

УДК 581.143.6

СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНОГО ПРОЛИНА КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ *Nicotiana tabacum* L. ПРИ СТРЕССЕ

Л. Е. Сергеева
Л. И. Бронникова
Е. Н. Тищенко

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев

E-mail: oltyko@gmail.com

Проблема стрессоустойчивости растений — одна из наиболее фундаментальных и является предметом исследований на всех иерархических уровнях. В настоящее время она стала еще более актуальной из-за обеднения дикой и культивируемой флоры, вызванного нарушениями (нередко необратимыми) окружающей среды и климатических условий.

Получены Cd-резистентные клеточные линии табака (*Nicotiana tabacum* L.), обладающие комплексной устойчивостью к разным типам засоления и водному дефициту. Из них выделены варианты (С. №1 и С. №6), растущие на средах, которые содержат трехкратно-летальную дозу ионов кадмия. Клеточные линии продолжали расти в условиях действия летальных доз ионов кадмия, солей морской воды, сульфата натрия, маннита. При этом относительный прирост биомассы каллуса был наивысшим на среде с ионами Cd^{2+} и превышал этот показатель в нормальных условиях. Изучали содержание свободного пролина в клетках в период их активного развития. Уровень свободного пролина у клеточной линии С. №1 при культивировании на всех селективных средах превышал контрольные показатели. У линии С. №6 при выращивании на среде с добавлением Na_2SO_4 уровень пролина был ниже контрольных данных. Максимальное содержание пролина в клетках обеих линий зафиксировано при выращивании на среде с маннитом. Колебания содержания пролина могут быть показателем жизнедеятельности организма в стрессовых условиях. Высказывается предположение о различных механизмах процесса адаптации Cd-устойчивых линий табака к засолению, что может быть обусловлено эпигенетическими изменениями.

Ключевые слова: *N. tabacum* L., клеточные линии, ионы кадмия, осмотический стресс, устойчивость.

Проблема стрессоустойчивости растений — одна из наиболее фундаментальных и является предметом исследований на всех иерархических уровнях. В настоящее время она стала еще более актуальной из-за обеднения дикой и культивируемой флоры, вызванного нарушениями (нередко необратимыми) окружающей среды и климатических условий. Возникает потребность в растениях, способных не только выдерживать неблагоприятные условия, но и активно им противостоять, т. е. функционировать при стрессе. Очевидно, мониторинг таких феноменов в природных ценозах, а особенно их идентификация среди полученных в результате разнообразных биотехнологических экспериментов генотипов, должны базироваться на гарантированных маркерах устойчивости.

Одним из таких показателей может быть содержание свободного пролина. Установле-

на положительная корреляция между содержанием свободного пролина и солеустойчивостью генотипов и гибридов тыквы [1, 2]. Некоторые авторы даже настаивают на стимулирующем действии NaCl на продуцирование глутамата для последующего синтеза пролина [3]. Аналогичное явление прослеживается и при изучении клеточных культур *in vitro* [4]. Отмечено возрастание уровня пролина, связанное с устойчивостью к водному стрессу [5]. В ряде публикаций показана зависимость содержания свободного пролина от действия тяжелых металлов. Так, способность хрустальной травки расти в водной культуре при высоких концентрациях ионов меди или цинка сопровождалась накоплением пролина [6]. Устойчивость к ионам никеля и кадмия также связывают с накоплением пролина [7, 8]. Следует, однако, отметить, что в указанных экспериментах

количество используемых стрессоров, во-первых, не достигало летальных пределов, во-вторых, не была исследована динамика колебаний содержания пролина, что, по нашему мнению, не позволяет установить происхождение данного соединения, а это особенно важно, учитывая фиксированное (во всех публикациях) снижение биомассы тестируемых объектов. В предыдущих публикациях мы сообщали о получении клеточных линий табака, устойчивых к летальным концентрациям ионов Cd^{2+} [9, 10]. Эти линии также росли и пролиферировали при добавлении в культуральные среды летальных доз солей морской воды, сульфата натрия (20 г/л) или маннита (145 г/л). Такие комплексно устойчивые феномены выделены впервые, более того, из них получены фертильные растения, в которых сохраняется перекрестная устойчивость к различным типам засоления и водному дефициту.

