

УДК 581.143.6

СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНОГО ПРОЛИНА В ТКАНЯХ ПОДСОЛНЕЧНИКА ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА *in vitro*

Л. Е. Сергеева
А. Г. Комисаренко
Л. И. Бронникова
С. И. Михальская
Е. Н. Тищенко

Институт физиологии растений и генетики
НАН Украины, Киев

E-mail: oltyko@gmail.com

Получено 23.03.2012

Широкое распространение методов биотехнологии растений в значительной степени сдерживается низкой частотой регенерации тканей *in vitro*. До настоящего времени проблемными остаются вопросы, связанные с поиском эксплантатов с активной и стабильной индукцией побегообразования. Известно, что динамические изменения содержания свободного пролина могут быть связаны с процессами роста и развития *in vivo* и *in vitro*. *In vitro* проращивали зрелые семечки подсолнечника (*H. annuus* L.) *in vitro* и измеряли содержание свободного пролина в соматических тканях, различающихся по регенерационной способности. Исследовали следующие типы эксплантатов: семядоли 1- и 4-суточных проростков; первичный эксплантат, сформированный для индукции побегообразования (сегмент 4-суточного проростка); первичные эксплантаты с началом и отсутствием органогенеза после 6 сут выращивания на среде для регенерации; регенерант и соответствующий ему эксплантат в момент отделения побега; эксплантат через 10 сут после отделения растения. Максимальный уровень пролина был отмечен только в эксплантатах, где происходил морфогенез. Высказывается предположение о возможном участии пролина в процессах органогенеза подсолнечника *in vitro*. Показатель содержания свободного пролина может быть использован для первичного скрининга тканей подсолнечника, потенциально способных к органогенезу *in vitro*.

Ключевые слова: *H. annuus* L., культура *in vitro*, регенерация, побегообразование, пролин.

Биотехнология — альтернатива традиционным методам получения улучшенных форм растений — становится более детализированной и конкретной. В то же время теоретические аспекты многих фундаментальных процессов остаются вне изучаемого круга вопросов, хотя именно они требуют повышенного внимания. К таким проблемам относятся закономерности дедифференциации/дифференциации клеток.

Получение биотехнологических растений зависит главным образом от реализации процедуры регенерации жизнеспособных растений. Для некоторых генотипов эта процедура успешно разработана, для других она весьма проблематична. В ряде случаев наблюдается полное отсутствие регенерации [1].

К числу культур с низкой эффективностью регенерации относится подсолнечник (*Helianthus annuus* L., ssp. *annuus*). Регенерация у подсолнечника может осуществ-

ляться прямым либо непрямым органогенезом или соматическим эмбриогенезом [2–4].

У подсолнечника, аналогично другим культурам, проявление (повышение) морфогенетической активности стимулируется с помощью различных воздействий: изменением состава культуральной среды, физическими нагрузками [5, 6]. На регенерацию побегов подсолнечника оказывают влияние регуляторы роста, особенно цитокинины [4].

Параллельно с варьированием внешних факторов постоянно ведется поиск генотипов с повышенным уровнем тотипотентности [7]. В то же время даже у генотипов с высоким морфогенетическим потенциалом не все органы и ткани способны к индукции побегообразования, это относится и к стадии онтогенеза растений. В связи с этим осуществляют скрининг тканей уже отдельного растения. Давно установлено, что система *in vitro* оказывает многофакторное влияние на

культивируемые ткани, коренным образом изменяя их анатомическое строение, метаболизм, гормональный статус [8]. Однако при отборе тканей, потенциально способных к регенерации, как правило, ограничиваются анатомическим и цитологическим контролем [9].

Поскольку морфогенетический потенциал клетки является динамической характеристикой, логично предположить, что его изменения сопряжены с эндогенными изменениями метаболизма. Очевидно, наибольший эффект будет отражаться в наиболее вариабельных участках синтеза.

