

УДК 581.1:58.02+58.009

## СУМІСНІ ОСМОЛІТИ ПРОЛІН І САХАРОЗА В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ РОСЛИНАХ ТЮТЮНУ ЗА ДІЇ ЛЕТАЛЬНОГО ВОДНОГО СТРЕСУ

Л.Є. СЕРГЄЄВА, В.М. КУРЧІЙ, Л.І. БРОННІКОВА

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17*

Досліджували вміст вільного проліну та співвідношення вуглеводів у  $R_1$  рослин тютюну, отриманих зі стійких до іонів кадмію клітинних ліній. Експериментальні рослини виявляли стійкість до модельованого летального для контрольних рослин водного стресу (0,3 М маніту). На п'яту добу дії такого стресу в рослинах зростав рівень вільного проліну, знижувались вміст сахарози і співвідношення сахароза/моноцукри, що може свідчити про ключове значення проліну за постійного стресу. З підвищенням стресового тиску (0,6 М маніту) рівень амінокислоти знижувався, а вміст сахарози і співвідношення вуглеводів збільшувались, що може вказувати на спільну захисну роль обох сполук. Стійкість  $R_1$  рослин виявлялась не тільки за дії стресу, а й за відновлення, що є особливістю цих генотипів.

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

Проблема дії абіотичних стресорів стає в ряд першочергових з огляду на збільшення їх спектра та розширення діапазону уражень. Проте в центрі уваги була і залишається посуха. Дослідженням водного стресу *in vivo* й *in vitro* підтверджено, що зневоднення є першопричиною істотного обмеження (припинення) життєдіяльності організму. Здатність контролювати переміщення води, а разом з нею — розчинених у ній речовин усередину/назовні клітини є об'єктивним показником стійкості. Висока позитивна кореляція між здатністю зв'язувати воду та стійкістю зареєстрована у багатьох рослин [6, 12, 14]. Рослини здатні продукувати низькомолекулярні сумісні сполуки, що акумулюються у значних кількостях. У результаті вирівнюється осмотичний потенціал, стабілізується іонний склад, підтримуються біологічно активні компартменти клітини. Насамперед це стосується вільного проліну (Pro) і сахарози, між вмістом яких у клітинах встановлено зв'язок. Проте цей зв'язок неоднозначний, оскільки крім протекторної дії обидві сполуки здатні впливати на загальні процеси росту і розвитку [11]. У низці випадків зафіксовано координовані кількісні та якісні зміни вмісту згаданих осмолітів. У ряду диких середземноморських ксерофітів встановлено, що генотипи, які накопичували в клітинах пролін, містили менше вуглеводів і навпаки. Це означає, що окремі види акумулюють переважно один тип осмолітів [7]. У калюсі батату в умовах жорсткого модельованого водного стресу вміст

розчинного цукру впродовж короткого періоду швидко зростає, а потім так само швидко знижується. Водночас рівень проліну в середині й наприкінці стресу підвищується, чим компенсувалось зменшення концентрації цукру [13]. Крім того, експресію низки генів можуть регулювати як Pro, так і сахароза. Встановлено, що ген синтезу Pro *P5KS* (кодує  $\Delta^1$ -піролін-5-карбоксилатсинтетазу) ініціюється високою концентрацією сахарози і пригнічується проліном, а ген проліндегідрогенази ПДГ *ProDH* діє у протилежному напрямі [8, 11]. Водночас рівень сахарози прямо пов'язаний із рівнем моноцукрів [3]. Так відбувається переміщення вуглеводів у нефотосинтезувальні тканини рослинного організму, що має особливе значення, якщо ці тканини зазнають безпосередньої стресової дії, наприклад, коренева система під час посухи або засолення. Отже, інтенсивність метаболізму сахарози (співвідношення сахароза/моноцукри) за стресових умов може слугувати показником життєздатності організму. У зв'язку з цим встановити взаємозв'язок пролін—сахароза за дії водного стресу доцільно і необхідно. Особливо це актуально, якщо йдеться про експериментально отримані рослини, оскільки нові дані можуть істотно вплинути на подальше спрямування досліджень.

