для досліду насіння пророщували *in vitro* на зволоженому фільтрувальному папері до появи корінців (1–15 доби). У подальшому проростки переміщували на напіврозведений водний розчин Кнопа, який містив виключно неорганічні компоненти (16–30 доби). 30-добові проростки переносили в ґрунт, у якому молоді рослини вирощували впродовж 30 діб до досягання ними розміру ~ 10,0 см (надземна частина). Для досліду рослини відмивали від ґрунту та переносили у водні розчини: напіврозведений живильний розчин Кнопа (нормальні умови, н. у.); та цей же розчин із додаванням маніту в концентраціях 0,3 М і 0,6 М, (відповідно, стрес I і стрес II). За умов дії стресу I рослини витримували п'ять діб, після чого змінювали умови тестування. Рослини переміщували в н. у. або збільшували стресове навантаження та витримували дві доби. Загальний строк тестування складав сім діб. У рослин в кінці кожного дискретного періоду аналізували вміст вільного проліну [15].

Помірні рівні водного стресу можуть індукувати широкий спектр адаптивних реакцій. Жорсткий стрес не лише обмежує життєдіяльність організму, а навіть може призвести до летального результату. Водночас стійкість рослин проявляється не тільки в здатності генотипу протистояти довготривалому стресу, але й витримувати динамічні зміни осмотичного тиску зовнішнього середовища. З іншого боку, маємо докази того, що тривалість дії стресу може стимулювати адаптацію в нестійких форм. Так, вимірювання активності проростання (частоти) та ростових показників у рапсу показало, що негативний ефект, викликаний нетривалою (3, 5 доби) дією засолення, проявлявся більш суттєво, аніж після 7-добового впливу. Науковці відзначали, що найбільшу чутливість до дії короткострокового засолення проявляли гіпокотилі проростків рапсу. У цьому разі пригнічення росту спостерігали в присутності 50,0 мМ NaCl, у той же час як гальмування росту коренів відбувалося лише при дії більш високих концентрацій засолення (75,0 або 100,0 мМ). Подовження строку дії засолення до семи діб суттєво змінювало перебіг реакцій: гальмування росту гіпокотилей відбувалося при додаванні 125,0 мМ NaCl [16].

Спочатку дослідні рослини піддавали дії 5-добового модельованого водного стресу. Усі рослини мали знижений тургор листків. Рівень вільного проліну в надземній частині рослин тютюну наведено на рис. 1.

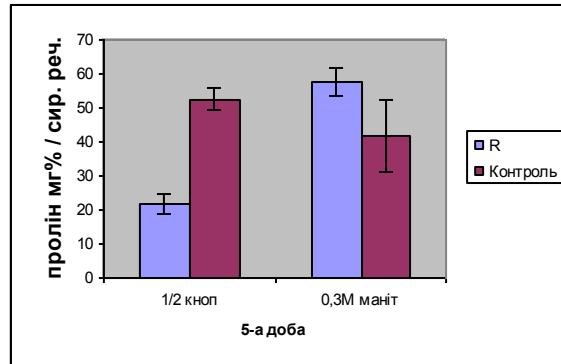


Рис. 1 Уміст вільного проліну в рослинах тютюну за різних умов

За н. у. рівень вільного проліну у контрольних рослин суттєво (2,5 рази) перевищував цей показник, виміряний у рослин R2. Очевидно, що це відповідало нормальному статусу рослин. Інша картина спостерігалась при зневодненні – зростання рівня амінокислоти у рослин R2 (~ 3 рази) та деяке його зниження в рослин дикого типу. Причина цього феномену з'ясувалася при зміні умов культивування, коли варіанти перемістили в нормальні умови. У цьому випадку в стійких рослин R₂ відновлювався тургор листків і вони набували нормального зовнішнього вигляду. Водночас рослини контролю продовжували втрачати залишки вологи. Це могло відбуватися в результаті незворотного ушкодження клітинних мембран, яке простежено раніше [11]. Одночасно з подальшим зневодненням рослини дикого типу втрачали компоненти клітин, у тому числі пролін.