Ранее нами было установлено, что комплексная устойчивость клеточных линий табака к различным типам осмотического стресса сопряжена со значительным повышением содержания пролина. При этом имела значение только сила, но не тип стресса [11]. Поэтому представлялось логичным изучить роль пролина у Cd -устойчивых клеточных линий при культивировании на различном стрессовом фоне.

Материалы и методы

Устойчивые клеточные линии табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Самсун отбирали на селективных средах, содержащих 50 мкМ ионов Cd^{2+} (летальная концентрация для клеточных культур табака дикого типа). За время пассирования (более 6 мес) отобранные клоны не только не снижали темп роста, но среди них были выделены варианты (С. №1 и С. №6) с повышенным уровнем устойчивости, растущие в присутствии 150 мкМ данных ионов. Эти клеточные линии переносили на селективные среды, содержащие 20 г/л солей морской воды или сульфата натрия либо 0,8М (145 г/л) маннита. На селективных и контрольной средах устойчивые клеточные линии культивировали при постоянной перемене типа стрессового давления. При этом чередования: стресс А — стресс В, стресс А — контроль, контроль — стресс В всегда было произвольным во избежание адаптации.

Определение свободного пролина производили по модифицированной методике Чинарда [12]. Навеску каллусной ткани расти-

рали в 10 мл 3,0% -го раствора сульфосалициловой кислоты для осаждения протеинов. Гомогенат фильтровали. К 2,0 мл фильтрата приливали 2,0 мл нингидринового реактива, приготовленного без нагревания (1,25 г нингидрина, 30 мл ледяной уксусной кислоты, 20 мл 6 М раствора H_3PO_4), и 2,0 мл ледяной уксусной кислоты. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч на водяной бане при 100 °С, после чего быстро охлаждали до комнатной температуры, переносили в делительную воронку с 4,0 мл толуола и встряхивали. Верхний окрашенный слой (хромофор) колориметрировали против толуола при длине волны $\lambda = 520$ нм. Концентрацию пролина (X) рассчитывали по формуле:

$$X = a \cdot c \cdot v \cdot 100 / a^1 \cdot v^1 \cdot n \cdot 1000,$$

где a — экстинкция опытного раствора; a^1 — экстинкция стандарта; c — концентрация стандарта (мкг); v — разведение (10 мл); n — навеска; v^1 — объем, взятый для цветной реакции (2 мл); 100 — расчет в %; 1 000 — перевод мкг в мг. Стандартную кривую строили по кристаллическому пролину.

Поскольку содержание свободного пролина существенно варьирует в течение суток и зависит от возраста культуры, отбор проб для анализа производили от 8 до 9 ч утра (время максимального синтеза). Уровень аминокислоты определяли на 14- и 21-й дни пассажа; ранее было отмечено, что максимальные абсолютные величины параметра приходятся именно на этот срок [11].

Эффективность — относительный прирост биомассы (Δm), который определяли:

$$\Delta m = (m_k - m_n) / m_n,$$

где m_n , m_k — масса каллуса в начале и конце пассажа соответственно.

Измерения проводили в трехкратной биологической и двукратной аналитической повторностях и статистически обрабатывали.

Результаты и обсуждение

Уровень свободного пролина — динамический параметр, изменяющийся даже в нормальных условиях. Ранее нами был исследован характер флуктуаций в течение пассажа в норме и при стрессе у устойчивых и неустойчивых культур [11, 13]. Установлено, что абсолютная величина данного параметра как таковая, вне привязки к конкретному функциональному состоянию клетки, неинформативна. Содержание пролина в культивируемом каллусе определяли

на 14- и 21-й дни пассажа. Известно, что с 7-го по 14-й день культура клеток проходит стадию логарифмического роста. Это период максимального клеточного деления, следовательно, и максимального использования аминокислот, в том числе пролина, для синтеза протеиновых компартментов. С 14-го дня культура вступает в стадию стационарного роста, которая длится до 21-го дня. Далее начинается старение культуры, ускоряющееся пропорционально исчерпанию ресурсов. Поэтому измерение пролина на 14- и 21-й дни пассажа, по нашему мнению, наиболее адекватно отражает состояние культивируемых клеток в период максимальной физиологической активности.

На диаграммах, представленных на рис. 1, отображено содержание свободного пролина у различных растущих клеточных культур табака, культивируемых в нормальных условиях и на различных селективных средах, а также относительный прирост их биомассы, измеренный в конце пассажа.