Среди эндогенных аминокислот, постоянно присутствующих в растении, особый интерес представляет пролин (*Pro*). *Pro* в растениях синтезируется двумя путями: из глутамата либо из орнитина [10–13]. В первом случае процесс идет с участием энзима Δ^1 -пирролин-5-карбоксилатсинтетазы (P5CS) (К.Ф.2.7.2.11.1.2.1.41). Образуется глутамин- γ -семиальдегид с последующей спонтанной циклизацией в пирролин-5-карбоксилат и восстановлением в *Pro*. Во втором случае реакция катализируется орнитин-аминотрансферазой (ОАТ) (К.Ф.2.6.1.13). Промежуточным продуктом также является глутамин- γ -семиальдегид. При этом путь синтеза из орнитина предпочтительнее при высоких условиях доступного азота [10, 11]. Хотя оба энзима катализируют синтез одной аминокислоты, их действие отличается рядом особенностей. Активность P5CS выше и ингибируется *Pro* [12, 13]. Активность ОАТ ниже и регулируется абсцизовой кислотой (АБК) [13]. Катаболизм пролина осуществляется пролиндегидрогеназой (PDH) (К.Ф.1.5.99.8).

Изучение свойств пролина, закономерностей его накопления/расходования проводится главным образом при исследовании стресс-устойчивости [11–13]. Однако, принимая во внимание уникальное свойство *Pro* — саморегуляция активности энзимов своего синтеза/деградации, в последнее время эту аминокислоту рассматривают как регуляторную/сигнальную молекулу, действующую не только в условиях адаптации растений к стрессу, но и в процессе их онтогенеза [10–12]. Пролин может оказывать влияние на процессы пролиферации и гибели клеток [12]. Что касается культивирования *in vitro*, то использование экзогенного пролина может повышать частоту регенерации побегов ряда культур. Имеются данные о повышении содержания эндогенного *Pro* в ходе соматического эмбриогенеза [14].

По нашему предположению, динамические изменения в содержании свободного пролина могут быть связаны с процессами органогенеза растений *in vitro*. В данной работе проводили сравнительное изучение содержания свободного пролина в эксплантатах, различающихся по способности к индукции побегообразования, и регенерантах на ранних этапах их роста и развития.

Материалы и методы

Объектом исследования был подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) сорта Прометей (Институт масличных культур НАН Украины, пос. Солнечный, Запорожская обл.). Зрелые семянки очищали, стерилизовали последовательно 96%-м этанолом и 20%-м раствором отбеливателя «Белизна» 4 мин и 40 мин соответственно и трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой. Стерильные семянки проращивали на агаризованной безгормональной среде Мурасиге–Скуга [15]. Индукцию побегообразования осуществляли на среде Мурасиге–Скуга, содержащей 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК), 1,0 мг/л бензиламинопурина (БАП), 20,0 мг/л тиосульфата натрия. Для определения свободного пролина отбирали ткани разного срока культивирования, различающиеся по способности к реализации морфогенетического потенциала (рис. 1, 1–8).

Растительный материал культивировали при температуре 25–26 °С, 16-часовом фотопериоде и освещенности 3–4 клк. Пробы для анализа отбирали и фиксировали в одно и то же время суток.

Содержание свободного пролина определяли по методу Чинарда с модификациями [16]. Суть метода заключается в образовании окрашенного продукта взаимодействия *Pro* с нингидриновым реактивом. Навеску растительной ткани растирали в 10 мл 3,0%-го раствора сульфосалициловой кислоты для осаждения протеинов. Гомогенат фильтровали. К 2,0 мл фильтрата добавляли 2,0 мл нингидринового реактива, приготовленного без нагревания (1,25 г нингидрина, 30 мг ледяной уксусной кислоты, 20 мл 6 М раствора H_3PO_4), и 2,0 мл ледяной уксусной кислоты. Реакционную смесь инкубировали на водяной бане при 100 °С в течение 1 ч, быстро охлаждали, переносили в делительную воронку, содержащую 4,0 мл толуола, встряхивали. Окрашенный в малиновый цвет хромофор (верхний слой) отделяли и колориметрировали против толуола при

