

АДАПТАЦИЯ МИКРОКЛОНОВ ВЕЙГЕЛЫ ЦВЕТУЩЕЙ «ВАРИЕГАТА» К УСЛОВИЯМ СОЛЕВОГО И МЕДНОГО СТРЕССОВ

О.А. ЗЕМЛЯНУХИНА, В.Н. КАЛАЕВ, В.С. ВОРОНИНА

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж (oz54@mail.ru)

ADAPTATION OF *WEIGELA FLORIDA* «VARIEGATA» MICROCLONES TO SALT- AND COOPER INDUCED STRESS

O.A. ZEMLIANUKHINA, V.N. KALAEV, V.S. VORONINA

FSBEI HPE «Voronezh State University», Voronezh (oz54@mail.ru)

Резюме. В результате длительной трёхступенчатой адаптации получены пробирочные растения вейгелы, устойчивые к летальным концентрациям меди и морской соли. Впервые показано, что по мере адаптации количество свободного пролина снижается ниже контрольного уровня, приближаясь к таковому у растений в условиях *in vivo*. Маркерами адаптации являются изоцитратлиаза и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа.

Ключевые слова: вейгела, микроклоны, адаптация, пролин, устойчивость

Abstract. As a result of long time three step adaptation process microclones resistant to lethal copper (CuCl_2) and sea salt concentrations of *Weigela florida* «Variegata» were obtained. It has been shown for the first time that free proline content was decreased below control plants becoming similar *in vivo* ones. Isocitrate lyase and glucose-6-phosphate dehydrogenase are the adaptation markers.

Key words: weigela, microclones, adaptation, proline, resistance

В настоящее время процесс деградации почвы значительно усилился в результате как естественных причин, так и за счёт хозяйственной деятельности человека. При этом происходит как засоление земель, так и их загрязнение тяжёлыми металлами. К последним относятся медь, свинец, алюминий и другие металлы. Подобные загрязнения наблюдаются как вблизи магистральных трасс, так и рядом с функционирующими фабриками и заводами. Нарушение баланса экосистем возникает и за счёт добычи полезных ископаемых, что характерно для многих регионов России и других стран. При этом возникают биологически стерильные отвалы, которые подлежат восстановлению за счет рекультивации почв биологическими способами, в число которых входит заселение растениями, способными расти и нормально развиваться в неблагоприятных условиях. В силу наличия больших площадей, требующих рекультивации, возникает необходимость получения

большого количества посадочного однородного материала растений, устойчивых, в частности, к засолению почвы и к высоким концентрациям тяжёлых металлов. Необходимые массовые количества устойчивых растений можно сформировать путём микроклонального размножения соответствующих видов на селективных средах, содержащих высокие концентрации стрессовых агентов с последующей высадкой полученного материала в мста, требующие рекультивации почвы.

В работе были использованы растения вейгелы цветущей «вариегата» (*Weigela florida* «Variegata» Bunge A.D.C.), являющейся вполне зимостойкой: от 4 зоны зимостойкости и выше. Вейгела цветущая является высокодекоративным среднерослым кустарником, отличительной чертой которого является жёлтая полоса по краю листовой пластинки. Возможно повторное осеннее цветение кустарника, кроме того, данный вид вейгелы неприхотлив, что подразумевает возможность его использования для рекультивирования и озеленения загрязнённых территорий.

Целью работы было получение микрорастений вейгелы цветущей, адаптированных к высоким концентрациям соли (натрий хлор) и ионам тяжёлых металлов (медь) в питательной селективной среде. В связи с этим были поставлены задачи выявления полулетальной и летальной концентраций стрессовых агентов, проведение длительной адаптации, нахождение маркеров устойчивости к неблагоприятным факторам.

