

<https://doi.org/10.15407/frg2020.01.064>

УДК 581.143.6+58.009

## СУМІСНІ ОСМОЛІТИ – ПРОЛІН І САХАРОЗА – У КОМПЛЕКСНО СТІЙКИХ КЛІТИННИХ ЛІНІЯХ ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ

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

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17  
e-mail: Zlenko\_lora@ukr.net*

Кардинальна зміна/погіршення довкілля вказує на появу нових антропогенних токсикантів, які у поєднанні з природними несприятливими чинниками посилюють стресовий тиск. Виникає проблема комбінованих стресів і потреба у генотипах із комплексною стійкістю. В зв'язку з цим на перший план виходить питання встановлення достовірного маркера (маркерів) контролю життєдіяльності організму за стресових умов. У такий спосіб можуть виявитися особливості функціонування стійких форм. До сполук, здатних за стресових умов акумулюватись у значних кількостях, так званих сумісних осмолітів, належать *L*-пролін і сахароза. Встановлено, що вони можуть знаходитись у складних взаємовідносинах і впливати на синтез/накопичення один одного. Система *in vitro* дає змогу визначити роль цих амінокислоти та вуглеводу в підтриманні життєдіяльності стійкого генотипу на клітинному рівні в умовах довготривалого модельованого стресу. Застосування обраної потенційно летальної дози стресового чинника створює умови для розрізнення генетично змінених варіантів і форм із підвищеним рівнем фізіологічної адаптації. Методом клітинної селекції з катіонами кадмію отримано стійкі клітинні лінії (СКЛ) пшениці озимої сорту Достаток. Під час дослідження комплексної стійкості, їх тестували за умов прямої дії летального для дикого типу водного стресу. Водний стрес створювали додаванням маніту. Кадмієстійкі лінії підтримували життєдіяльність за будь-яких стресових умов — дії катіонів  $Cd^{2+}$  чи маніту. В клітинах визначали вміст сумісних осмолітів — проліну і сахарози. Встановлено, що в разі культивування за наявності  $Cd^{2+}$  характер акумуляції протекторних сполук у калюсі спрямований протилежно: невисокий рівень проліну координувався зі значним вмістом сахарози. За умов водного стресу провідну роль відігравав вільний пролін, рівень якого істотно зростає. Зроблено припущення, що комплексна стресостійкість клітинних ліній може підтримуватись за рахунок як специфічних, так і неспецифічних реакцій залежно від умов культивування. Це явище істотно підвищує потенціал життєздатності нової форми. Клітинна селекція із використанням іонів важких металів може забезпечити отримання клітинних форм, які реалізують різні механізми стійкості залежно від типу стресового чинника.

**Ключові слова:** пшениця озима, клітинна селекція, катіони кадмію, водний стрес, стійкі клітинні лінії, пролін, сахароза.

© Л.Є. СЕРГЄЄВА, В.М. КУРЧІЙ, Л.І. БРОННІКОВА, 2020

Абіотичні стреси чинять комплексний негативний вплив на рослинний організм. Так, осмотичні стреси порушують водний баланс, іонний гомеостаз, змінюють, гальмують, навіть зупиняють метаболічні процеси. У зв'язку з цим у рослинах еволюційно закріпилась низка механізмів, функціонування яких спрямоване на підтримання життєдіяльності організму за стресових умов.

Серед них важливими є реакції, спряжені із акумуляцією низькомолекулярних протекторних сполук, таких як пролін та його похідні, аміни, олігосахариди, гліцерин. Ці речовини (сумісні осмоліти) можуть прямо чи опосередковано взаємодіяти між собою.

