

Изменение интенсивности флуоресценции клеток меристемной ткани винограда под действием ряда криопротекторов

UDC 581.817:577.342:547.42

T.F. STRIBUL*, YU.S. LYSAK, A.M. KOMPANIETS

Change in Fluorescence Intensity of Grape Meristem Cells Under Effect of Some Cryoprotective Agents

Исследована зависимость флуоресцентного свечения клеток меристемы винограда от воздействия на меристему нескольких веществ с криопротекторными свойствами. Обработанные криопротекторами меристемы облучали лазером для возбуждения фотоэлектронной эмиссии и получали спектры флуоресценции через 1, 3, 5, 20 и 120 мин. Установлено, что влияние криозащитных веществ проявлялось в изменении интенсивности свечения в диапазоне исследованных длин волн.

Ключевые слова: флуоресценция, свободнорадикальные реакции, антиоксиданты, флавопротеиды, пероксидазное окисление, хлорофилл, меристема.

Досліджена залежність флуоресцентного світіння клітин меристеми винограду від впливу на меристему деяких речовин з криопротекторними властивостями. Меристеми, оброблені криопротекторами, опромінювали лазером для збудження фотоелектронної емісії і отримували спектри флуоресценції через 1, 3, 5, 20 та 120 хв. Встановлено, що вплив криозахисних речовин виявлявся у зміні інтенсивності світіння у діапазоні досліджених довжин хвиль.

Ключові слова: флуоресценція, вільнорадикальні реакції, антиоксиданти, флавопротеїди, пероксидазне окислення, хлорофіл, меристема.

The effect of some substances with cryoprotective properties on grape meristem fluorescence and viability was studied. Treated with cryoprotectants meristems were irradiated with laser to excite photoelectron emission and the fluorescence spectra were obtained in 1, 3, 5, 20 and 120 min. It has been established that the effect of cryoprotective agents (CPAs) manifested in the change of fluorescence intensity within the range of the studied wave lengths.

Key words: fluorescence, free radical reactions, antioxidants, flavoproteins, peroxidation, chlorophyll, meristem.

Криопротекторы в той или иной степени вызывают нарушения в живой клетке, что может отразиться на энергетических, структурных или биохимических характеристиках процессов, которые в ней происходят [8].

Метаболизм растительных тканей сопровождается флуоресценцией [2]. Флуоресценция, связанная с внутриклеточным окислением липидов, представлена двумя процессами. Один из них протекает в нативной клетке и является свободнорадикальной реакцией неферментативного окисления ненасыщенных жирных кислот. Второй процесс в норме подавлен, но развивается при повреждении объекта и обусловлен пероксидазным окислением различных субстратов [10]. Вместе с тем главная составляющая флуоресценции растительных клеток связана с хлорофиллом. Поглощение молекулой хлорофилла электромагнитных волн сопровождается переходом ее в возбужденное состояние. Механизм флуоресценции заключается в возвращении молекулы хлорофилла в исходное состояние, сопровождающееся испусканием света [8].

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-30-07, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

Cryoprotective agents (CPAs) cause the various impairments in living cells, which may affect energetic, structural or biochemical characteristics of the processes taking place in it [8].

Metabolism of plant tissues is accompanied with fluorescence [2]. Fluorescence, related to intracellular lipid oxidation, is represented by two processes. One of them occurs in native cell and represents a free radical reaction of non-enzymatic oxidation of non-saturated fatty acids. The second process normally is suppressed, but develops during injury of the object as the result of peroxidation of various substrates [10]. At the same time the main component of plant cell fluorescence is related to chlorophyll. The chlorophyll molecule's absorption of electromagnetic waves is accompanied by its transition into an excited state. The mechanism of fluorescence consists in a reversion of chlorophyll molecule into the initial state, accompanied by light emission [8].