Ми отримали рослини тютюну з підвищеним рівнем стійкості до водного стресу *in vitro* та *in vivo*, застосувавши для цього метод клітинної селекції з іонами важкого металу кадмію [5]. Відібрані клітинні лінії тютюну, а також регенеранти й насіннєве покоління  $R_1$  вирізнялись підвищеною стійкістю до зневоднення, яка координувалась зі зростанням рівня вільного Pro.

Метою нашої роботи було встановлення ролі проліну і співвідношення сахароза/моноцукри у підтриманні осмостійкості отриманих варіантів рослин тютюну.

### Методика

Насіння тютюну  $R_1$  і насіння контрольного варіанта (сорт Дюбек) пророщували на дистильованій воді [5]. Проростки завдовжки ~1 см переносили в ґрунт для дорошування. Для досліду обирали стандартизовані рослини з розвинутою кореневою системою й надземною частиною заввишки не менш як 10 см. Експериментальні рослини відмивали від ґрунту і переносили у водні розчини: 0,5 поживного розчину Кнопа (нормальні умови, н.у.); 0,5 поживного розчину Кнопа з додаванням 0,3 або 0,6 М маніту (відповідно стрес I і стрес II; порядок стресового навантаження — почерговий). За дії стресу I рослини витримували упродовж 5 діб, після чого умови змінювали: рослини переміщували в н.у. або збільшували стресове навантаження (0,3 М → 0,6 М), що мало виявити статус рослини, а саме — життєдіяльність чи пригнічення/загибель за дії стресу I. За змінених умов рослини витримували протягом 2 діб. Вміст проліну, сахарози, моноцукрів вимірювали на 5-ту й 7-му доби досліду за стандартними методиками [1, 3]. Дані, наведені на рисунках, оброблені статистично.

### Результати та обговорення

Помірні рівні водного дефіциту здатні стимулювати широкий спектр адаптивних реакцій і, навпаки, жорсткий стрес не тільки обмежує життєдіяльність організму, а й може призвести до летального результату.

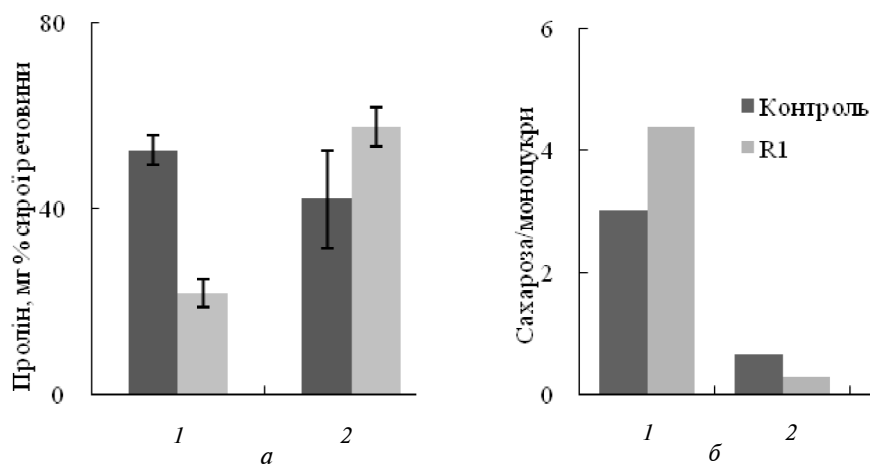


Рис. 1. Вміст проліну (а) і співвідношення вуглеводів (б) в рослинах тютюну на п'яту добу їх витримування у водній культурі:

1 — нормальні умови; 2 — 0,3 М розчин маніту

Визначено показники рослин на п'яту добу їх тестування у водній культурі (рис. 1). Встановлено, що за н.у. рівень вільного проліну контрольних рослин істотно (у 2,5 раза) перевищував цей показник у рослин  $R_1$ . Водночас співвідношення сахароза/моноцукри в рослинах дикого типу було меншим. В обох випадках досліджувані органічні сполуки були ендogenousними продуктами синтезу, оскільки до складу поживного розчину не входили. Ці параметри відображають нормальну життєдіяльність усіх рослин взагалі, а також особливості вияву досліджуваних параметрів у рослин контрольного варіанта та  $R_1$ . Відмінність між варіантами — суто генотипна.