Из диаграмм следует, что при культивировании в нормальных условиях (рис. 1, а) содержание свободного пролина в клетках невысокое; существенного различия между культурами дикого типа (контроль) и Cd-устойчивыми вариантами не наблюдалось. Рост клеточных культур в норме аналогичен.

При перенесении устойчивых клеточных линий в селективные условия уровень пролина (относительно параметра, измеренного в нормальных условиях) возрастал. На первый план выступает реакция взаимодействия генотип/среда (G/E).

Селективная среда с ионами кадмия (рис. 1, б). Эта среда содержала 150 мкМ ионов Cd²⁺. Такая концентрация в три раза превосходила летальную дозу, при которой проводили селекцию на устойчивость. Однако исследовавшиеся клеточные линии табака не только продолжали расти в таких жестких условиях, но и отличались максимальным показателем относительного прироста биомассы, превосходившим даже показатель, зафиксированный при выращивании Cd-устойчивых вариантов на контрольной среде. Уровень свободного пролина превышал контрольные значения в 1,6–1,9 раза на 14-й день и более чем в 3 раза — на 21-й день. Столь существенное увеличение содержания аминокислоты в одно и то же время не следует, по нашему мнению, считать следствием стрессовых реакций, учитывая активный рост каллуса. Более вероятно происшедшая в клетках под действием ионов

кадмия стимуляция активности ряда энзимов синтеза пролина по глутаматному пути [14]. Образовавшийся пролин в период активного клеточного деления, вероятно, используется для синтеза протеинов. В пользу такого предположения свидетельствуют данные об увеличении общего числа рибосом и содержании полисом после обработки прорастающих семян гороха ионами кадмия [15]. Вместе с тем имеются данные, указывающие на угнетение роста и снижение уровня пролина пропорционально увеличению концентрации ионов кадмия [16]. Однако в этих случаях были использованы не летальные дозы ионов. Далее с прекращением деления и переходом клеток в стадию стационарного роста (14–21-й дни пассажа) пул пролина возрастал. Генотипических различий в реакции между устойчивыми клеточными линиями не отмечалось.

Селективные среды с солями морской воды и сульфатом натрия (рис. 1, в, г). Устойчивые к ионам кадмия клеточные линии табака росли в присутствии летальных концентраций солей морской воды и Na₂SO₄ (модели сульфатно-хлоридного и сульфатного засоления). Относительный прирост биомассы каллуса, культивируемого при засолении, существенно уступал этому показателю, измеренному у линий, помещенных на среды с ионами кадмия. По темпу роста при засолении устойчивые линии С. №1 и С. №6 отличались незначительно. В то же время содержание свободного пролина указывало на различия в реакции взаимодействия G/E. У линии С. №1 уровень свободного пролина в клетках был аналогичным при культивировании на солевом фоне и в присутствии ионов кадмия (рис. 1, б, в, г). В условиях засоления стабильность содержания пролина в пассаже сохранялась. У линии С. №6, помещенной на засоление, уровень пролина в клетках был более динамичным. Очевидно, Cd-устойчивые линии С. №1 и С. №6 по-разному адаптируются к засолению. Линию С. №1 можно со значительной степенью вероятности отнести к условной категории «пролинпротекторных», т. е. таких, у которых накопление пролина при засолении является основным показателем солеустойчивости. На эту характеристику, особенно сочетающуюся (как в настоящем эксперименте) со снижением относительного прироста биомассы, указывают и другие источники [11, 17]. Учитывая полифункциональную роль пролина при стрессе, в данном случае его можно рассматривать как осморегулирующее соединение [18]. В вакуолях