Розглядаючи їхню роль, насамперед акцентують увагу на *L*-проліні. Винятковість цієї сполуки зумовлена її структурною формулою, а саме наявністю  $\alpha$ -атома азоту в піролідиновому кільці, внаслідок чого пролін (*pro*) не піддається дії ферментів амінокислотного метаболізму. Метаболізм *pro* підпорядковується власній системі синтезу—деградації—транспорту. Встановлено, що рівень вільного *pro* — істотно динамічний показник, чутливий до зовнішніх впливів [1]. Водночас незаперечним є факт акумуляції цієї амінокислоти за дії різноманітних біотичних та абіотичних стресів [2]. Таким чином реалізується фізіологічна поліфункціональність вільного *pro*: детоксикувальна, осморегулювальна, стабілізувальна [1].

В останні роки цю сполуку розглядають як регуляторну молекулу, пов'язану з метаболізмом інших сумісних осмолітів, а саме — сахарози. При цьому нерідко їх синтез і накопичення можуть координуватись. Так, у калюсі батату під дією жорсткого водного стресу вміст розчинних цукрів за короткий проміжок часу швидко підвищувався, а потім так само швидко знижувався. Зменшення вмісту вуглеводів компенсувалось зростанням рівня *pro* в середині та наприкінці стресу [3].

Цінну інформацію про взаємозв'язок пролін—вуглеводи можна отримати в процесі дослідження трансгенних рослин зі змінним рівнем експресії генів, які контролюють метаболізм цих сполук. Їще важливішим є аналіз культури клітин, ініційованих із таких форм, оскільки в цьому разі виключається перерозподіл сполук між органами, який зазвичай має місце. Так, при дослідженні калюсних культур кукурудзи, отриманих із трансгенних рослин із частково репресованим геном проліндегідрогенази, на 10-ту добу дії осмотичного стресу фіксували стабілізацію вмісту сахарози й незначне підвищення рівня вільного проліну [4].

Не меншу увагу привертають клітинні лінії рослин із підвищеним рівнем стійкості до осмотичних стресів. Такі лінії можуть розвиватись за дії різних стресових чинників, при цьому життєздатність підтримується за участю різних механізмів стійкості [5].

Вживаність рослин під час водного стресу можуть забезпечувати численні фізіологічні реакції. Відомо, що за таких умов у клітинах можуть акумулюватись дегідрини. Дегідрини — це велика група протеїнів, до яких належать LEA (late embryogenesis abundant proteins), білки пізньої стадії ембріогенезу [6—8]. Учені припускають, що вони

здатні функціонувати аналогічно шаперонам і запобігати денатурації макромолекул при втраті води. Окрім водного стресу накопичення дегідринів можуть стимулювати інші чинники, наприклад саліцилова кислота, хоча її дія неоднозначна [9]. Із насіння рослини *Camellia oleifera* було виділено дегідриноподібний білок CoDH №2 типу SK2, який складається із 208 амінокислотних залишків. Характерною його рисою є наявність збагаченого треоніном високо консервативного мотиву, що стосується фосфорилювання. Водночас функції LEA повністю не встановлені. Їх відкривають у ядрі, цитоплазмі, мітохондріях клітин. LEA вирізняються здатністю зворотно згортатися у спіраль при висушуванні. Через наявність гістидину припускають також можливість зв'язування іонів важких металів [10], хоча встановлено, що катіони важкого металу кадмію ( $Cd^{2+}$ ) істотно пригнічують LEA [11].

Методом клітинної селекції із застосуванням селективної системи з іонами  $Cd^{2+}$  отримано рослинні форми з комплексною стресостійкістю [5]. Клітинні лінії тютюну нормально розвивались за умов летальних для дикого типу клітинних культур стресів — іонного ( $Cd^{2+}$ ) та осмотичного (маніт). Цей підхід було поширено на інші види рослин, а саме на сою, соняшник, пшеницю. Кадмієстійкі клітинні лінії пшениці також характеризувались толерантністю до водного стресу.

Такі варіанти отримано вперше, тому метою дослідження було встановлення значення сумісних осмолітів — проліну та сахарози — у підтриманні життєдіяльності клітин, культивованих на фоні летального для дикого типу водного стресу.