Дія модельованого водного стресу упродовж 5 діб викликала зміни вимірюваних показників: рівень вільного проліну в рослин контрольного варіанта неістотно знижувався, в рослин  $R_1$  — значно зростав; співвідношення вуглеводів різко зменшувалось у всіх генотипів. Так виявлялась відмінність осмотичності рослин. Розчин маніту концентрацією 0,3 М помітно впливав на тютюн: в усіх рослин значно зменшувался тургор листків. Таку реакцію на дію маніту фіксували й раніше [5]. Після повернення рослин у н.у. всі рослини  $R_1$  відновлювались, а контрольні — ні, зовнішній вигляд контрольних рослин навіть погіршувався. Можна припустити, що у контрольних рослин визначені кількості органічних сполук були наслідком деградації/деструкції клітинних структур. У випадку Pro це могли бути збагачені згаданою амінокислотою поліпептиди клітинної стінки і мембран [9, 10]. Зниження вмісту сахарози (з  $28,0 \pm 1,1$  до  $20,4 \pm 2,4$  мкмоль/г) та співвідношення сахароза/моноцукри (див. рис. 1, б) було наслідком втрати клітинного вмісту через порушення цілості мембран. Раніше ми виявили ушкодження мембран листових дисків під дією осмотичного шоку в рослин тютюну дикого типу втричі масштабніші, ніж у регенерантів, отриманих зі стійких до катіонів важких металів клітинних ліній [5].

Якщо показники рослин контрольного варіанта відображали їх загибель, то дані варіанта  $R_1$  були результатом підтримання життєдіяльності за стресових умов, оскільки відновлення відбувалось. На п'яту до-

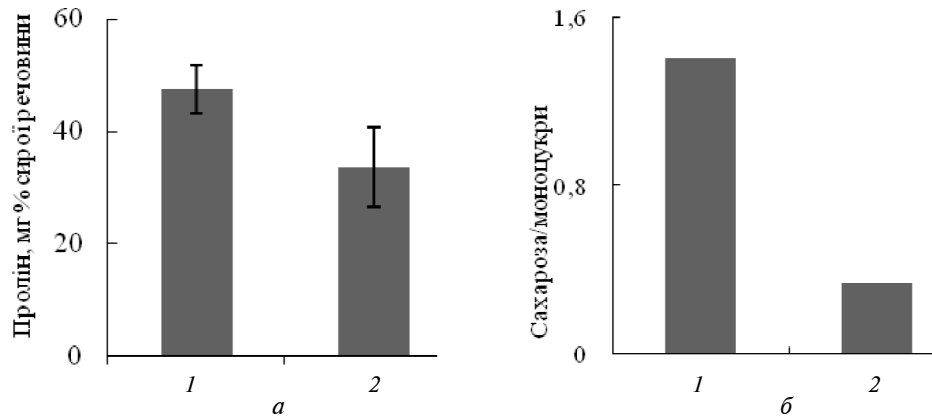


Рис. 2. Вміст проліну (а) і співвідношення вуглеводів (б) в рослинах  $R_1$  тютюну за зміни умов культивування на другу добу (загальний строк культивування — 7 діб):

1 — нормальні умови; 2 — 0,6 М розчин маніту

бу дії стресу рівень проліну в рослин  $R_1$  перевищував показник, зафіксований за нормальних умов, приблизно втричі, співвідношення вуглеводів знижувалось відносно показників норми й поступалось контрольним даним майже вдвічі (див. рис. 1); при цьому рівень сахарози не відрізнявся від показника, зафіксованого на цей час у рослин дикого типу і становив  $19,5 \pm 2,3$  мкмоль/г тканини. Безперечно, в цьому разі реалізовувалась насамперед водоутримувальна функція проліну [11].