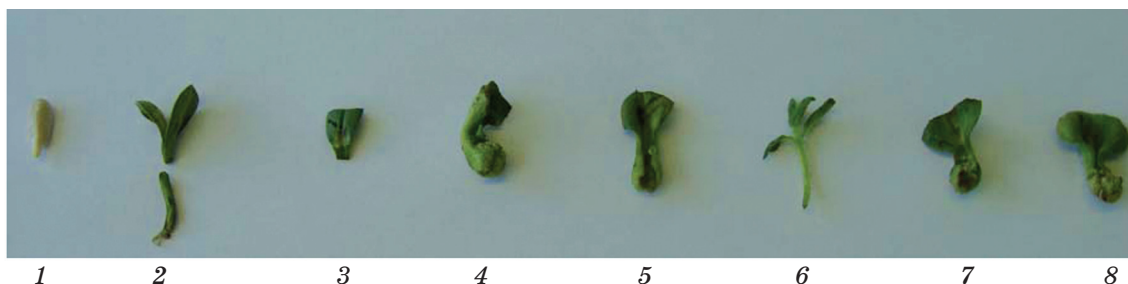


Рис. 1. Ткани подсолнечника, в которых измеряли содержание свободного пролина:

- 1 — семядоли семянки после 24-часового культивирования на среде для проращивания. Перед проведением анализа семяночки разделяли на 2 семядоли, которые анализировали отдельно;
- 2 — семядоли проростков, культивированных на среде для проращивания в течение 4 сут. Перед проведением анализа отделяли корешок и апикальную почку. Каждую семяночку анализировали отдельно;
- 3 — первичный эксплантат, потенциально способный к индукции побегообразования: ~2/3 семядоли с расщепленной верхней частью гипокотыля, размером 1-2 мм, сформированный из 4-суточных проростков;
- 4 — первичный эксплантат на начальной стадии процесса побегообразования; 6 сут на среде для регенерации (общий период культивирования — 10 сут);
- 5 — первичный эксплантат с отсутствием регенерации; 6 сут на среде для регенерации;
- 6 — регенерант после отделения от эксплантата; культивирование в течение 16 сут на среде для регенерации;
- 7 — эксплантат после отчленения регенеранта; 16 сут на среде для регенерации;
- 8 — эксплантат через 10 сут после отчленения регенеранта; 26 сут на среде для регенерации

длине волны $\lambda = 520$ нм. Калибровочную кривую строили по кристаллическому пролину.

Уровень свободного *Pro* измеряли в каждом отдельном эксплантате и соответствующем регенеранте (если морфогенез осуществлялся). Приведены средние значения и их стандартные ошибки по двум сериям опытов, в каждом из которых пробы отбирали не менее чем в трехкратной аналитической повторяемости.

Результаты и обсуждение

Культурный подсолнечник считается проблемно регенерирующим растением. Это существенно ограничивает его генетическое улучшение с помощью современных биотехнологий. Ранее нам удалось значительно повысить частоту побегообразования у слабо регенерирующих генотипов подсолнечника, а также индуцировать этот процесс у нерегенерирующих. Положительный эффект был достигнут за счет выбора первичного эксплантата и модификаций состава культуральной среды для регенерации [5]. На рис. 2 показана регенерация побегов подсолнечника сорта Прометей путем прямого органогебеза (частота регенерации — 50+80%).

Адекватные быстрые ответные реакции со стороны растительных тканей на условия культивирования *in vitro* и их изменения проявляются прежде всего в наиболее чув-

ствительных областях. Таковыми являются области пролиферации, участки с дополнительным поранением, сегменты с активным метаболизмом и измененным гормональным статусом. Вследствие этого, как указывалось выше, ожидаемой характеристикой данных областей может быть повышенный уровень свободного пролина.

На диаграмме представлено содержание свободного *Pro* в различных образцах тканей подсолнечника, характеристика которых дана в разделе «Материалы и методы» (рис. 3).

Как видно из данных, представленных на рис. 3 (1-3), с увеличением продолжительности культивирования проростков происходило повышение содержания свободного пролина в семядолях и в эксплантате,



Рис. 2. Регенерация побегов подсолнечника сорта Прометей

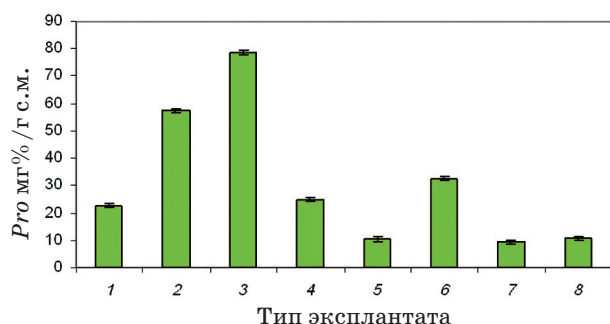


Рис. 3. Содержание свободного пролина в тканях подсолнечника, различающихся по способности к реализации морфогенетического потенциала

потенциально способном к индукции побегообразования. В то же время по анализируемому показателю между тканями этих типов эксплантатов наблюдалось достоверное различие. Наиболее высокий уровень пролина был характерен для сегмента проростка, содержащего часть семядоли с гипокотилем, что могло быть отражением существования градиента концентрации аминокислоты.