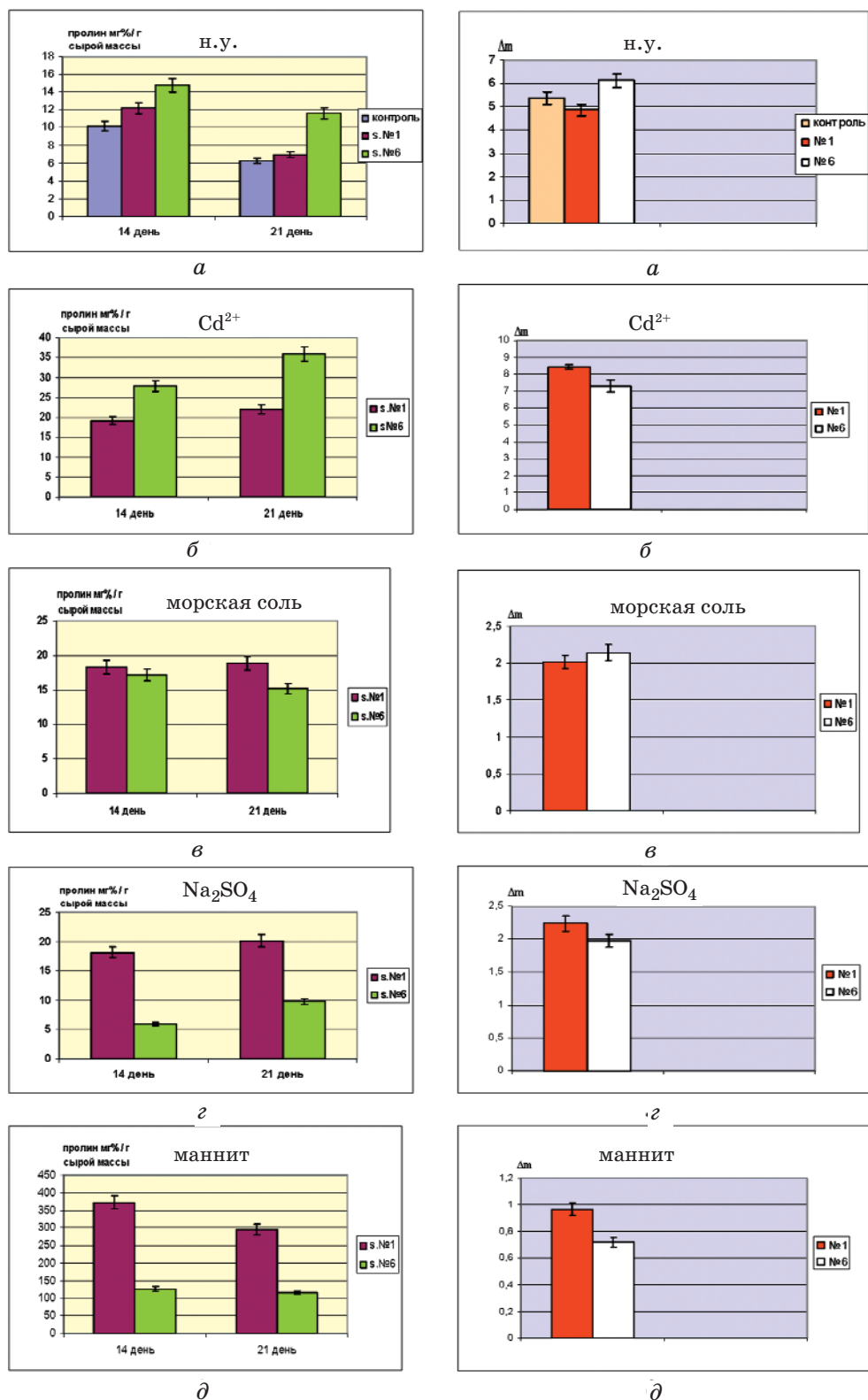


Рис. 1. Влияние условий культивирования на содержание свободного пролина и рост биомассы (Δm) клеточных линий табака №1 и №6:

- а — нормальные условия;
- б — селективная среда, содержащая 150 мкМ Cd^{2+} ;
- в — селективная среда, содержащая 2,0% солей морской воды;
- г — селективная среда, содержащая 2,0% Na_2SO_4 ;
- д — селективная среда, содержащая 0,8 М маннита

клеток при засолении накапливается значительное количество ионов Na^+ , что направлено на защиту компартментов цитоплазмы. В наших экспериментах этот факт также был установлен. Для стабилизации осмотического потенциала в цитоплазме клеток увеличивается уровень пролина [11]. При этом реакция клеток на засоления различного типа единообразна, что можно рассматривать как аргумент осморегулирующей составляющей пролина.

