

## **БЕЛКОВЫЙ СТАТУС Ва-УСТОЙЧИВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ТАБАКА, КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ПРИ ЗАСОЛЕНИИ**

Сергеева Л.Е., Бронникова Л.И.

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины  
03022, Украина, Киев, ул. Васильковская, 31/17*

Zlenko\_lora@ukr.net

На среде с летальными дозами катионов бария были получены клеточные линии табака. Ва-устойчивые клеточные варианты культивировали при засолении (25,0 г/л солей морской воды или сульфата натрия). Определяли динамику изменений внутриклеточного и внеклеточного белка в каллусе при стрессовых условиях. Этот показатель был аналогичен нормальным показателям. Поэтому сохранение способности к перераспределению белка в условиях жёсткого засоления у клеточных линий можно считать надёжным показателем стрессоустойчивости.

*Ключевые слова: Nicotiana tabacum L., клеточная селекция, катионы бария, солеустойчивость, белок*

## **БІЛКОВИЙ СТАТУС Ва-СТІЙКИХ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ ТЮТЮНУ, КУЛЬТИВОВАНИХ ПРИ ЗАСОЛЕННІ**

Сергеева Л.Е., Бронникова Л.И.

*Институт фізіології рослин і генетики НАН України  
03022, Україна, Київ, вул. Васильківська, 31/17*

Zlenko\_lora@ukr.net

На середовищі із летальними дозами катіонів барію були отримані клітинні лінії тютюну. Ва-стійкі клітинні варіанти культивували за дії засолення (25,0 г/л солей морської води або сульфату натрію). Визначали динаміку змін внутрішньоклітинного та позаклітинного білку в калусі за стресових умов. Цей показник був аналогічним показнику норми. Тому збереження здатності до перерозподілу білку за умов жорсткого засолення у клітинних ліній можна вважати надійним показником стрес-стійкості.

*Ключові слова: Nicotiana tabacum L., клітинна селекція, катіони барію, солестійкість, білок*

## **PROTEIN STATUS OF Ba-RESISTANT TOBACCO CELL LINES, CULTIVATED UNDER SALINITY**

Sergeeva L.Ye., Bronnikova L.I.

*Institute of Plant Physiology and Genetics NAS Ukraine  
03022, Ukraine, Kyiv, Vasylkivska St., 31/17*

Zlenko\_lora@ukr.net

Sodium toxicity problem appears in arid regions as a result of the gradual build-up of salts in soils where irrigation is employed. Approximately one-half of the irrigated soils of the world are affected by high salinity. Therefore there is a significant importance to improve the plant osmotolerance.

The salt tolerance investigation play an important role in plant physiology, because it is a complex trait involving responses to cellular osmotic and ionic stresses and their consequent secondary stresses (e.g. oxidative stress) and whole plant coordination (Zhu, 2000). The polygenic nature of salinity tolerance is a high problem in the obtaining salt-tolerant forms. Breeding achievements have been hampered by a lack of understanding of resistance factors as well as lack screening procedures including physiological, biochemical, molecular markers. On the other hand, decades of plant breeding has narrowed the genetic diversity that exists in crop species. Selection for strong yield potential has reflected in the loss of alleles with significant contributions to osmotic stress adaptability.

A number of problems are solved via biotechnological manipulations. Cell selection is a suitable method for obtaining salt tolerant varieties. The first publication, where selection towards tolerance to extreme temperatures of suspension culture dates back to 1959 (Melchers, Bergmann, 1959). The positive aspects of the use of cell culture for mutant selection were pointed out, including the possibilities of mass selection, adequate mutagenesis, regeneration plants from selected cell lines. During post-1980 period three achievements of cell selection were marked: 1. the isolation of auxotrophic cell lines; 2. the successful attempts to isolate mutants with practical value (e.g. amino acid overproduction); 3. tissue culture-induced genetic changes were no vied as an undesirable problem, but as an opportunity to obtain valuable genetic variation (Maliga, 1984). At the same time the cell selection, as each practical method, is in need of improvement. We propose the idea to realize cell selection with lethal doses of heavy-metal ions (HMI).