Пролін, виміряний на п'яту добу дії водного стресу в контрольних варіантів, утворювався внаслідок деградації / деструкції клітинних компартментів. Це могли бути поліпептиди клітинної стінки й мембран [17, 18]. Із другого боку, рівень вільного проліну, зафіксований у рослин R2, був достатнім для підтримання їхньої життєдіяльності за стресових умов, про що свідчило відновлення за н. у.

Після зміни умов культивування (рис. 2) у життєздатних рослин R₂ рівень проліну знижувався.

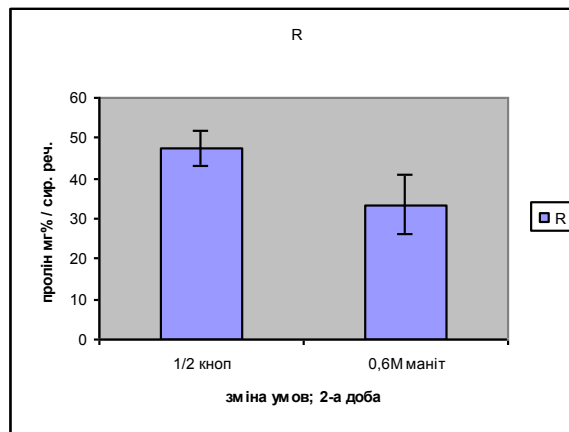


Рис. 2. Уміст проліну в рослинах R₂ тютюну при зміні умов культивування

*Примітка. Загальний строк культивування – сім діб.

Це очікувана подія, оскільки при регідратації активується ген проліндегідрогенази – ферменту окиснення проліну [12]. При цьому на 2-у добу відновлення (1/2 водного розчину Кнопу) зниження було несуттєве. При збільшенні стресового навантаження 0,3 → 0,6 М маніту рівень вільного проліну також зменшувався; при цьому зміна була більш виражена (1,7 рази).

Імовірно, підтримання життєдіяльності рослин R₂ за дії водного стресу відбувалося таким чином. У присутності 0,6 М маніту також відбувався синтез вільного проліну. Утворений рівень амінокислоти був достатнім для попередження критичного зневоднення. Крім того, синтезований продукт здатен виступати як резервне джерело вуглецю. В рослинах міг акумулюватись альтернативний сумісний осмоліт, а саме сахароза.

Між проліном і сахарозою встановлено зв'язок. Проте він неоднозначний, оскільки, крім протекторної дії, обидві сполуки можуть впливати на загальні процеси росту та розвитку [12]. У низці випадків зафіксовано координовані кількісні і якісні зміни вмісту цих осмолітів. Наприклад, у диких середземноморських ксерофітів встановлено, що генотипи, які нагромаджували в клітинах пролін, мали меншу кількість вуглеводів і навпаки. Це вказує на те, що окремі види акумулюють переважно один тип осмолітів [19]. Крім того, експресія низки генів може регулюватися як проліном, так і сахарозою. Встановлено, що ген синтезу проліну *P5KC*, *P5KS* (кодує Δ^1 -піролін-5-карбоксилатсинтетазу), ініціюється високою концентрацією сахарози та пригнічується проліном; водночас ген проліндегідрогенази, *ПДГ*, *ProDH*, реагує в протилежному напрямі [12].

Загальний рівень проліну повністю забезпечував життєздатність рослин R₂, оскільки після регідратації вони відновлювались.

Висновки та перспективи подальшого дослідження. Отже, проведені дослідження підтвердили факт успадкування ознаки стресостійкості в рослин R₂ тютюну. Ці варіанти підтримували життєздатність за дії модельованого стресу, летального для контрольних рослин. Стійкість рослин реалізовувалася на фоні акумуляції вільного проліну. Молоді рослини були здатні адаптуватися до кардинальної зміни зовнішнього осмотичного тиску (стрес \rightarrow н. у.; стрес I \rightarrow стрес II), що може свідчити на користь активної життєдіяльності різних за спрямуванням систем організму. Таке функціонування можливе за участю двох сумісних осмолітів, а саме: проліну та сахарози. Подальші дослідження спрямовуватимуться на з'ясування ролі сахарози в реалізації стійкості до осмотичних стресів в експериментально отриманих рослин тютюну.