У разі переміщення рослин  $R_1$  з умов дії стресу I (0,3 М маніту) в інші наставали зміни (рис. 2). На рисунку наведено дані лише для рослин  $R_1$ , оскільки рослини дикого типу за дії стресу I гинули.

На другу добу відновлення (0,5 поживного розчину Кнопа) рівень  $P_{го}$  в рослинах дещо знизився, співвідношення вуглеводів зросло більш як у 5 разів, вміст сахарози збільшився до  $25,9 \pm 1,1$  мкмоль/г тканини (відносно показників, виміряних за наявності 0,3 М маніту). Останнє може свідчити про активування процесів фотосинтезу.

За чергування умов культивування стрес I  $\rightarrow$  стрес II наставали такі зміни: відносно даних, зафіксованих за наявності 0,3 М маніту рівень  $P_{го}$  в рослинах знижувався на ~40 %, абсолютний вміст сахарози зростав на ~53 % і становив  $38,9 \pm 2,3$  мкмоль/г тканини, тобто вміст проліну і співвідношення вуглеводів змінювались адекватно (відповідно в ~1,7 та 1,9 раза). При цьому рівень вуглеводів, ймовірно, зростав унаслідок метаболізму проліну, оскільки за умов, що обмежують процес фотосинтезу, цей осмоліт може бути додатковим джерелом вуглецю [11].

На нашу думку, життєдіяльність рослин  $R_1$  за дії водного стресу підтримувалась так: за п'ятидобового стресу I (0,3 М маніту) активувався синтез вільного  $P_{го}$ , досягнений рівень амінокислоти був достатнім для запобігання критичному зневодненню. Крім того  $P_{го}$  міг слугувати резервним джерелом вуглецю в разі уповільнення прямого синтезу вуглеводів, тобто пролін в адаптивних реакціях відігравав пріоритетну роль; зі збільшенням стресового навантаження маніту (0,3  $\rightarrow$  0,6 М) зростала роль сахарози. При цьому ми вважаємо, що кількість сахарози збільшувалась унаслідок її утворення з проліну, хоча не можна виключати синтез *de novo*. Раніше було виявлено підвищення активності

сахарозофосфатсинтази — ключового ферменту синтезу сахарози — в листках кукурудзи на другу добу водного стресу [2, 3]. Очевидно, паралельна акумуляція двох сумісних осмолітів підвищувала стійкість рослин  $R_1$ , оскільки вони були здатні до відновлення і в цьому випадку. Здатність до відновлення — важлива характеристика генотипу. В багатьох випадках рослини, піддані жорстким стресам, після переміщення в нормальні умови починали активно виділяти клітинні метаболіти і гинули [4].

Оцінивши динаміку акумуляції сумісних осмолітів — проліну і сахарози — в  $R_1$  рослин тююну, стійких до дії летального водного стресу, можна дійти таких висновків. В умовах постійної дії стресу пріоритетна роль в адаптації належить проліну, а зі збільшенням стресового тиску роль сахарози як стресового протектора зростає. Обидві органічні сполуки відіграють спільну роль у захисті рослин від зневоднення.

1. Андрущенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon Tourm* // Изв. АН Молд. ССР. — 1981, № 4. — С. 55—60.
2. Сакало В.Д., Курчій В.М. Активність сахарозосинтази та інвертази в етіологованих проростках кукурудзи за дії стресових чинників // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — **41**, № 5. — С. 400—407.
3. Сакало В.Д., Ларченко К.А., Курчій В.М. Синтез і метаболізм сахарози в листках проростків кукурудзи за умов водного дефіциту // Там само. — № 4. — С. 305—313.
4. Сергеева Л.Е. Изучение клеточных линий табака, устойчивых к солевому и водному стрессам, и регенерантов из них: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1991. — 21 с.
5. Сергеева Л.Е. Клеточная селекция с ионами тяжелых металлов для получения генотипов растений с комплексной устойчивостью к абиотическим стрессам. — Киев: Логос, 2013. — 211 с.
6. Battaglia M., Solorzano R.M., Hernandez M. et al. 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.
7. Boscaiu M., Esperanza M., Fola O. et al. Osmolyte accumulation in xerophytes as a response to environmental stress // Bul. Univ. Agr. Sci and Vet Med. Cluj-Napoca Hort. — 2009. — **66**. — P. 96—102.
8. Kiyosue T., Yoshida Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase an enzyme involved in proline metabolism, up regulated by proline but down regulated by dehydration in Arabidopsis // Plant Cell. — 1996. — **8**. — P. 1323—1335.
9. Showalter A.M., Keppler B., Lichtenberg J. et al. A bioinformatics approach to the identification, classification and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins // Plant Physiol. — 2010. — **153**. — P. 485—513.
10. Stein H., Honig A., Miller G. et al. 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. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sci. — 2010. — **15**. — P. 89—97.
12. Vertucci C.W., Leopold A.C. The relationship between water binding and desiccation tolerance in tissues // Plant Physiol. — 1987. — **85**. — P. 232—238.
13. Wang L., Zhang L., Chen G., Li X. Физиологические реакции каллюса батата на засуху и солевой стресс // Shengtaixue zazhi = Ch. J. Ecol. Bot. — 2005. — **25**. — P. 1508—1514.
14. Xiong L., Wang R.-G., Mao G., Koczan J.M. Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid // Plant Physiol. — 2006. — **142**. — P. 1065—1074.

Отримано 20.04.2016

СОВМЕСТИМЫЕ ОСМОЛИТЫ ПРОЛИН И САХАРОЗА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛЕТАЛЬНОГО ВОДНОГО СТРЕССА

*Л.Е. Сергеева, В.М. Курчий, Л.И. Бронникова*

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследовали содержание свободного пролина и соотношение углеводов у  $R_1$  растений табака, полученных из устойчивых к ионам кадмия клеточных линий. Экспериментальные растения проявляли устойчивость к моделированному летальному для контрольных растений водному стрессу (0,3 М маннита). На пятые сутки действия такого стресса в растениях возрастал уровень свободного пролина, снижались содержание сахарозы и соотношение сахароза/моносахара, что может свидетельствовать о ключевом значении пролина при постоянном стрессе. При повышении стрессового давления (0,6 М маннита) уровень аминокислоты снижался, а содержание сахарозы и соотношение углеводов увеличивались, что может указывать на общую защитную роль обоих соединений. Устойчивость  $R_1$  растений проявлялась не только при действии стресса, но при восстановлении, что является особенностью данных генотипов.

COMPATIBLE OSMOLITES PROLINE AND SUCROSE IN EXPERIMENTAL TOBACCO PLANTS UNDER EFFECT OF LETHAL WATER STRESS

*L.E. Sergeeva, V.M. Kurchii, L.I. Bronnikova*

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The proline level and sucrose/monosaccharides ratio in  $R_1$  tobacco plants, obtained from Cd-resistant cell lines were investigated. Those plants challenged the lethal for wild type plants water stress (0,3 M mannitol). The proline level increased, sucrose content and carbohydrate ratio decreased in plants on 5 day of stress pressure. These data reflects the proline key role in plants, cultivated under permanent stress conditions. But the proline content reduced and sucrose content and carbohydrate ratio raised in adequate proportions, if water stress increased (0,6 M mannitol). The osmolytes developed common protective role under those conditions. Stress tolerance was detected for  $R_1$  plants during recovery period too.

*Key words:* tobacco, cell selection, cadmium cations, water deficit, tolerance, proline, sucrose, monosaccharides.