### Методика

Із незрілих зародків пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) сорту Достаток було отримано клітинну культуру, яку в подальшому піддавали клітинній селекції. Селективну систему первинного добору створювали додаванням летальних для клітинних культур дикого типу доз іонів  $Cd^{2+}$  до базового середовища В5 Гамборга [12]. Кадмієстійкі лінії пшениці після набирання необхідної біомаси вирощували паралельно за нормальних (середовище В5) і стресових (стрес I — В5+ $Cd^{2+}$ ; стрес II — В5+маніт) умов. Стресоформувальні агенти добавляли у летальних для клітинних культур дикого типу кількостях. При кожному послідовному пасажуванні здійснювали (або ні) ротацию типів середовища. В усіх випадках культуральні умови обирались довільно. Життєдіяльність клітинних ліній за стресових умов регулярно контролювали вимірюванням відносного приросту сирої біомаси  $\Delta m$  [13]. Для біохімічних аналізів обирали культури, перенесені на шкодочинні середовища з нормальних умов (н. у. → стрес I; н. у. → стрес II). В усіх випадках стреси були летальними для дикого типу.

Рівень вільного проліну вимірювали за модифікованою методикою [14]. Вміст вуглеводів аналізували стандартним методом [15]. Проведено два незалежні експерименти, кожен аналіз

здійснювали у триразовій біологічній повторності. Первинні дані оброблено статистично.

### Результати та обговорення

Відібрані на селективному середовищі з іонами кадмію клітинні лінії пшениці тестували за умов прямої дії водного стресу, який створювали додаванням маніту. Ця сполука не метаболізується клітинами, однак пригнічує їх життєдіяльність, оскільки істотно змінює водний і осмотичний потенціали. Отримані Cd<sup>2+</sup>-стійкі клітинні варіанти не переставали розвиватись на манітовмісному середовищі, про що свідчив відносний приріст біомаси, виміряний наприкінці дискретного пасажу.

Життєдіяльність за умов зневоднення має підтримуватись сполуками, здатними перешкоджати критичній втраті води. Такі властивості має *pro* [1, 2]. У табл. 1 наведено показники вмісту проліну у Cd<sup>2+</sup>-стійких клітинних лініях пшениці за різних умов вирощування.

Генотипні особливості функціонування систем метаболізму проліну в стійких ліній виявлялись при культивуванні за нормальних умов, а також за внесення іонів Cd<sup>2+</sup>. За нормальних умов такий рівень амінокислоти ймовірно був оптимальним для конкретної лінії.

За наявності Cd<sup>2+</sup> вміст проліну в калюсі Cd-СКЛ № 3 практично не змінювався, а в калюсі Cd-СКЛ № 5 зростав. При цьому рівень стійкості (доза стресового чинника) варіантів був однаковим. На нашу думку, це швидше за все стосується системи синтезу, оскільки за дії водного стресу рівень вільного проліну в клітинах зростав. Зазначалось, що в разі зневоднення рівень експресії гена *П5КС* (ген кодує  $\Delta^1$ -піролін-5-карбоксилатсинтетазу — фермент синтезу проліну) підвищується [1, 2, 16]. Водночас гену *ПДГ* проліндегідрогенази (ген кодує фермент деградації проліну) властива зворотна реакція [17]. Підвищений рівень проліну в Cd<sup>2+</sup>-стійких варіантів міг сприяти утриманню вологи у клітинах за дії водного стресу.

Частина авторів пов'язує Cd-зумовлене зростання рівня вільного *pro* зі змінами водного статусу рослин, а саме — з водним дефіцитом [18, 19]. При цьому передбачається, що пролін хелатує Cd<sup>2+</sup> з утворенням нетоксичного комплексу Cd<sup>2+</sup>-пролін [18].