Джерела та література

1. Melchers G. Untersuchungen an kulturen von haploiden gewebe von *Antirrhinum majus* / G. Melchers., L. Bergmann // Ber. Dtsch. Bot. Ges. – 1959. – 78. – P. 21–29.
2. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. / В. А. Сидоров. – Киев : Наук. думка, 1990. – 280 с.
3. Maliga P. Isolation and characterization of mutants in plant cell culture / P. Maliga // Ann. Rev. Plant Physiol. – 1984. – 35. – P. 519–542.
4. Nies D. H. Microbial heavy-metal resistance / D. H. Nies // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – 51. – P. 730–750.
5. Серёгин И. В. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения / И. В. Серёгин // Физиология растений. – 2001. – 48. – С. 606–630.
6. Kuthanova A. Cell cycle phase-specific death response of tobacco BY-2 cell line to cadmium treatment / A. Kuthanova, L. Fisher, P. Nick, Z. Opartny // Plant Cell and Envir. – 2008. – 31. – P. 1634–1643.
7. Мельничук Ю. П. Влияние ионов кадмия на клеточное деление и рост растений / Ю. П. Мельничук. – Киев : Наук. думка, 1990. – 148 с.
8. Аллагулова Ч. Р. Дегидрины растений: их структура и предполагаемые функции / Ч. Р. Аллагулова, Ф. Р. Гималов, Ф. М. Шакирова, В. А. Вахитов // Биохимия. – 2004. – 68. – С. 1157–1165.
9. Qian G. Клонирование и секвенирование нового гена, кодирующего выносливость к засухе, LEA3 у тибетского голозерного ячменя / G. Qian, X.-G. Zhai, Z.-X. Han [et al.] // Zuowu xuebao=Acta Agr. Sin. – 2007. – 33. – P. 292–296.
10. Tioleter D. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein by desiccation / D. Tioleter, M. Jaquinod, C. Mangavel [et al.] // Plant Cell. – 2007. – 19. – P. 1580–1587.
11. Сергеева Л. Е. Клеточная селекция с ионами тяжёлых металлов для получения генотипов растений с комплексной устойчивостью к абиотическим стрессам / Л. Е. Сергеева. – Киев : ЛОГОС, 2013. – 211 с.
12. Szabados L. Proline: a multifunctional amino acid / L. Szabados, A. Savoure // Trends Plant Sci. – 2010 – 15. – P. 89–97.
13. Kishor P. B. K. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance / P. B. K. Kishor, S. Sangam, R. Amruta [et al.] // Curr. Sci. – 2005. – 88. – P. 424–432.
14. Banu M. N. A. Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress / M. N. A. Banu, M. A. Hoque, M. Watanabe-Sugimoto [et al.] // J. Plant Physiol. – 2009. – 166. – P. 146–156.

15. Андрущенко В.К. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon Tourn* / В. К. Андрущенко, В. В. Саянова, А. А. Жученко и др. // Известия Академии Наук Молдавской ССР. – 1981. – № 4. – С. 55–60.
16. Хасан Д. Влияние хлоридного засоления на прорастание семян и рост проростков *Brassica napus* L. / Д. Хасан, И. С. Ковтун, М. В. Ефимова // Вестник Томского гос. ун-та. Биология. – 2011, 34.. – С.108–112.
17. Showalter A. M. A bioinformatics approach to the identification, classification and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins / A. M. Showalter, B. Keppler, J. Lichtenberg [et al.] // Plant Physiol. – 2010. – 153. – P. 485–513.
18. Stein H. Elevation of free proline and proline-rich protein levels by simultaneous manipulations of proline biosynthesis and degradation in plants / H. Stein, A. Honig, G. Miller [et al.] // Plant Sci. – 2011. – 181. – P.140–150.
19. Boscaiu M. Osmolyte accumulation in xerophytes as a response to environmental stress / M. Boscaiu, M. Esperanza, O. Fola [et al.] // Bul. Univ. Agr. Sci and Vet Med. Cluj-Napoca Hort. – 2009. – 66. – P. 96–102.