Ранее было установлено, что в семенах подсолнечника в состоянии покоя присутствуют восемь свободных аминокислот, в том числе *Pro* [17]. На 4–5-е сутки прорастания семян уровень *Pro* существенно возрастал, после чего поддерживался на достаточно высоком уровне. Авторы объясняют это общей активацией метаболизма в прорастающем семени. Изменения содержания *Pro* в зависимости от возраста отмечены и для других растений. Более того, в молодых растениях петунии *Pro* считается фактором, сдвигающим общий баланс аминокислот [18]. Анализ экспрессии гена *P5CS* арахиса показал, что потребность в содержании пролина существует и в клетках быстрорастущих каллусных культур [19]. Повышение уровня пролина коррелирует с важными народнохозяйственными показателями. Так, в растениях гречихи увеличение содержания пролина в 1,5–4 раза сочеталось с повышением урожайности этой культуры на 12% [20].

Далее при переносе потенциально способных к морфогенезу эксплантатов подсолнечника на среду для регенерации количество *Pro* в них почти 4-кратно снижалось. Уже на 6-е сут культивирования наблюдались существенные различия в содержании свободного пролина между тканями, из которых происходила индукция побегообразования, и где она отсутствовала (рис. 3, 4,

5, соответственно). В эксплантате, где осуществлялась регенерация побега, аккумуляровалось приблизительно в 2 раза большее количество *Pro*.

В сформированных 6-дневных побегах (рис. 3, 6) содержание пролина существенно превышало уровень аминокислоты, измеренный в эксплантатах, из которых инициировалась регенерация. Более того, в эксплантатах, из которых были вычленены побеги, уровень этой аминокислоты достоверно не отличался от показателей нерегенерирующих тканей. В дальнейшем в таких культивируемых эксплантатах количество пролина оставалось стабильно низким. Сравнительные исследования содержания свободного пролина в культивируемых тканях подсолнечника выявили два показательных момента. Во-первых, происходило активное снижение содержания аминокислоты в эксплантатах при культивировании *in vitro* на регенерационной среде. Во-вторых, наблюдалась сопряженность индукции побегообразования и уровня измеряемого параметра, что свидетельствует в пользу возможного участия пролина в общей системе регуляции процесса органогенеза подсолнечника *in vitro*.

Феномен динамического варьирования содержания свободного пролина общеизвестен [21, 22]. Причины этого различны. В нашем конкретном случае снижение содержания пролина может быть следствием ряда причин. С увеличением возраста культуры скорость процессов синтеза замедляется (в системе *in vitro* это явление усиливается вследствие истощения ресурсов), при этом быстрее стареют неморфогенные ткани. На это указывают и другие авторы [8, 23].

Не исключается также и действие среды культивирования, в частности регуляторов роста НУЖ и БАП, которые присутствовали в регенерационной среде. Как правило, для стимуляции побегообразования и повышения частоты регенерации определяют оптимальные для конкретной культуры сочетания ауксинов/цитокининов. При этом всегда следует иметь в виду взаимодействие экзогенных гормонов с эндогенными.

Среди эндогенных гормонов особое место занимает АБК. В данном случае важна ее роль как стимулятора морфогенеза. Отмечено одновременное накопление эндогенной АБК и экзогенных фитогормонов в морфогенных тканях [24]. С другой стороны, имеются свидетельства о регуляторной роли АБК в биосинтезе пролина. Так, экс-

прессия генов арабидопсиса *AtP5CS1* и *AtP5CS2* сильно и умеренно (соответственно) АБК-зависима [25]. Таким образом комбинация регуляторов роста может поддерживать морфогенетический потенциал клеток и высокую концентрацию пролина. Эти два события могут быть взаимозависимыми, но протекать параллельно.