HMI occupy the major part of the elements in the periodic table. Some HMI cations in particular way interact with essential intracellular ions (e.g. Ba<sup>2+</sup>/K<sup>+</sup> interaction). There was marked, that Ba<sup>2+</sup> cations strongly altered K<sup>+</sup> transport (Fan, 1999). Toxic influence of salinity is resulted in K<sup>+</sup> starvation. In this connection Ba<sup>2+</sup> cations were used for obtaining plant forms survived under salinity.

On selective media with lethal doses of Ba<sup>2+</sup> ions tobacco cell lines were obtained. Those variants were tested under salinity (25, 0 g/l sea water salts or sodium sulfate). Ba-resistant cells grew on cultural media with the addition of any type of salinity. Growth under stress conditions is maintained by dynamic adaptations, reflected in protein metabolism. The level of cell protein decreased during passage. At the same time the level of extra cellular protein grew. The top point of protein level was marked on 14-th day of cultivation. Redistribution of cellular/ extra cellular proteins was connected with the stage of cell growth cycle. These events are the normal processes in cell cultures. At normal conditions some extra cellular proteins are phosphorylated on tyrosine residues. Status of cell culture (morphogenic or nonmorphogenic) depends on spectrum of tyrosine phosphorylated extra cellular proteins (Petrova, 2013).

Plant regeneration from resistant cell lines is a permanent problem of cell selection. So, we assume that maintaining of the redistribution and phosphorilation of cellular/ extra cellular proteins under salinity is a marker of cell viability and resistance. The balance between protein synthesis and excretion is thought to be essential in determination of the cellular osmoprotective functions.

*Key words* : *Nicotiana tabacum L., cell selection, Ba<sup>2+</sup> cations salt resistance, protein*

## ВВЕДЕНИЕ

Растения могут моделировать программу своего развития в зависимости от условий внешней среды. Адаптация растений к стрессу включает изменения в регуляторных, метаболических и структурных компартментах. Однако уровень взаимосвязей должен коррелировать (объединять) различные типы реакций к определённым стрессам. Система *in vitro* является многоуровневым фактором, влияющим на генетическую программу растений. В случае моделирования стресса в культуре *in vitro* и правильного выбора селективного агента создаются условия гарантированного отбора форм с широким спектром адаптивных реакций, обеспечивающих комплексную стрессоустойчивость. Поэтому для первичной селекции целесообразно выбрать агент, который отличался бы как специфическим, так и общим направлениям действия. Если при этом предполагаемое вещество токсично даже в следовых количествах, в таком случае клеточная селекция может стать главным методом получения растительных форм с уникальными свойствами. Такими показателями отличаются ионы тяжёлых металлов. В частности катионы бария Ba<sup>2+</sup>.

На селективной среде, содержащей летальную для клеточных культур дикого типа дозу ионов бария, были отобраны устойчивые клеточные линии табака [1]. Катионы Ba<sup>2+</sup> были выбраны с целью получения линий с повышенным уровнем солеустойчивости.

Известно, что среди абиотических стрессов засоление вызывает наибольший повреждающий эффект, поскольку продолжительность его воздействия на растение только ухудшает перспективу выживания. Во многом это связано с нарушением ионного гомеостаза, в частности с потерей физиологически необходимых катионов K<sup>+</sup>. В литературе имеются данные о взаимоотношениях ионов Ba<sup>2+</sup>/ K<sup>+</sup>. Так, указывалось, что Ba<sup>2+</sup> может существенно тормозить перемещение K<sup>+</sup> [2, 3]. Основываясь на этом постулате, был проанализирован уровень солеустойчивости Ba-устойчивых клеточных линий. Отобранные варианты развивались в условиях прямого воздействия засоления. При этом устойчивые культуры адаптировались к любому типу летального засоления (сульфатному, хлоридному, сульфатно-хлоридному), что может свидетельствовать в пользу их системной стойкости. Более того, эти линии выдерживали также кардинальную перемену условий культивирования, а именно:

стресс → норма; норма → стресс; стресс I → стресс II.