У наших експериментах Cd-СКЛ пшениці при культивуванні на середовищі з манітом акумулювали *pro*. На нашу думку, це є неспецифічною реакцією, ймовірно, не пов'язаною безпосередньо зі стійкістю до іонів Cd<sup>2+</sup>. Відомо, що водний дефіцит чинить ком-

ТАБЛИЦЯ 1. Вміст вільного проліну (мг%/сирю речовину) у калюсі кадмієстійких ліній пшениці за різних умов культивування

Кадмієстійка клітинна лінія	Умови культивування		
	Контроль, н. у., середовище В5	Стрес I В5+Cd <sup>2+</sup>	Стрес II В5+маніт
Лінія № 3	25,69±4,66	22,26±2,01	66,45±3,99
Лінія № 5	35,43±7,12	60,35±5,43	74,70±9,17

плексну патологічну дію, і пролін у цьому разі може реалізувати свої численні протекторні характеристики [1, 2].

Вище уже згадувалось про взаємозв'язок пролін—сахароза. Оскільки Cd-СКЛ росли за однакових стресових умов, що вказує на однаковий рівень комплексної стійкості, паралельно оцінювали характер акумуляції сахарози в клітинах (табл. 2). Слід зазначити, що на відміну від проліну, який мав ендогенне походження, сахароза переносилась із поживного середовища і споживалась/запасалась при розвитку калюсу в мірі потреби, тому характер акумуляції цієї сполуки може свідчити на користь особливостей життєдіяльності клітинних ліній за різних умов культивування.

За нормальних умов лінії різнились (~37 %) за вмістом сахарози; спостерігалась повна аналогія з проліном (~40 %). За культивування за наявності Cd<sup>2+</sup> лінії виявляли протилежні тенденції, а саме: високий вміст сахарози поєднувався з незначним рівнем проліну (Cd-СКЛ № 3) і навпаки (Cd-СКЛ № 5). Отже, в процесі первинної селекції відібрано два типи іоностійких клітинних ліній, які за реакцією на Cd<sup>2+</sup> умовно можна схарактеризувати як «пролінасоційовану» Cd-СКЛ № 5 та «сахарозоасоційовану» Cd-СКЛ № 3. Цей факт може свідчити на користь реалізації специфічних механізмів стійкості.

Про можливість отримання мутантів із різною реакцією на наявність Cd<sup>2+</sup> повідомили автори праці [20]. Три лінії мутантів арабідопсису демонстрували різні відповіді на дію іонів кадмію. Так, лінія MRC-32 мала підвищену стійкість до токсиканта та за рівнем його накопичення переважала дикий тип. Коренева система лінії MRC-22 демонструвала виражене не чітко сприйняття наявності Cd<sup>2+</sup> як такого. Лінія MRC-26 акумулювала в надземній частині токсиканта менше, ніж рослини дикого типу. Це явище автори трактували як вияв мутації, пов'язаної з дефектом перенесення іонів важкого металу з кореневої частини рослини в надземну. Автори праці [21], навпаки, зазначали перевагу в акумуляції Cd<sup>2+</sup> у кореневій частині гібридів тополі. Акумуляція Cd<sup>2+</sup> супроводжувалась акумуляцією *pro*.

За культивування на манітовмісному середовищі в клітинах накопичувалась сахароза паралельно з акумуляцією *pro*. Оскільки це явище фіксували в обох стійких ліній, то можна припустити, що в цьому разі реалізовувались універсальні (неспецифічні) механізми стійкості.

Раніше було встановлено, що швидка індукція транскрипції одного з генів проліндегідрогенази — *ProDH2* — відбувається за участю транскрипційного фактора *bZIP11*, який активується сахарозою. Вод-

ТАБЛИЦЯ 2. Вміст сахарози (мкМ/г сирої речовини) у калюсі кадмієстійких ліній пшениці

Кадмієстійка клітинна лінія	Умови культивування		
	Контроль, н. у., середовище B5	Стрес I B5+Cd <sup>2+</sup>	Стрес II B5+маніт
Лінія № 3	96,27±3,28	139,26±5,15	140,04±10,61
Лінія № 3	132,11±1,01	71,34±12,50	141,00±14,91

ночас цей олігосахарид сам по собі пригнічує експресію гена *ProDH2*, тоді як *pro* його індукує [22, 23].