Первичными эксплантатами для введения в культуру ткани служили ветки, нарезанные с кустов вейгелы приятной «вариегата», произрастающих на территории ботанического сада им. Б.М. Козо-Полянского Воронежского госуниверситета. Ветки нарезались на отрезки с 1–3 латеральными почками, поверхностно мыли мочалкой со стиральным порошком, промывали 30 минут в проточной воде и затем проводили стерилизацию. Процесс стерилизации состоял из замачивания на качалке растительного материала в растворе, содержащем 0,05% мертиолята (орто-этилртутьтисалицилат натрия), дополненным 3% хлорсодержащим бытовым средством «Белизна» в течение 20–30 мин. После этого растения отмывали трижды в стерильной дистиллированной воде, нарезали на отрезки с одной боковой почкой и заглубляли в агаризованную питательную среду ½ WPM [Lloyd, McCown, 1980]. Для получения устойчиво пролиферирующей культуры базовая питательная среда содержала 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) + 0,1 мг/л гиббереллина (ГАЗ). Растения росли на светокультуральных стеллажах с использованием светодиодных лент при освещённости 2500–3000 люкс и 16-часовом фотопериоде.

На первом этапе исследований выбирались полулетальные и летальные концентрации морской соли (основной компонент составлял NaCl – 98,8%) и ионов меди (CuCl₂), которые составили 130 и 260 mM для соли и 0,075 и 0,150 mM для ионов меди, соответственно.

Адаптация к стрессовым условиям состояла из трёх пассажей. Каждый пассаж включал помещение укоренённых растений на полулетальные концентрации на 10 суток, после чего растения восстанавливались на контрольных безгормональных средах в течение 30 суток. Затем те же самые растения снова помещали на селективные среды и т.д. Таким образом, адаптационный период длился 120 суток (3 пассажа по 40 дней).

Определение количества свободного пролина проводили по L.S. Bates с соавт. [Bates et al., 1973] после 10 суток в стрессовых условиях первого пассажа (130 mM хлорида натрия, 0,075 mM Cu²⁺), через месяц восстановления, после третьего пассажа, а также у маточных растений, растущих в условиях открытого грунта.

Определение количества растворимого белка проводили по методу Брэдфорда, в качестве стандарта используя бычий сывороточный альбумин (Sigma).

Определение активности ферментов проводили по А.А. Землянухину, Л.А. Землянухину [Землянухин, Землянухин, 1996]. Осуществляли определение удельных активностей следующих ферментов: пероксидаза (ПО; КФ 1.11.1.7), глюкозо-6-Ф-дегидрогеназа (гл.-6-Ф-ДГ; КФ 1.1.1.49), NADH-дегидрогеназа (NADH-ДГ; 1.6.99.1) изоцитратлиаза (ИЦЛ; КФ

4.1.3.1), изоцитратдегидрогеназа (ИДГ; КФ 1.1.1.42), малатдегидрогеназа (МДГ; КФ 1.1.1.37), малик энзим (МЭ; КФ 1.1.1.39). Ферментативные препараты получали путём растирания листьев со стеклянным песком в 0.1М трис-НС1 буфере, рН 7.5 и центрифугированием при 20000 g при 4°C в центрифуге CM50 ELM1 (Латвия). Измерения проводили на спектрофотометре UNICO 2800 (США).

Все определения проводили в 4–8 повторностях Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ «Stadia». Процедура группировки данных и их обработка изложены в работе А.П. Кулаичева [Кулаичев, 2006].

При подборе полулетальных концентраций стрессовых агентов было выявлено, что у растений на селективных средах через 10 суток стресса первого пассажа наблюдается некроз корней, которые затем заново отрастают в течение месяца восстановления. После второго и третьего пассажей корни остаются целыми даже в присутствии полулетальных стрессовых агентов. После трёхступенчатой адаптации на протяжении трёх пассажей (120 суток) растения, перенесённые на летальные концентрации агентов, отлично росли и развивались, при этом не наблюдалось изменения ни в росте корней, ни в цвете листовых пластинок.

Результаты эксперимента хорошо согласуются с измерением количества свободного пролина. Пролин является протекторной аминокислотой, с одной стороны, характеризующей степень нарушения клеточного метаболизма, с другой, – являющийся защитным агентом, способным агрегироваться, защищая молекулы ферментов, поддерживая осмотическое состояние клетки и др. [Кузнецов, Шевякова, 1999; Степенко и др., 2011; Сошникова и др., 2013]. Влияние различных стрессовых факторов и зависимость количества пролина от длительности эксперимента представлены в таблице 1.