Наиболее информативным показателем развития биосистемы считается биосинтез клеточных структур, в частности белков. Целью настоящей работы была оценка перераспределения клеточного/внеклеточного белка при культивировании Ba-устойчивых клеточных вариантов при засолении.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были Va-устойчивые клеточные линии табака (*Nicotiana tabacum* L.). Перед проведением эксперимента клоны выращивали на стандартной агаризованной культуральной среде B5 Гамборга [4]. Для эксперимента каллус помещали на мостики из фильтровальной бумаги, погруженные в жидкую среду, содержащую макро- и микроэлементы, соответствующие среде B5, а также соли морской воды или сульфат натрия в концентрации 25,0 г/л. Содержание белка оценивали на 7-е, 14-е, 21-сутки по Бредфорду [5]. Белок экстрагировали из нативной каллусной ткани; буфер экстракции содержал 0,2М меркаптоэтанол, 8,0М мочевины, 0,8М трис-HCl (pH-8,3) в соотношении 1:5. Экстракцию производили в течение 2 часов. После инкубации экстракт центрифугировали при 4<sup>0</sup>С 6000g/15 мин. Процедуру экстракции повторяли троекратно, супернатанты объединяли. Белок осаждали 50% р-ром ТХУ до конечной концентрации 10%. 5 объёмов экстракта ресуспендировали в 80%-ном р-ре ацетона и замораживали при -15<sup>0</sup>С. После 24-часового охлаждения суспензию белка в ацетоне осаждали центрифугированием 6000g/15 мин. Осаждённый белок промывали в 100% ацетоне и высушивали. Электорофорез производили методом Лэммли [6].

Опыт проводился в троекратной биологической и двукратной аналитической повторности. Статистическая обработка велась по стандартной процедуре.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание белка в клетках и внеклеточного белка оценивали относительно стадий развития клеточных культур. Так, 7-е сутки соответствуют началу стадии логарифмического роста, 14-е сутки – её завершению и началу стадии экспоненциального роста; на 21-е сутки клеточная культура начинает стареть, что совпадает и с истощением трофических ресурсов, с одной стороны, и с усилением стрессового давления, с другой. На рисунке 1 (а – г) отражены показатели белкового статуса и перераспределения белка в динамике.

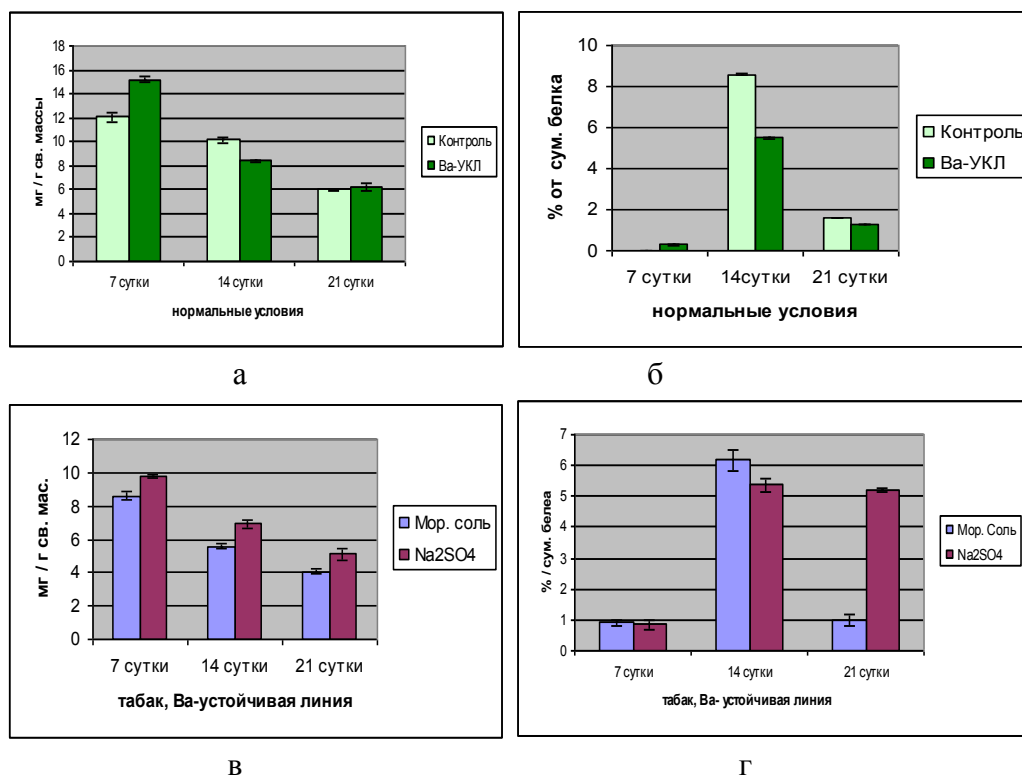


Рис. 1 Содержание клеточного (а, в) и внеклеточного (б, г) белка в клеточных культурах табака