Однак за дії довготривалого водного стресу, що мало місце у нашому експерименті, зростання рівня *pro* коректніше, на нашу думку, пов'язати з активуванням системи його синтезу. Доступність екзогенної сахарози у поживному середовищі та інтенсифікація її переміщення тільки підтримували й полегшували перебіг метаболічних процесів. За дії модельованого водного стресу ключову роль у підтриманні життєдіяльності  $\text{Cd}^{2+}$ -стійких клітинних ліній відігравав вільний пролін.

Результати дослідження характеру реакцій на стрес  $\text{Cd}^{2+}$ -стійких клітинних ліній пшениці дають підставу зробити кілька висновків. По-перше, рівень акумуляції протекторних сполук (пролін, сахароза) у  $\text{Cd}^{2+}$ -стійких ліній при культивуванні за наявності іонів важких металів мав протилежний характер. По-друге, відібрані методом клітинної селекції з катіонами  $\text{Cd}^{2+}$  лінії характеризувались стійкістю до летального для культур дикого типу водного стресу. По-третє, провідну роль серед механізмів осмостійкості відігравав вільний пролін, вміст якого за впливу маніту істотно зростав. Комплексна стресостійкість клітинних ліній може підтримуватись за рахунок як специфічних так і неспецифічних реакцій залежно від умов культивування. Це явище істотно підвищує потенціал життєздатності нової форми.

Головним підсумком дослідження слід вважати той факт, що клітинна селекція з іонами важких металів може забезпечити добір спектра клітинних форм, які реалізують різні механізми стійкості за стресових умов.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 2010. **15**. P. 89–97.
2. Hasegawa P.M., Bressan P.A., Zhu J.-K., Bohnert H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 2000. **51**. P.463–499.
3. Wang L., Zhang L., Chen G., Li X. Physiological reactions of batatas calli to drought and salt stress. *Ch. J. Ecol. Bot.* 2005. **25**. P. 1508–1514.
4. Сергеева Л.Е., Курчий В.М., Матвеева А.Ю., Тищенко Е.Н. Содержание пролина и сахарозы в каллюсных культурах кукурузы при моделированных осмотических стрессах. *Физиология растений и генетика.* 2016. **48**, № 2. С. 140–145.
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. Qiang G., Zhai X.-G., Han Z.-X. Cloning and sequence analysis of new gene coding drought tolerance, LEA3 from Tibet hull-less barley. *Acta Agr. Sin.* 2007. **33**. P. 292–296.
7. Tioleter D., Jaquinod M., Mangavel C., Passirani C., Saulner P., Manon S., Teyssier E., Payet N., Avelange-Macherel M.-H., Macherel D. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein by desiccation. *Plant Cell.* 2007. **19**. P. 1580–1587.
8. Verslues P.E., Bray E.A. *LWR1* and *LWR2* are required for osmoregulation and osmotic adjustment in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2004. **136**. P. 2831–2842.
9. Сан С., Си Д.Х., Фен Х., Ду Ц.Б., Лей Т., Меан Х.Г., Мен Х.Х. Двойственное действие салициловой кислоты на накопление дегидринов в проростках ячменя, подвергнутых водному стрессу. *Физиология растений.* 2009. **56**, № 3. С. 388–394.