Таблица 1

Зависимость содержания свободного пролина (мг%/г) от условий культивирования микроклонов вейгелы

Питательная среда	10 суток, первый пассаж	40 суток, первый пассаж	Третий пассаж	Маточные кусты (открытый грунт)
Ионы Cu^{2+}	22,3±1,2*	6,6±1,2*	6,1±2,8	1,3±0,9 а
Морская соль	26,2±4,9*	6,2±1,6*	6,2±2,6	
Контроль	11,2±1,9	10,9±2,7	11,1±2,6	

Примечания: * – различия с контролем достоверны ($P<0,05$); а – различия со всеми пассажами *in vitro* достоверны ($P<0,01$)

На количество пролина влияют несколько факторов. Первый – условия *in vitro*: сила влияния для образцов, помещённых на медный стресс, равна 23,4%, а для образцов солевого стресса – 12,9% (в обоих случаях влияние фактора достоверно ($P<0,001$)). На десятые сутки острой фазы (первый пассаж, некроз корней) содержание пролина резко возрастает по сравнению с контролем, более чем в 2 раза, но по мере восстановления растений на контрольных средах его количество падает ниже контрольных значений, сохраняясь на этом уровне до конца эксперимента. Результаты предполагают возможность к 40 суткам эксперимента выхода концентрации пролина на новый триггерный уровень, а стрессовые факторы (медь и морская соль) запускают механизм адаптации. В контрольных растениях на протяжении всего эксперимента наблюдается одинаковый конститутивный уровень пролина, возможно, связанный с условиями культуры ткани: 100% влажность, утеря нормального функционирования устьичного аппарата. Содержание пролина у растений, растущих в открытом грунте, практически равно нулю.

Для определения удельных активностей ферментов были взяты энзимы, участвующие в различных метаболических клеточных циклах. Результаты измерения активностей приведены в таблице 2.

Таблица 2

Удельная активность ферментов в контрольных и опытных растениях ветвей в первом и третьем пассажах

Фермент	Пассаж	Контроль	Соль	Медь
Пероксидаза, ФЕ/мг	1	0,65±0,13	0,94±0,13a	1,25±0,13аq *
	3	0,72±0,04	0,97±0,09a	0,63±0,17
Гл.-6-Ф-ДГ, ФЕ/мг × 10 ⁻³	1	14,56±2,46	5,72±1,06a	3,92±0,71 *a
	3	8,02±3,11	8,56±3,77	8,86±2,48
NADH-ДГ, ФЕ/мг × 10 ⁻³	1	17,83±2,01*	24,62±3,32a	18,39±3,63q
	3	33,64±5,56	27,38±3,97	20,01±5,14
Изоцитратлиаза, ФЕ/мг × 10 ⁻³	1	8,15±0,90*	9,09±1,74*	16,37±1,81 *aq
	3	44,25±8,64	40,87±7,54	44,28±11,43
МДГ, ФЕ/мг × 10 ⁻³	1	27,29±2,95*	24,18±2,46*	11,75±2,50 *aq
	3	335,10±39,47	237,10±22,04a	231,20±21,69a
Малик энзим, ФЕ/мг × 10 ⁻³	1	80,40±11,48*	81,09±8,44*	98,95±7,01*
	3	39,86±3,13	15,25±3,19a	11,36±2,61a

Примечания: * – различия с третьим пассажем достоверны (P<0,05); а – различия с контролем достоверны (P<0,05); q – различия с солью достоверны (P<0,05)

На основании факторного анализа установлено 4 основных фактора, отражающих 98,68% дисперсии системы фермент – тип эксперимента (рис. 1).

К первому фактору относится метаболическая локализация ферментов. Так, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа является ключевым ферментом пентозо-фосфатного цикла, NADH-малатдегидрогеназа и малик энзим участвуют в утилизации малата в цикле трикарбоновых кислот, функционирующего в митохондриях. Энзим NADH-дегидрогеназа прикреплен к внешней стороне внутренней митохондриальной мембраны, а изоцитратлиаза в данном случае является внеглукисомальным ферментом, локализованным в цитоплазме [Eprintsev et al., 2015]. Пероксидаза представляет собой внецикловый фермент, участвующий в регуляции содержания активных форм кислорода клетки.