В отсутствие стресса содержание белка в каллусе равномерно снижалось в процессе культивирования. Наибольшее содержание белка в клетках было отмечено на 7-е сутки. От начала пассажа до этого момента клеточная культура находится в lag-фазе которая отличается отсутствием увеличения интегральной клеточной массы, но не синтетических процессов. За это время клетки готовятся к делению. Очевидно, что в этот период максимальный синтез затрагивает полипептиды, связанные с процессом деления. Вполне естественно, что содержание внеклеточного белка минимально, т.к. он задействован внутри клетки. С 7 по 14 сутки при прохождении стадии логарифмического роста содержание внутриклеточного белка убывает и увеличивается содержание белка внеклеточного. По всей вероятности, вне клетки экскретировались полипептиды, связанные с веретеном деления, поскольку деление клеток прекращалось. Поскольку оценивалось содержание водорастворимых белков, то снижение их пула в н.у. свидетельствует, по нашему мнению, не об угнетении, а об актуализации роли связанных белков. Это сопряжено со стадией элонгации (экспоненциального роста) на 14-21 сутки. Клеточная масса увеличивалась за счёт растяжения клеток, следовательно усиливалась роль мембран. На 21-е сутки культура начинает стареть, что происходит при исчерпании (использовании) среды. Снижение содержания белка могло быть отражением общего замедления синтетических процессов. Не исключена также вероятность гидролиза мембранных пролин-обогащённых (PRP) белков. Убытие трофических ресурсов создавало стрессовую ситуацию, а это могло стимулировать аккумуляцию пролина [7-10]. Процесс перераспределения белка в н.у. был полностью тождественен у устойчивых и контрольных культур.

Сохранялись эти закономерности у Va-устойчивой клеточной линии и при культивировании в условиях засоления (рис. 1 в, г). Динамика накопления клеточного белка полностью совпадает с кривой, регистрировавшейся в отсутствие стресса. Это может свидетельствовать в пользу факта нормального функционирования устойчивой клетки. Снижение содержания клеточного белка при засолении, относительно нормальных условий, является отражением не стрессового угнетения, а специализированной адаптации. Об этом, по нашему мнению, свидетельствуют следующие факты. Во-первых, аналогичное содержание внеклеточного белка на 14-е сутки в н.у. и при засолении. Во-вторых, снижение на 21-е сутки внеклеточного белка при культивировании устойчивой культуры на среде с солями морской воды и сохранение его стабильного уровня при выращивании в присутствии сульфата натрия. Это может говорить об его активном транспорте, а не пассивной утечке через повреждённые мембраны. Такая дифференцированная реакция на тип засоления со стороны растущих клеток дополнительное свидетельство их активной адаптации.

Об адаптации к засолению может свидетельствовать также ограниченный полипептидный пул, который определялся на 21-е сутки (рис. 2).

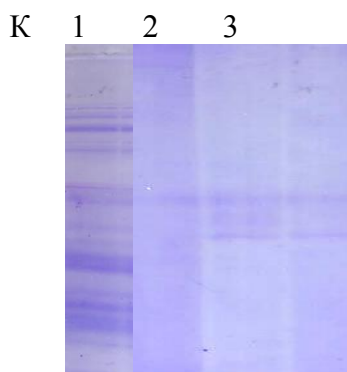


Рис. 2 Электрофореграмма водорастворимых белков Va-устойчивых клеток табака при культивировании при засолении: К – растение, дикий тип, н.у., 1 – каллус – дикий тип,

засоление, 2 – Ва-устойчивая линия, соли морской воды, 3 – Ва-устойчивая линия, сульфат натрия

По нашему мнению, при летальном засолении в устойчивости клеток ключевую роль играют полипептиды, обеспечивающие функциональную активность (жизнедеятельность). К водорастворимым белкам относятся разнообразные переносчики, способствующие перемещению токсичных ионов из зоны активного метаболизма (цитоплазмы) [11, 12]. Очевидно, что в конце пассажа, при максимальном стрессовом давлении на фоне дефицита ресурсов жизнеспособность клеток поддерживалась за счёт ограниченного спектра синтетических реакций; это видно по отсутствию различий в электрофореграмме полипептидов устойчивых линий.