10. Hu X.-y., Tan X.-f., Tian X.-m. Cloning kDNA, sequences and presumed physiological role of dehydrin-like protein from *Camellia oleifera*. *Acta Bot. Boreali-occid. Sin.* 2008. **28**, N 8. P. 1541–1548.
11. Серегин И.В., Иванов В.Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения. *Физиология растений*. 2002. **48**. С. 606–630.
12. Gamborg J.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean roots. *Exp. Cell Res.* 1968. **509**. P. 151–158.
13. Maliga P. Isolation and characterization of mutants in plant cell culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1984. **35**. P. 519–542.
14. Андрищенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А., 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.
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.
16. Verbruggen N., Hermans C. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*. 2008. **35**. P. 753–759.
17. 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.
18. Pandey N., Sharma C.P. Effect of heavy metals  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  on growth and metabolism of cabbage. *Plant Sci*. 2002. **163**. P. 753–758.
19. Schat H., Sharma S.S., Voolis R. Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal tolerant and nontolerant ecotype of *silene vulgaris*. *Physiol. Plant*. 1997. **101**. P. 477–482.
20. Watanabe A., Ito H., Chiba M., Ito A., Shimizu H., Fuji S., Nakamura S., Hattori H., Chino M., Satoh-Nagasawa N., Takahashi H., Sakurai R., Akagi H. Isolation of novel types of *Arabidopsis* mutants with altered reactions to cadmium: cadmium-gradient agar plates are an effective screen for the heavy metal-related mutants. *Planta*. 2010. **232**. P. 825–836. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1217-7>
21. Nikolic N., Kojic D., Pilipovic A., Pajevic S., Krstic B., Borisev M., Orlovic S. Responses of hybrid poplar to cadmium stress: photosynthetic characteristics, cadmium and proline accumulation, and antioxidant enzyme activity. *Acta Biol. Crac. Series Botanica* 2008. **502**. P. 95–103.
22. Satoh R., Fujita Y., Nakashima K., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. A novel subgroup of bZIP11 proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 2004. **45**, N 4. P. 309–317.
23. Hanson J., Hanssen M., Wiese A., Hendriks V.V.W.B., Smeekens S. The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of Asparagine synthetase1 and Proline dehydrogenase 2. *Plant J*. 2008. **53**, N 6. P. 935–949.

Отримано 01.10.2019

## REFERENCES

1. Szabados, L. & Savoure, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.*, 15, pp. 89-97.
2. Hasegawa, P.M., Bressan, P.A., Zhu, J.-K. & Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 51, pp. 463-499.
3. Wang, L., Zhang, L., Chen, G. & Li, X. (2005). Physiological reactions of batatas calli to drought and salt stress. *Ch. J. Ecol. Bot.*, 25, pp. 1508-1514 [in China].
4. Sergeeva, L.E., Kurchii, V.M., Matveeva, A.Yu. & Tishchenko, E.N. (2016). Proline and sucrose contents in corn calli cultures under simulating osmotic stresses. *Plant Physiology and Genetics*, 48, No. 2, pp. 140-145 [in Russian].
5. Sergeeva, L.E. (2013). Cell selection with heavy metal ions for obtaining plant genotypes with combined resistance to abiotic stresses. Kiev: Logos [in Russian].