During the injury the oxidation of lipids and phenols in the plant tissues is intensified, causing the rise in fluorescence intensity, that exceeds the normal level

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

При повреждении растения в его тканях усиливается окисление липидов и фенолов, что вызывает увеличение интенсивности флуоресценции, превышающее уровень свечения в норме [4]. Изменение претерпевает и фотосинтетический аппарат, в котором увеличивается количество возбужденных компонентов [5]. Изменение флуоресцентного свечения проходит две фазы: на ранней стадии интенсивность ее повышается, а затем при умеренном воздействии фактора постепенно возвращается к норме. Если действующий фактор достаточно сильно влияет на структурные и/или биохимические параметры клеток, свечение резко усиливается и затем затухает необратимо [3]. При этом спектральный состав излучения не изменяется, т. е. природа процессов в клетке сохраняется, увеличивается только их интенсивность. Излучение в области 400–650 нм обусловлено окислением липидов и фенольных соединений, 650–750 нм – электронным транспортом в хлоропластах. [7].

С целью многократного увеличения интенсивности собственной флуоресценции в клетках меристем используется метод индукции лазером фотоэлектронной эмиссии.

Данные об интенсивности флуоресценции позволяют использовать этот показатель для изучения действия различных веществ (в частности, криопротекторов) на растительные клетки.

Цель работы – изучение воздействия криозащитных веществ и их смесей на клетки меристемных тканей винограда при возбуждении в них фотоэлектронной эмиссии, определение зависимости изменения состояния клеток меристем в присутствии криопротектора от интенсивности их флуоресценции.

Материалы и методы

Исследовали меристемы винограда, выделенные из растений, выращенных *in vitro*. После выделения меристемы культивировали в течение 24 ч на среде Murashige and Skoog (MS).

Изучали действие на меристемы следующих растворов: 0,75 М NaCl на дистиллированной воде; раствор 1 М 1,2-пропандиола (1,2-ПД) на среде MS; 7%-й раствор поливинилпирролидона с молекулярной массой 24000 (ПВП) на среде MS; смесь раствора 1 М 1,2-ПД и раствора 7% ПВП в соотношении 3:2.

Флуоресценцию клеток меристем винограда изучали с помощью конфокального микроскопа LSM-510 META (“Carl Zeiss”, Германия). Использовался диодный лазер с длиной волны 405 нм. Рабочая мощность лазера составляла 180 мВт, размер лазерной апертуры (*pin hole*) – 228 мкм. Спектры флуоресценции получали из лямбда-серий (*lambda stacks*) в диапазоне 411–754 нм с шагом

of fluorescence [8]. The changes affect also the photosynthetic apparatus where the number of excited components increases [5]. The changes in fluorescence pass two phases: at early stage the intensity of fluorescence increases and then gradually comes back to the norm under moderate effect of the factor. If acting factor intensively affects cell structure and/or biochemical parameters, the fluorescence amplifies rapidly with following irreversible decay [3]. Herewith the spectral profile does not change, *i. e.* the nature of the processes in a cell is kept, increases only their intensity [4]. The emission in the 400–650 nm bandwidth results from the oxidation of lipids and phenol substances, in 650–750 nm it is associated with electron transport in chloroplasts [7].

To multiply the intensity of own fluorescence in plant cells the laser induction of photoelectron emission is used [6].

The obtained data on the intensity of fluorescence enables the use of this index to investigate the effect of different substances (in particular, cryoprotectants) to plant cells.

The research aim is to investigate the effect of cryoprotective agents and their mixtures on the cells of meristem tissue of grape at the excitation of electron emission, finding the dependence of the change in the state of meristem cells in the presence of cryoprotectant on the intensity of their fluorescence.

Materials and methods

The investigations were performed in grape meristems, isolated from the *in vitro* grown plants. After isolation the meristems were cultured for 24 hrs in Murashige and Skoog (MS) medium.

The effect of following solutions on meristems was examined: 0.75M NaCl solution in distilled water; 1 M solution of 1,2-propane diol (1,2-PD) in MS medium; 7% solution of polyvinylpyrrolidone (PVP) with molecular mass of 24,000 in MS medium; composition of 1 M 1,2-PD solution and 7% PVP solution in the ratio of 3:2.

Cell fluorescence of grape meristems was studied by means of confocal microscope LSM-510 META (Carl Zeiss, Germany). Diode laser with the wavelength of 405 nm was used [6]. Operating power of the laser was 180 mW, pin hole made 228 μ m. Fluorescence spectra were acquired from the emission lambda stacks within 411–754 nm wave length range with 11 nm bandwidth using Zeiss LSM Image Examiner software (Carl Zeiss, Germany).