Отобранные на селективных средах с ионами бария клеточные линии табака росли в условиях летального засоления. Варианты сохраняли жизнеспособность при всех стадиях развития культуры. Известно, что каждая последующая стадия не возможна без успешной реализации предыдущей. Репрессия какой-либо стадии приводила бы к гибели культуры. Это происходило с каллусом дикого типа. При этом жизнедеятельность клеток обеспечивалась как за счёт общей (системной) устойчивости, так и за счёт адаптации к типу засоления. Это отражалось на белковом статусе клеток, который предполагает направленный белковый синтез и перераспределение белка в ходе прохождения клеточного цикла.

В последнее время при изучении клеточных культур особый интерес вызывают внеклеточные белки в связи с их способностью к фосфорилированию по сайтам тирозина [13]. При этом подчёркивают два обстоятельства. Первое связано со статусом культуры, а именно – способностью к морфогенезу. Второе указывает на то, что ряд протеинов фосфорилируется исключительно вне клетки. Оба эти события имеют значение при клеточной селекции, т.к. регенерация растений из устойчивых клеточных линий исключительный феномен.

Использование ионов тяжёлых металлов в клеточной селекции для получения форм растений с повышенным уровнем устойчивости к осмотическим стрессам является совершенно новым направлением биотехнологии [14]. Поэтому установление показателей, сопряжённых с адаптацией (не стрессом), возможно осуществить, произведя идентификацию протеинов, синтезируемых у устойчивых клонов. Данное исследование только показало общее направление. В дальнейшем предполагается произвести анализ клеточных и внеклеточных белков. Это может предоставить возможность установления, выделения и клонирования новых генов.

### ВЫВОДЫ

1. У Ва-устойчивых клеточных линий табака, культивируемых при засолении, сохраняется нормальная динамика синтеза/эксекреции полипептидов.
2. Сохранение способности к перераспределению белка в условиях жёсткого засоления у клеточных линий можно считать надёжным показателем стрессоустойчивости.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Сергеева Л.Е. Новая селективная среда с ионами бария – альтернативная система для отбора солеустойчивых клеточных линий / Л.Е. Сергеева // Биотехнология. – 2002. – № 2. – С.47-52.
2. Fan L.-M. Identification and characterization the inward K<sup>+</sup> channel in the plasma membrane of Brassica pollen protoplasts / L.-M. Fan, W.-H. Wu, Y.-Y. Yang // Plant and Cell Physiol. – 1999. – Vol. 40, №8. – P.859-865.

3. Systems involved in K<sup>+</sup> uptake from diluted solutions in pepper plants and revealed by use of specific inhibitors / [Rubio F., Arevalo L., Caballero F. et al.] // *J. Plant Physiol.* – 2010. – Vol. 167. – P.1494-1499.
4. Gamborg J.L. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean roots / J.L. Gamborg // *Exp. Cell Res.* – 1968. – Vol. 509. – P.151-158.
5. Степанченко Н.С. Количественное определение содержания белка / Н.С. Степанченко // *Физиол. растений.* – 2011. – Т. 58. – P.624-630.
6. Laemmli U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – P.680-685.
7. Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of the proline biosynthesis upon cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* / [Savouré A., Hua X.J., Bertauche N. et al.] // *Mol. and Gen. Genet.* – 1997. – Vol. 254. – P.104-109.
8. Proline accumulation and real time PCR expression analysis of genes encoding enzymes of proline metabolism in relation to drought tolerance in Andean potato / [Schafleitner R., Gaudin A., Gutierrez G. et al.] // *Acta Physiol. Plant.* – 2007. – Vol. 29. – P.19-26.
9. Влияние водного стресса на содержание растворимого белка, растворимого сахара и пролина у *Tamarix hispida* / [Shi Y.-W., Wang Y.-l., Li W.-b. et al.] // *Xinjiang norgye daxue xuebao*=*J. Xinjiang Agr. Univ.* – 2007. – Vol. 30. – P.5-8.
10. Сергеева Л.Е. Изменения культуры клеток под действием стресса / Сергеева Л.Е. – К. : Логос – 2001. – 100с.
11. Wakeel A. Proteome analysis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) elucidates constitutive adaptation during the first phase of salt stress / A. Wakeel // *J. Plant Physiol.* – 2011. – Vol. 168. – P.519-526.
12. Askari H. Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptica* leaves / H. Askari // *Proteomics.* – 2006. – Vol. 6. – P.2542-2554.
13. Тирозиновое фосфорилирование клеточных белков суспензионных культур клеток гречихи татарской с разной морфогенной способностью / Петрова Н.П., Акулов А.Н., Каримова Ф.Г., Румянцева Н.И. // X Межд. конф. “Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология” 14-18 октября 2013г., Казань : Сб. тезисов. – 2013. – С. 80-81.
14. Декларационный патент на изобретение №44487 А (2001), А01Н1/04, А01Н4/00 Способ отбора устойчивых к засолению клеточных линий растений / Сергеева Л.Е., подача 18.04.2001, опубликовано 15.02.2002, бюл. №2.