Полученные данные показали, что при культивировании *H. annuus* L. *in vitro* максимальный уровень накопления свободного

Pro наблюдался только в эксплантатах, где происходила индукция побегообразования. Это свидетельствует о том, что свободный пролин может быть одним из факторов, принимающих участие в процессах роста и дифференцировки клеток подсолнечника *in vitro*. Более того, показатель содержания свободного пролина может быть использован для первичного скрининга эксплантатов подсолнечника, потенциально способных к реализации морфогенетического потенциала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сергеева Л. Е. Изменения культуры клеток под действием стресса. — К.: Логос, 2001. — 100 с.
2. Тищенко Е. Н., Михальская С. И. Агробактериальная трансформация подсолнечника // Физиол. биохим. культ. растений. — 2006. — Т. 38, № 3. — С. 187–196.
3. Нескородов Я. В., Мишуткина Я. В., Гапоненко А. К., Скрябин К. Г. Метод регенерации *in vitro* побегов подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) из асептических семян, как эксплантатов для генетической трансформации // Биотехнология. — 2007. — № 6. — С. 27–33.
4. Fiore M. C., Trobace T., Sunsery F. High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis // Plant Cell Rept. — 1997. — V. 16. — P. 295–298.
5. Патент на корисну модель № 40142 від 25. 03. 2009. Спосіб підвищення морфогенетичного потенціалу *in vitro* генотипів соняшника з низькою регенераційною здатністю / Михальська С. І., Сергеева Л. Є., Комисаренко А. Г., Малина А. Е., Тищенко О. М.
6. Комисаренко А. Г., Михальская С. И., Малина А. Э., Тищенко Е. Н. Влияние тиосульфата натрия и ультразвука на индукцию регенерации *in vitro* инбредных линий подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2009. — Т. 7, № 1. — С. 31–37.
7. Samaj I., Auxtova O., Boba K. M. Different regeneration potential of various sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes in meristem culture // Biol. Plant. — 1994. — V. 36. — P. 309–311.
8. Maliga P. Isolation and characterization of mutants in plant cell culture // Ann. Rev. Plant Physiol. — 1984. — V. 35. — P. 519–542.
9. Bronner R., Jeannin G., Nahne G. Early cellular events during organogenesis and somatic embryogenesis induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Can. J. Botany. — 1994. — 72, N 2. — P. 239–248.
10. Lehmann S., Funck D., Szabados L., Rentsch D. Proline metabolism and transport development // Amino Acids. — 2010. — V. 4. — P. 949–962.
11. 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. 424–438.
12. Szabados L. O., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sci. — 2009. — V. 15, N 2. — P. 89–97.
13. Wu L., Fan L., Guo L. et al. Over-expression of an *Arabidopsis* δ -OAT gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice // Chin. Sci. Bull. — 2003. — V. 48, N 23. — P. 2594–2600.
14. Rastagi S., Rizvi S. M. H., Singh R. P., Dwivedi A. N. In vitro regeneration of *Zea mays leucocephala* by organogenesis and somatic embryogenesis // Biol. Plant. — 2008. — V. 52, N 4. — P. 743–748.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. — 1962. — V. 15. — P. 473–497.
16. 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.
17. Подсолнечник /Под ред. В. С. Пустовойта. — М.: Колос, 1975. — 591 с.
18. Yamada M., Morishita H., Urano K. et al. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress // J. Exp. Bot. — 2005. — V. 56, N 417. — P. 1975–1981.
19. Szekely G., Abraham E., Cseplo A. et al. Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis // Plant J. — 2008. — V. 53. — P. 11–28.
20. Шиленков А. В., Мазей Н. Г., Нефедьева Е. Э., Хрянин В. К. Содержание свободного пролина в прорастающих семенах гречихи и их качество при действии импульсного давления и пониженных температур // Сельскхоз. биология. Сер. Биол. раст. — 2008. — № 5. — С. 70–77.
21. Сергеева Л. Е., Бронникова Л. И., Тищенко Е. Н. Содержание свободного пролина как показа-