Cd-устойчивая клеточная линия табака С. №6 реагирует на засоление по-иному. Если при выращивании клеток на среде с солями морской воды содержание пролина в них незначительно отличается от контрольных показателей, то при культивировании в условиях сульфатного засоления оно ниже (рис. 1, в, з). Это может свидетельствовать о минорной роли пролина в солеустойчивости линии. Очевидно, в клетках задействованы другие протекторные соединения, в частности биогенные амины. Ранее было установлено, что ионы кадмия могут стимулировать синтез полиаминов: путресцина, спермина, спермидина [15]. Эти соединения существенно повышают солеустойчивость растений [19, 20]. С другой стороны, они же могут ингибировать синтез пролина [20]. В связи с этим предполагается наличие различных способов процесса адаптации Cd-устойчивых линий табака к засолению, что может быть отражением эпигенетических изменений.

Селективная среда с маннитом (рис. 1, д). Селективную среду, содержащую маннит, используют для моделирования водного стресса *in vitro*. Cd-устойчивые клеточные линии табака стабильно росли на селективной среде, содержащей летальную для контроля концентрацию соединения, однако Δm в этих условиях был наименьшим. Снижение биомассы, отмечавшееся и ранее, характерно для высокоустойчивых клеточных линий [11, 17]. Такие клетки отличаются измененной морфологией: вместо цилиндрической клетка приобретает сферическую форму, вследствие чего снижается объем клетки. Такая обратимая адаптивная реакция способствует поддержанию осмотического баланса при стрессе [17]. Аналогичный феномен роста наблюдали у устойчивого к 20,0%-му ПЭГ-10 000 средиземноморского галофита *Atriplex halimus* L. в присутствии 100 мкМ CdCl_2 [21]. В то же время уровень свободного пролина в клетках в этом варианте опыта был наивысшим (рис. 1, д). Очевидно, в этом случае пролин выступает

как водоудерживающая молекула [18]. Поэтому вполне объяснимо, что на 14-й день отмечали максимальное значение показателя: для делящихся клеток особенно необходимо поддержание их водного баланса. По абсолютной величине содержание свободного пролина в клетках тестированных линий существенно различалось, однако сходная динамика его изменений в пределах пассажа может свидетельствовать о реализации одних механизмов устойчивости.

В последнее время изучению роли пролина в растениях придается особое значение [20–22]. Собственная метаболическая система этой аминокислоты отличается специфическими особенностями, позволяющими рассматривать пролин как «стрессовый субстрат», в частности: 1) участием пролина при передаче стрессовых сигналов; 2) значительным доступным пулом свободного пролина; 3) реализацией специфических стрессовых функций в процессе метаболизма пролина [23]. В ряде случаев пролин рассматривается как облигатный источник углерода для цикла трикарбоновых кислот [24]. В нашем эксперименте Cd-устойчивые линии росли на всех селективных средах (рис. 2). При этом содержание свободного пролина, его аккумуляция/расходование соответствовало функциональному состоянию клеток: делению/растяжению.

Методом клеточной селекции неоднократно отбирали линии с комплексной устойчивостью к различным осмотическим стрессам. Однако летальные дозы ионов тяжелых металлов для этой цели использовали в единичных случаях [13]. Преимущество настоящего метода состоит в том, что в результате создаются предпосылки для гарантированного отбора вариантов, адаптирующихся к действию конкретного стрессора, т. е. отличающиеся физиологической устойчивостью, показателем которой может быть содержание свободного пролина в динамике.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что клеточные линии табака, отобранные на селективных средах, содержащих летальные дозы ионов кадмия, характеризуются устойчивостью к солевому стрессу; содержание свободного пролина может служить показателем адаптации к конкретному типу засоления: хлоридному, сульфатно-хлоридному; колебания этого показателя могут свидетельствовать об адаптации организма в условиях стресса.