#### REFERENCES

1. Sergeeva L.E. Novaja selektivnaja sreda s ionami barija – al'ternativnaja sistema dlja otbora soleustojchivyh kletochnyh linij / L.E. Sergeeva // *Biotehnologija.* – 2002. – №2. – S.47-52.
2. Fan L.-M. Identification and characterization the inward K<sup>+</sup> channel in the plasma membrane of Brassica pollen protoplasts / L.-M. Fan, W.-H. Wu, Y.-Y. Yang // *Plant and Cell Physiol.* – 1999. – Vol. 40, №8. – P.859-865.
3. Systems involved in K<sup>+</sup> uptake from diluted solutions in pepper plants and revealed by use of specific inhibitors / [Rubio F., Arevalo L., Caballero F. et al.] // *J. Plant Physiol.* – 2010. – Vol. 167. – P.1494-1499.
4. Gamborg J.L. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean roots / J.L. Gamborg // *Exp. Cell Res.* – 1968. – Vol. 509. – P.151-158.
5. Stepanchenko N.S. Kolichestvennoe opredelenie soderzhaniija belka / N.S. Stepanchenko // *Fiziol. rastenij.* – 2011. – Т. 58. – P.624-630.

6. Laemmli U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – P.680-685.
7. Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of the proline biosynthesis upon cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* / [Savouré A., Hua X.J., Bertauche N. et al.] // *Mol. and Gen. Genet.* – 1997. – Vol. 254. – P.104-109.
8. Proline accumulation and real time PCR expression analysis of genes encoding enzymes of proline metabolism in relation to drought tolerance in Andean potato / [Schafleitner R., Gaudin A., Gutierrez G. et al.] // *Acta Physiol. Plant.* – 2007. – Vol. 29. – P.19-26.
9. Vlijanje vodnogo stressa na sodержanie rastvorimogo belka, rastvorimogo sahara i prolina u *Tamarix hispida* / [Shi Y.-W., Wang Y.-l., Li W.-b. et al.] // *Xinjiang norgye daxue xuebao*=*J. Xinjiang Agr. Univ.* – 2007. – Vol. 30. – P.5-8.
10. Sergeeva L.E. Izmenenija kul'tury kletok pod dejstviem stressa / Sergeeva L.E. – K. : Logos – 2001. – 100 s.
11. Wakeel A. Proteome analysis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) elucidates constitutive adaptation during the first phase of salt stress / A. Wakeel // *J. Plant Physiol.* – 2011. – Vol. 168. – P. 519-526.
12. Askari H. Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptica* leaves / H. Askari // *Proteomics*. – 2006. – Vol. 6. – P.2542-2554.
13. Tirozinovoe fosforilirovanie kletochnyh belkov suspenzionnyh kul'tur kletok grechihi tatarskoj s raznoj morfogennoj sposobnost'ju / Petrova N.P., Akulov A.N., Karimova F.G., Rumjanceva N.I. // *H Mezhd. Konferencija "Biologija kletok rastenij in vitro i biotehnologija"* 14-18 oktjabrja 2013g., Kazan' : Sb. tezisov. – 2013. – S. 80-81.
14. Deklaracionnyj patent na izobrenenie №44487 A (2001), A01N1/04, A01N4/00 Sposob otbora ustojchivyh k zasoleniju kletochnyh linij rastenij / Sergeeva L.E., podacha 18.04.2001, opublikovano 15.02.2002, bjul.№ 2.