Сергеева Лариса, Бронникова Лариса. Устойчивость к моделированному водному стрессу R2 растений табака, полученных в результате клеточной селекции с ионами тяжёлых металлов. Предлагается метод клеточной селекции с привлечением ионов тяжёлых металлов для получения растительных форм, устойчивых к абиотическим стрессам. В частности использовать катионы кадмия для отбора вариантов, устойчивых к водному дефициту.

На селективных средах, содержащих летальные для клеточных культур дозы катионов Cd^{2+} , получены устойчивые клеточные линии табака. Из них получены регенеранты R0, а также семенные поколения R1, R2. Клеточные линии и растения R0 и R1 отличались устойчивостью к водному стрессу, создаваемому добавлением маннита. Устойчивость вариантов сопряжена с повышением уровня свободного пролина. Предметом настоящей работы было изучение устойчивости поколения R2 и роли свободного пролина в реализации этой характеристики.

Молодые растения R2, размером ~ 10,0 см выдерживали в жидком питательном растворе, к которому прибавляли 0,3 М маннита. Эта концентрация была летальной для растений дикого типа. На пятые сутки стрессового воздействия уровень свободного пролина в листьях превышал показатель нормы ~ в 3 раза. Через пять суток условия культивирования меняли. Половину растений возвращали в нормальные условия. Для второй части стресс увеличивали в два раза (0,6 м маннита). Растения R2 активно адаптировались и отличались жизнеспособностью в любых условиях. Через двое суток в новых условиях у всех растений уровень свободного пролина снижался относительно показателя, отмеченного до смены условий тестирования. Предполагается, что осмотический статус мог поддерживаться за счёт аккумуляции сахарозы – альтернативного совместимого осмолита.

Ключевые слова: табак, клеточная селекция, катионы кадмия, водный дефицит, устойчивость, пролин.

Sergeeva Larisa, Bronnikova Larisa. The Resistance to Simulated Water Stress of R2 Tobacco Plants Obtained Via Cell Selection With Heavy Metal Ions. The cell selection with heavy metal ions for obtaining plant forms, resistant to abiotic stresses is advisable. Especially it is recommended to use cadmium cations for obtaining variants, resistant to water deficit.

On selective media with the addition of lethal for cell cultivars doses of Cd^{2+} cations resistant tobacco cell lines occurred. Regenerants R0 and seed progenies R1, R2 were obtained from those lines. Cell lines and R0 and R1 plants challenged the water stress that was established by mannitol addition. Variants resistance was combined with high level of free proline. The investigation of R2 plants resistance levels and their proline status were the objects of the research.

Young R2 plants (~ 10,0 cm length) were tested in liquid nutrition solution with the addition of 0,3 M mannitol during 5 days. Such stress pressure was lethal for wild type plants. The leaf free proline level at 5-th day of experiment exceeded normal parameter at ~ 3 times. At 5-th day cultural conditions were changed and plants were divided. Some plants were returned to normal condition the others were moved to solution with higher osmotic stress pressure (0,6 M mannitol). R2 plants actively adapted to both conditions and maintained viability. At second day after resettlement the plans free proline levels decreased in comparison with parameters that were marked before this procedure. There was predicted that this phenomenon was the result of alternative compatible solution (sucrose) accumulation.

Key words: tobacco, cell selection, cadmium cations, water deficit, tolerance, proline,

Стаття надійшла до редколегії
19.03.2016 р.