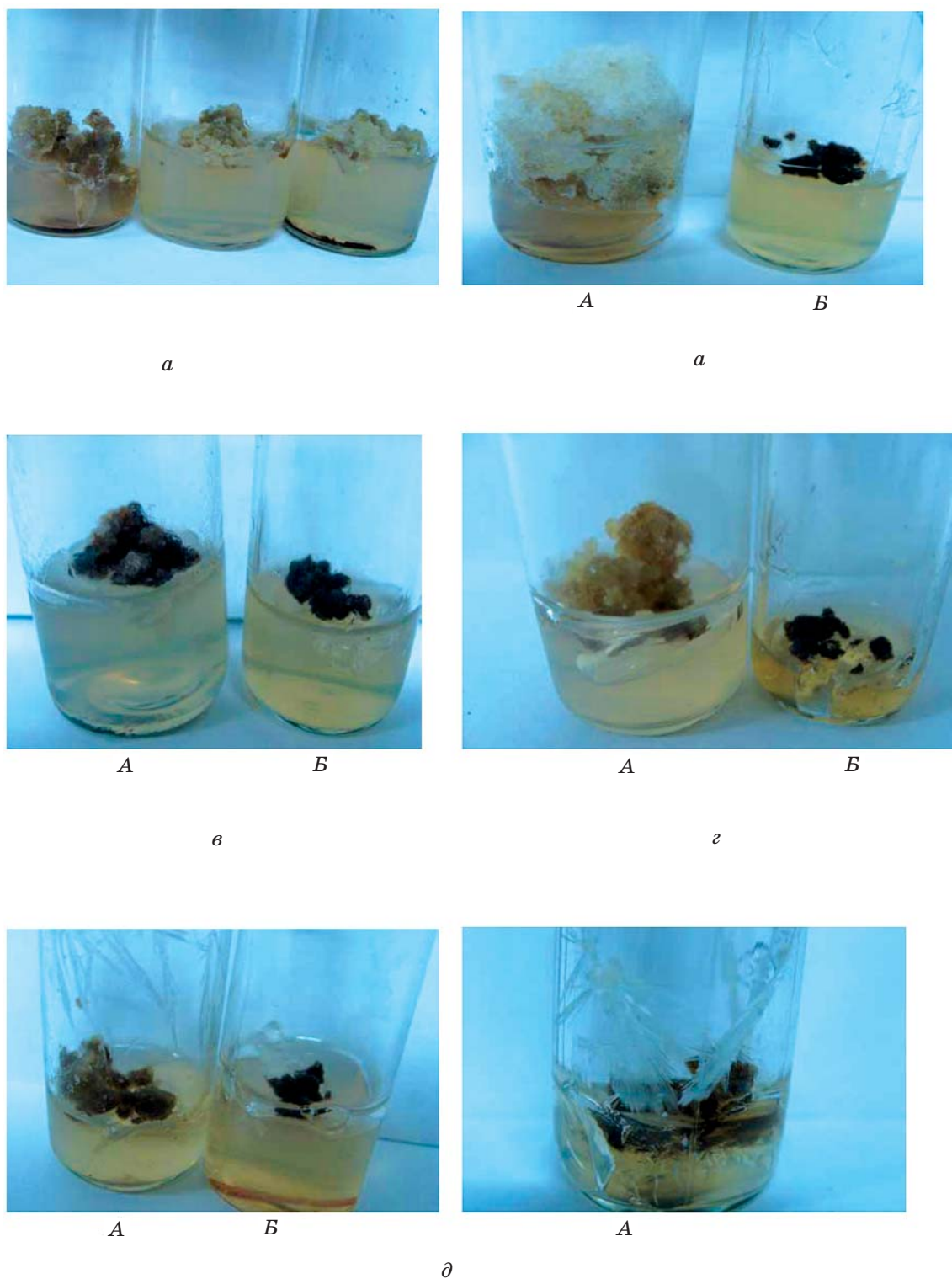


Рис. 2. Культивирование клеточных культур табака *in vitro*:

- А — устойчивая линия №1;
- Б — контроль, дикий тип;
- а — нормальные условия;
- б — селективная среда, содержащая 150 мкМ Cd^{2+} ;
- в — селективная среда, содержащая 2,0% солей морской воды;
- г — селективная среда, содержащая 2,0% Na_2SO_4 ;
- д — селективная среда, содержащая 0,8 М маннита