- тель жизнедеятельности клеточной культуры *Nicotiana tabacum* L. при стрессе // Биотехнология. — 2011. — Т. 4, № 4. — С. 87–94.
22. Сун С. К., Леу Е. Б., Тянь К. Р. Метаболизм пролина и перекрестная устойчивость к засолению и тепловому стрессу у прорастающих семян пшеницы // Физиол. раст. — 2005. — Т. 52, № 6. — С. 897–904.
23. Maggio A., Miyazaki I. S., Veronese P. et al. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction // Plant J. — 2002. — V. 31, N 6. — P. 699–712.
24. Zaitzev D. Y., Vysotskaya L. B. Immunolocalization of endogenous phytohormones in androclinic calli of spring wheat // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология, IX Междунар. конф., Звенигород, 8–12 сент. 2008. — С. 127.
25. Strizhov N., Abraham E., Okresz L. et al. Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABII and AXR2 in Arabidopsis // Plant J. — 1997. — V. 12. — P. 557–569.

ВМІСТ ВІЛЬНОГО ПРОЛІНУ В ТКАНИНАХ СОНЯШНИКУ ПРИ РЕАЛІЗАЦІЇ МОРФОГЕНЕТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ *in vitro*

Л. Є. Сергєєва, А. Г. Комісаренко,
Л. І. Броннікова, С. І. Михальська,
О. М. Тищенко

Інститут фізіології рослин і генетики
НАН України, Київ

E-mail: oltyko@gmail.com

Широке розповсюдження методів біотехнології рослин значною мірою стримується низькою частотою регенерації тканин *in vitro*. Проблемними й дотепер лишаються питання, пов'язані з пошуком експлантатів з активною та стабільною індукцією пагоноутворення. Відомо, що динамічні зміни вмісту вільного проліну можуть бути пов'язані з процесами росту та розвитку *in vivo* й *in vitro*. *In vitro* пророщували зрілі сім'янки соняшника (*H. annuus* L.) і вимірювали вміст вільного проліну в соматичних тканинах, які різняться за регенераційною здатністю. Досліджували такі типи експлантатів: сім'ядолі 1- та 4-добових проростків; первинний експлантат, підготовлений для індукції пагоноутворення (сегмент 4-добового проростка); первинні експлантати з початком та за відсутності морфогенезу після 6 діб вирощування на середовищі для регенерації; регенерант та відповідний йому експлантат у момент відділення проростка; експлантат через 10 діб після відокремлення рослини. Максимальний рівень проліну було відзначено лише в експлантатах, де відбувався морфогенез. Висловлюється припущення про ймовірну участь проліну в процесах органогенезу в соняшнику *in vitro*. Показник вмісту вільного проліну може бути використаний для первинного скринінгу тканин соняшнику, потенційно здатних до органогенезу *in vitro*.

Ключові слова: *H. annuus* L., культура *in vitro*, регенерація, пагоноутворення, пролін.

THE FREE PROLINE CONTENTS OF THE SUNFLOWER TISSUES THROUGHOUT THE MORPHOGENESIS *in vitro*

L. E. Sergeeva, A. G. Komisarenko,
L. I. Bronnikova, S. I. Mikhalska,
O. M. Tishchenko

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

E-mail: oltyko@gmail.com

Low frequency of *in vitro* plant regeneration limits significantly wide expansion of biotechnology methods. The screening of explants with stable and high level of the morphogenesis is an open problem. It is known, that free proline fluctuations correlate with processes of plant growth and development *in vivo* and *in vitro*. Sunflower mature seeds were germinated *in vitro*. The contents of free proline at somatic tissues with different regenerational abilities were measured. Following explants were estimated: cotyledons from 1- or 4-days cultivating shoots; primary explants prepared for the regeneration procedure (segments of 4-day cultivating shoots); primary explants with and without initial morphogenesis, 6 days on the regeneration medium; shoots and certain explants at the moment of their mutual separation; explants, 10 days after shoots release. The top levels of free proline were observed in tissues with fulfilled organogenesis. The hypothesis about proline involvement to the process of sunflower morphogenesis *in vitro* is discussed. During primary screenings of explants the level of free proline can be appropriate index of *in vitro* sunflower organogenesis.

Key words: *H. annuus* L., *in vitro* culture, regeneration, organogenesis, proline.