The meristems in the MS medium were placed into the microscope, fluorescence was excited with the laser and emission was recorded. The acquired spectrum was considered as control (F_0) (Fig. 1). The intensity curve had two maxima around 530 and 680 nm. Then the meristems were transferred from MS medium into

11 нм с помощью приложения Zeiss LSM Image Examiner ("Carl Zeiss", Германия).

Меристемы в каплях среды MS помещали под микроскоп, возбуждали флуоресценцию и регистрировали эмиссию. Полученный спектр флуоресценции считали контрольным (F_0) (рис. 1). Кривая интенсивности свечения имела два максимума: в области 530 и 680 нм. Затем меристемы переносили из среды MS в исследуемый раствор и через определенное время (1, 3, 5, 20 и 120 мин) регистрировали спектр флуоресценции (F). Полученные спектры нормировали на соответствующие им контрольные спектры (F/F_0). В каждом эксперименте использовали по 5–7 меристем.

Параллельно меристемы инкубировали в исследуемых растворах, затем отмывали от криопротекторов путем двукратной смены среды MS в течение 60 мин. После чего меристемы помещали в фитотрон для дальнейшего культивирования. На 4-й день подсчитывали количество живых меристем, которые сохраняли зеленый цвет и проявляли тенденцию к росту в течение всего времени наблюдения. Сохранность рассчитывали как отношение количества живых меристем к их общему количеству.

Результаты статистически обрабатывали с использованием программы статистического анализа Statistica 6.0. и метода наименьшей существенной разницы. Для оценки достоверности различий экспериментальных данных применяли критерий Фишера.

Результаты и обсуждение

Действие растворов криопротекторов на меристемы винограда является стрессовым фактором, усиливающим окислительные реакции в мембранных системах клеток [6].

Действие раствора 0,75 М NaCl. При использовании раствора NaCl в концентрации 0,75 М, которая в 5 раз превышала изотоническую концентрацию, изменился спектр свечения меристем (рис.2): в области 450–640 нм интенсивность флуоресценции возросла, что свидетельствовало об усилении окислительных процессов, в области 660–680 нм интенсивность уменьшилась, что может свидетельствовать о повреждениях в структурах хлоропластов.

Сохранность меристем уже на 2-й день культивирования после минутной инкубации в растворе NaCl была равна нулю, т. е. все меристемы погибли.

По-видимому, гиперконцентрация NaCl вызвала необратимые повреждения в меристемных клетках, что привело к гибели меристем и ингибировало флуоресценцию.

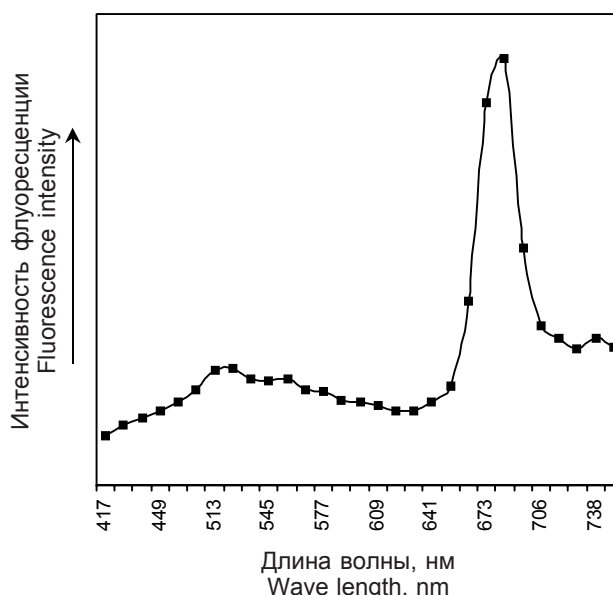


Рис. 1. Спектр флуоресценции меристем винограда в среде MS при возбуждении лазером с длиной волны 405 нм.