6. Qian, G., Zhai, X.-G. & Han, Z.-X. (2007). Cloning and sequence analysis of new gene coding drought tolerance, LEA3 from Tibet hull-less barley. *Acta Agr. Sin.*, 33, pp. 292-296 [in China].
7. Tioleter, D., Jaquinod, M., Mangavel, C., Passirani, C., Saulner, P., Manon, S., Teyssier, E., Payet, N., Avelange-Macherel, M.-H. & Macherel, D. (2007). Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein by desiccation. *Plant Cell.*, 19, pp. 1580-1587.
8. Verslues, P.E. & Bray, E.A. (2004). LWR1 and LWR2 are required for osmoregulation and osmotic adjustment in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 136, pp. 2831-2842.
9. San, S., Si, D.H., Fen, H., Du, C.B., Lei, T., Mean, H.G. & Men, H.H. (2009). Dual effect of salicylic acid on dehydrin accumulation in barley seedlings under water stress. *Fiziologia rastenii*, 56, No. 3, pp. 388-394 [in Russian].
10. Hu, X.-y., Tan, X.-f. & Tian, X.-m. (2008). Cloning kDNA, sequences and presumed physiological role of dehydrin-like protein from *Camellia oleifera*. *Acta Bot. Boreali-occid. Sin.*, 28, No. 8, pp. 1541-1548 [in China].
11. Serioigin, I.V. & Ivanov, V.B. (2002). Physiological aspects of toxic effect of cadmium and lead on higher plants. *Fiziologia rastenii*, 48, pp. 606-630 [in Russian].
12. Gamborg, J.L., Miller, R.A. & Ojima, K. (1968). Nutrient requirement of suspension cultures of soybean roots. *Exp. Cell Res.*, 509, pp.151-158.
13. Maliga, P. (1984). Isolation and characterization of mutants in plant cell culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35, pp. 519-542.
14. Andriushchenko, V.K., Sayanova, V.V., Zhuchenko, A.A., Diyachenko, N.I., Chilikina, L.A., Drozdov, V.V., Korochkina, S.K., Cherep, G.I., Medvedev, V.V. & Niutin, Yu.I. (1981). The modification of proline estimation method for detection drought tolerant forms of genus *Lycopersicon* Tourn. *Izv. Akad. Nauk Mold. SSR*, No. 4, pp. 55-60 [in Russian].
15. Sakalo, V.D., Larchenko, K.A. & Kurchii, V.M. (2009). Synthesis and sucrose metabolism in the leaves of maize seedlings. *Physiology and biochemistry of cult. plants*, 41, No. 4, pp. 305-313 [in Ukrainian].
16. Verbruggen, N. & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35, pp. 753-759.
17. Kiyosue, T., Yoshiba, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. A (1996). 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*, 8, pp. 1323-1335.
18. Pandey, N. & Sharma, C.P. (2002). Effect of heavy metals  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  on growth and metabolism of cabbage. *Plant Sci.*, 163, pp. 753-758.
19. Schat, H., Sharma, S.S. & Voolis, R. (1997). Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal tolerant and nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiol. Plant.*, 101, pp. 477-482.
20. Watanabe, A., Ito, H., Chiba, M., Ito, A., Shimizu, H., Fuji, S., Nakamura, S., Hattori, H., Chino, M., Satoh-Nagasawa, N., Takahashi, H., Sakurai, R. & Akagi, H. (2010). Isolation of novel types of Arabidopsis mutants with altered reactions to cadmium: cadmium-gradient agar plates are an effective screen for the heavy metal-related mutants. *Planta*, 232, pp. 825-836. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1217-7>
21. Nikolic, N., Kojic, D., Pilipovic, A., Pajevic, S., Krstic, B., Borisev, M. & Orlovic, S. (2008). Responses of hybrid poplar to cadmium stress: photosynthetic characteristics, cadmium and proline accumulation, and antioxidant enzyme activity. *Acta Biol. Crac. Series Botanica*, 502, pp. 95-103.
22. Satoh, R., Fujita, Y., Nakashima, K., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). A novel subgroup of bZIP11 proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, 45, No 4, pp. 309-317.
23. Hanson, J., Hanssen, M., Wiese, A., Hendriks, V.V.W.B. & Smeekens, S. (2008). The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of Asparagine synthetase1 and Proline dehydrogenase 2. *Plant J.*, 53, No. 6, pp. 935-949.

Received 01.10.2019



COMPATIBLE OSMOTIC SUBSTANCES – PROLINE AND SUCROSE – IN WHEAT CELL LINES WITH COMBINED STRESS TOLERANCE

*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  
e-mail: Zlenko\_lora@ukr.net