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhou J.-G., Zhu Y.-I., Liu G.-W et al. Физиологическая и биохимическая характеристики гибрида *Cucurbita moschata* при NaCl-стрессе взрослых растений // Xibei zhiwu xuebao — Acta Bot. Boreali Occid. Sin. — 2007. — V. 27, N 10. — P. 2052–2058.
2. Wang R., Chen G.-L., Song W. et al. Влияние NaCl-стресса на содержание катионов у растений двух разновидностей тыквы // Zhiwu shengli yu fenzish. Xuebao — J. Plant. Phys. Mol. Biol. — 2006. — V. 32, N 1. — P. 94–98.
3. Skopelitis D. S., Paranychiakis N. V., Paschalidis K. A. et al. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine // Plant Cell. — 2006. — V. 18, N 10. — P. 2767–2781.
4. Sumithra K., Jutur P. P., Dalton C. B., Reddi A. R. Salinity induced changes in two cultivars of *Vigna radiata*: Responses of antioxidative and proline metabolism // Plant Growth Reg. — 2006. — V. 50, N 1. — P. 11–22.
5. Zhang M.-S., Tan F., Zhang Q.-T., Yang Y.-H. Physiological indices and selection of methods on rapid identification for sweet potato drought resistance // Agric. Sci. China. — 2005. — V. 4, N 1. — P. 826–832.
6. Холодова В. П., Волков К. С., Кузнецов В. В. Адаптация к высоким концентрациям солей меди и цинка растений хрустальной травки и возможность их использования в целях фиторемедиации // Физиол. раст. — 2005. — Т. 52, № 6. — С. 848–858.
7. Tandon P. K., Srivastava M. Effect of cadmium and nickel on metabolism during early stages of growth in gram (*Cicer arietinum* L.) seeds // Ind. J. Agr. Biochem. — 2004. — V. 17, N 1. — P. 31–34.
8. Qin G.-Q., Yan C. L., Wei L. L. Влияние кадмиевого стресса на содержание таннина в проростках *Vandelia candel* // Shengtai xuebao — Acta Ecol. Sin. — 2006. — V. 26, N 10. — P. 3366–3371.
9. Sergeeva L. E., Poretskaya E. I. Cell selection: from cells heavy metal resistance to plant resistance to osmotic stresses «Plant Abiotic Stress tolerance» Int. Conf. February, 8–11 2009, Vienna, Austria, Proc. Doc., Vienna: 2009. — P. 161.
10. Патент на корисну модель 27918 Україна А01Н/04. Спосіб одержання стійких до осмотичного стресу клітинних ліній рослин методами клітинної селекції / Л. Є. Сергеева, С. І. Михальська, О. М. Тищенко. — Заявл. 25.04.2007; опубл. 26.11.2007, бюл. №19.
11. Сергеева Л. Е. Изменения культуры клеток под действием стресса. — К.: Логос, 2001. — 100 с.
12. Андрющенко В. К., Саянова В. В., Жученко А. А. и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм *Lycopersicon Tourn* // Изв. АН МССР. — 1981. — № 4. — С. 55–60.
13. Сергеева Л. Е., Михальская С. И., Порецкая Е. И. Роль свободного пролина в поддержании солеустойчивости клеточных линий табака и сои, отобранных на селективных средах с ионами бария // Физ. биохим. культ. раст. — 2008. — Т. 40, № 6. — С. 532–535.
14. Pavlikova D., Pavlik K. M., Staszko L. et al. The effect of potentially toxic elements and sewage sludge on the activity of regulatory enzyme glutamate kinase // Plant Soil Envir. — 2007. — V. 53, N 5. — P. 201–206.
15. Мельничук Ю. П. Влияние ионов кадмия на клеточное деление и рост растений. — К.: Наук. думка, 1990. — 148 с.
16. Shekhawat G. S., Verma K., Jana S. et al. In vitro biochemical evaluation of cadmium tolerance mechanism in callus and seedlings of *Brassica juncea* // Protoplasma. — 2010. — V. 239. — P. 31–38.
17. Niu X., Bressan R. A., Pardo J. M. Ion homeostasis in NaCl stressed environments // Plant. Physiol. — 1995. — V. 109, N 3. — P. 735–742.
18. Кузнецов В. В., Шевякова Н. И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиол. раст. — 1999. — Т. 46, № 2. — С. 305–320.
19. Chen X.-Q., Yu B.-J., Liu Y.-L. Взаимосвязь выносливости к хлоридам и накопления полиаминов у *Glycine max*, *Glycine soja* и их гибридных проростков // Zhiwu shengli yu fenzish. — J. Plant Phys. Mol. Biol. — 2007. — V. 33, N 1. — P. 46–52.
20. Sergiev I., Alexieva V., Yanov S., Karanov E. Effect of atrazine and spermine on free proline content and some antioxidants in pea (*Pisum sativum* L.) plants // Докл. Българ. АН. — 2000. — V. 53, N 1. — P. 63–66.
21. Lefevre I., Marshal G., Ghanem M. E. et al. Cadmium has contrasting on polyethylene glycol — sensitive and resistant cell lines in the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus* L. // J. Plant Physiol. — 2010. — V. 167, N 5. — P. 365–374.
22. Phang J. M., Pandhare J., Liu J. The metabolism of proline as microenvironmental stress structure // J. Nutrition Suppl. — 2008. — P. 166–172.
23. Kavi Kishor P. B., Sangam S., Amrutha R. N. et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance // Cur. Sci. — 2005. — V. 88, N 3. — P. 424–428.
24. Errabii T., Gandonou C. B., Essalmani H et al. Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought — induced osmotic stress and its subsequent relief // Afr. J. Biotechnol. — 2006. — V. 5, N 6. — P. 1488–1493.