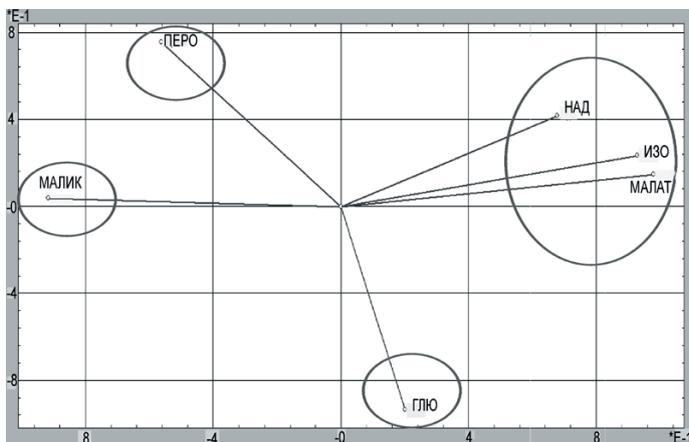


Рис. 1. Проекция нагрузок (ось X – 1 фактор, ось Y – 2 фактор) в факторном анализе адаптационного поведения ферментов при долговременном стрессе в условиях *in vitro* (120 суток): *перо* – пероксидаза, *изо* – изоцитратлиаза, *малат* – малатдегидрогеназа, *малик* – малик энзим, *над* – NADH-дегидрогеназа, *глю* – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа.

Ко второму фактору относится действие солевого стресса. При этом разные ферменты по-разному реагируют на хлоридное засоление на всех этапах адаптации (табл. 2).

Третьим фактором становятся сами условия культуры ткани, т.е. онтогенетические процессы внутри культуральных сосудов происходят по-разному: у исследуемых ферментов на разных этапах развития активность ферментов изменяется неодинаково.

К четвертому фактору относится влияние ионов меди, поскольку медный стресс имеет иную природу, чем солевой стресс, сходный с условиями засухи. Ионы меди имеют высокую токсичность, имея тенденцию к накоплению в различных органах растения, главным образом, в листьях. Из приведённых в табл. 2 результатов видно, что ферменты по-разному на различных этапах адаптации отзываются на условия медного стресса.

В результате долговременного трёхступенчатого стресса были получены онтогенетически зрелые растения вейгелы цветущей, адаптированные к высоким концентрациям хлорида натрия и ионов меди и подготовленные к высадке в открытый грунт. Изучение шести ферментов, относящихся к разным метаболическим циклам, выявило значительные различия в их стрессовом отклике на разных этапах адаптации. К концу эксперимента удельные активности ряда ферментов и содержание белка выравниваются с контрольными. Выводы в пользу получения хорошо адаптированных растений подтверждаются и колебаниями содержания свободного пролина, которое в ходе долговременной адаптации снижается по сравнению с контролем, приближаясь к уровню пролина у маточных растений в открытом грунте. Маркерными для определения процесса и степени адаптации древесных растений являются два фермента – изоцитратлиаза и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа в сочетании с определением содержания свободного пролина.

ЛИТЕРАТУРА

- Землянухин А.А., Землянухин Л.А.** 1996. Большой практикум по физиологии и биохимии растений. Воронеж: ВГУ: 188 с.
- Кулаичев А.П.** 2006. Методы и средства комплексного анализа данных. Учебное пособие. Изд. 4-е, М.: ФОРУМ – ИНФРА. М.: 512 с.
- Кузнецов В.В., Шевякова Н.И.** 1999. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция. *Физиология растений*. 48(2): 321–336.
- Степенко Л.А., Шевякова Н.И., Ракитин В.Ю., Кузнецов В.В.** 2011. Пролин защищает растения *Atropa belladonna* от токсического действия солей никеля. *Физиология растений*. 58(2): 275–282.
- Сошникова Т.Н., Радюкина Н.Л., Королькова Д.В., Носов А.В.** 2013. Пролин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Thellungiella salsuginea* при окислительном стрессе. *Физиология растений*. 60(1): 47–60.
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D.** 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*. 39: 205–207.
- Epritshev A.T., Fedorin D.N., Salnikov A.V., Igamberdiev A.U.** 2015. Expression and properties of the glyoxysomal and cytosolic forms of isocitrate lyase in *Amaranthus caudatus* L. *Journal of Plant Physiology*. 181: 1–8.
- Lloyd G., McCown B.** 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *In: Proceedings of the International Plant Propagators Society*. 30: 421–427.