The environment situation nowadays is characterized by toxic influence of anthropogenic matters combined with stress pressure of environmental factors. The obtaining of forms with combined stress tolerance is especial object of breeding programs. The reliable tolerance markers can provide a successful result. It is known that some organic molecules (compatible osmotic substances) are accumulated in plant cells under stress conditions. Free proline and sucrose are the established indicators of plant stress tolerance. Those compounds can directly or indirectly influence upon each other. The in vitro system provides the opportunity to evaluate the contribution of proline and sucrose in situ in the maintenance of cell tolerance. Resistant winter wheat cell lines obtained via cell selection with cadmium cations were investigated under lethal for wild type water stress pressure. Water stress was created by addition of mannitol. Cd-resistant lines maintained viability both under Cd<sup>2+</sup> or mannitol conditions. Contents of compatible osmotic substances — proline and sucrose — were measured in calli. During cultivation at Cd<sup>2+</sup> presence, there was detected the opposite trend of those agents accumulation. The low proline level was coordinated with significant sucrose content. Under water stress proline act a key role, its level considerably increased. There was assumed that cell lines with combined stress resistance may retained by means of specific or unspecific reactions that depended on cultural conditions. This event significantly extends viability potential of new form. Cell selection with heavy metal ions can ensure the obtaining of plant forms with various tolerance mechanisms depended on type of stressor.

*Key words:* winter wheat, cell selection, cadmium cations, water stress, resistant cell lines, proline, sucrose.

СОВМЕСТИМЫЕ ОСМОЛИТЫ – ПРОЛИН И САХАРОЗА – В КОМПЛЕКСНО УСТОЙЧИВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ПШЕНИЦЫ ОЗИМОЙ

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

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины,  
Киев  
e-mail: Zlenko\_lora@ukr.net

Кардинальное изменение/ухудшение окружающей среды указывает на появление новых антропогенных токсикантов, которые, действуя совместно с естественными неблагоприятными факторами, усиливают стрессовое давление. Возникает проблема комбинированных стрессов и потребность в генотипах с комплексной устойчивостью. В связи с этим на первый план выходит вопрос установления достоверного маркера/маркеров контроля жизнедеятельности организма в стрессовых условиях. В этом случае могут проявиться особенности функционирования устойчивых форм. К соединениям, способным при стрессе аккумулироваться в значительных количествах, так называемым совместимым осмолитам, относятся L-пролин и сахароза. Установлено, что они могут находиться в сложных взаимоотношениях и влиять на синтез/накопление друг друга. Система in vitro предоставляет возможность установить роль этих аминокислоты и углевода в поддержании жизнедеятельности устойчивого генотипа на клеточном уровне в условиях продолжительного моделированного стресса. Использование избранной потенциально летальной дозы стрессового агента создает условия для разделения генетически измененных вариантов и форм с повышенным уровнем физиологической адаптации. Методом клеточной селекции с катионами кадмия получены устойчивые клеточные линии (УКЛ) пшеницы озимой сорта Достаток.

Во время исследования комплексной устойчивости их тестировали в условиях прямого действия летального для дикого типа водного стресса. Водный стресс создавали прибавлением маннита. Кадмийустойчивые варианты поддерживали жизнедеятельность при любых стрессовых условиях — действии катионов  $Cd^{2+}$  или маннита. В клетках определяли содержание совместимых осмолитов — пролина и сахарозы. Установлено, что при культивировании при наличии  $Cd^{2+}$  характер аккумуляции протекторных соединений в каллусе направлен противоположно: невысокий уровень пролина координировался со значительным содержанием сахарозы. В условиях водного стресса ведущую роль играл свободный пролин, уровень которого существенно возрастал. Сделано предположение, что комплексная стрессоустойчивость клеточных линий может поддерживаться за счет как специфических, так и неспецифических реакций в зависимости от условий культивирования. Это явление существенно повышает потенциал жизнеспособности новой формы. Клеточная селекция с использованием ионов тяжелых металлов может обеспечить получение клеточных форм, реализующих различные механизмы устойчивости в зависимости от типа стрессового фактора.

*Ключевые слова:* пшеница озимая, клеточная селекция, катионы кадмия, водный стресс, устойчивые клеточные линии, пролин, сахароза.