**ВМІСТ ВІЛЬНОГО ПРОЛІНУ
ЯК ПОКАЗНИК ЖИТТЄДІЯЛЬНОСТІ
КЛІТИННОЇ КУЛЬТУРИ
Nicotiana tabacum L. ПІД ЧАС СТРЕСУ**

*Л. Є. Сергеева
Л. І. Броннікова
О. М. Тищенко*

Інститут фізіології рослин і генетики НАН
України, Київ

E-mail: oltykjo@gmail.com

Проблема стресостійкості рослин — одна з найбільш фундаментальних і є предметом досліджень на всіх ієрархічних рівнях. На цей час вона стала ще актуальнішою через збіднення дикої і культивованої флори, спричиненого порушеннями (часто необоротними) навколишнього середовища і кліматичних умов.

Отримано Cd-резистентні клітинні лінії тютюну (*Nicotiana tabacum* L.), яким притаманна комплексна стійкість до різних типів засолення та водного дефіциту. З них виділено варіанти (С. № 1 та С. № 6), що ростуть на середовищах з дозою іонів кадмію, яка втричі перевищує летальну. Клітинні лінії підтримували ріст в умовах дії летальних доз іонів кадмію, солей морської води, сульфату натрію, маніту. При цьому відносний приріст біомаси калусу обох ліній був найвищим на середовищі з іонами Cd²⁺ і перевищував цей показник за нормальних умов. Вивчали вміст вільного проліну в клітинах в період їх активного розвитку. Рівень вільного проліну в клітинній лінії — С. № 1 під час вирощування на селективних середовищах перевищував контрольні показники. У лінії С. № 6 у разі культивування на середовищі з додаванням Na₂SO₄ рівень проліну був нижчий за контрольні дані. Максимальний вміст проліну в клітинах обох ліній зафіксовано на середовищі з манітом. Коливання рівня проліну можуть бути показником життєздатності організму за стресових умов. Висловлюється припущення про різні способи процесу адаптації Cd-стійких ліній тютюну до засолення, що може бути зумовлено епігенетичними змінами.

Ключові слова: *N. tabacum* L., клітинні лінії, іони кадмію, осмотичний стрес, стійкість.

**THE FREE PROLINE CONTENT
AS THE VIABILITY INDEX
OF *Nicotiana tabacum* L. CELL CULTURE
UNDER STRESS CONDITIONS**

*L. E. Sergeeva
L. I. Bronnikova
E. N. Tishchenko*

Institute of Plant Physiology and Genetics
of the National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

E-mail: oltykjo@gmail.com

Problem of plant resistance to stress is one of the most fundamental and is a scope of researches on all hierarchical levels. Currently, it has become more urgent due to the depletion of wild and cultivated flora caused by violations (often irreversible) of ambient and environmental conditions.

Cd-resistant cell lines of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) S. No. 1, and S. No. 6 were affected by cadmium ions, sea water salts, sodium sulfate and mannitol in lethal doses. These lines went on growing under pressure of any stress substance. Relative mass growth of calli was the greatest during cultivation on selective media with the addition of Cd²⁺-ions and exceeded this parameter measured at normal conditions. Free proline contents was investigated in periods of cell active development. During cultivation on all the selective media, free proline levels of the cell lines S. No. 1 exceeded benchmarks. Proline level was smaller than test data when S. No. 6 lines were cultivated on medium containing Na₂SO₄. Peaks of the free proline contents were in both cell lines during their development on mannitol-containing medium. Free proline content fluctuation could be an indicator of an organism vital factor under stress conditions. The concept about different adaptation of Cd-resistant lines of tobacco to salinity is suggested.

Key words: *N. tabacum* L., cell lines, cadmium ions, osmotic stress, resistance.