Fig. 1. Fluorescence spectrum of grape meristem in MS medium under 405 nm wave length laser excitation.

investigated solution and in certain time period (1, 3, 5, 20 or 120 min) the fluorescence spectra were recorded (F). The aquired spectra were normalized by corresponding control spectra (F/F_0). Each experiment was performed in 5–7 meristems.

At the same time the meristems were exposed in investigated solutions, then washed by double change of MS medium during 60 min. Afterwards the meristems were placed into phytotron for further culturing. To the 4th day the number of living meristems was counted. We considered the meristem as living one if it preserved the green color and if it tended to grow during the observation period. The viability was determined as the ratio between number of living meristems and total amount of meristems.

The results were statistically processed using the software Statistica 6.0 and method of the least significant difference. To assess the statistical significance of differences of experimental data the Fisher's criterion was applied.

Results and discussion

The effect of cryoprotectant solutions on grape meristems is a stress factor which strengthens oxidative reactions in cell membrane structures [6].

Effect of 0.75M NaCl solution. When applying the NaCl solution under concentration of 0.75 M, which in 5 times exceeds the isotonic concentration, the fluorescence profile in meristems changed (Fig. 2): within the 415–650 nm range the fluorescence intensity increased that testified the rise in oxidation intensity; in

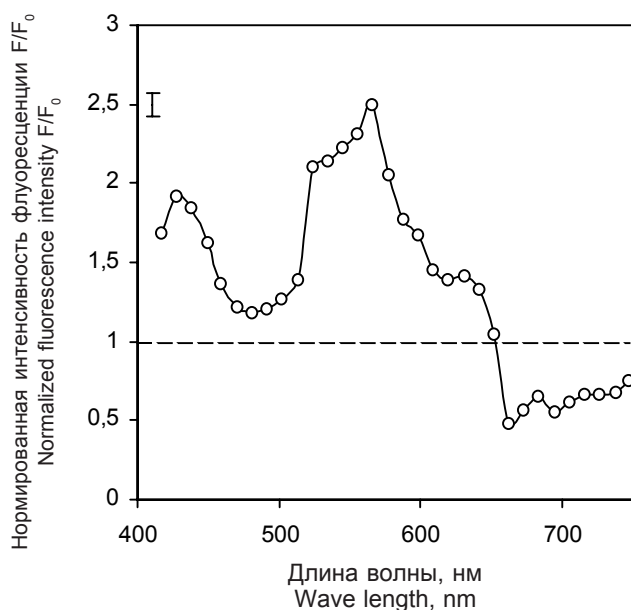


Рис. 2. Нормированный спектр флуоресценции меристем винограда при возбуждении лазером с длиной волны 405 нм через 1 мин после действия 0,75 М раствора NaCl.

Fig. 2. Normalized fluorescence spectrum of grape meristem under 405 nm wave length laser excitation in 1 minute after adding of 0.75 M NaCl solution.

Действие 1 М раствора 1,2-ПД. После 12-минутного действия 1 М раствора 1,2-ПД отмечено значительное увеличение интенсивности свечения в диапазоне всех длин волн (рис. 3), что, по-нашему мнению, вызвано двумя факторами. С одной стороны, раствор 1 М 1,2-ПД способствовал усилению окислительных реакций в мембранных системах клеток, с другой, – усиление интенсивности флуоресценции вызвано возбужденных состояний молекул хлорофилла [5, 10]. Через 120 мин пребывания в растворе криопротектора спектр флуоресценции меристем практически совпадал с контрольным.

Сохранность меристем винограда после 3-минутной инкубации в растворе 1 М 1,2-ПД составила около 78%.

Действие 7%-го раствора ПВП. Пятиминутная экспозиция меристем в растворе высокомолекулярного криопротектора вызвала рост флуоресценции в области 530 нм, а через 120 минут она не отличалась от контроля (рис. 4).

В длинноволновой области (680 нм) интенсивность свечения через 1 ч установилась на уровне, в полтора раза превышающем контроль, а после 2-часовой экспозиции – в 2,5 раза.

Очевидно, ПВП, будучи непроникающим веществом, посредством дегидратации вызывал структурные нарушения мембран, что сопровождалось активацией пероксидазных реакций в мембране и самоокислением флавиновых ферментов

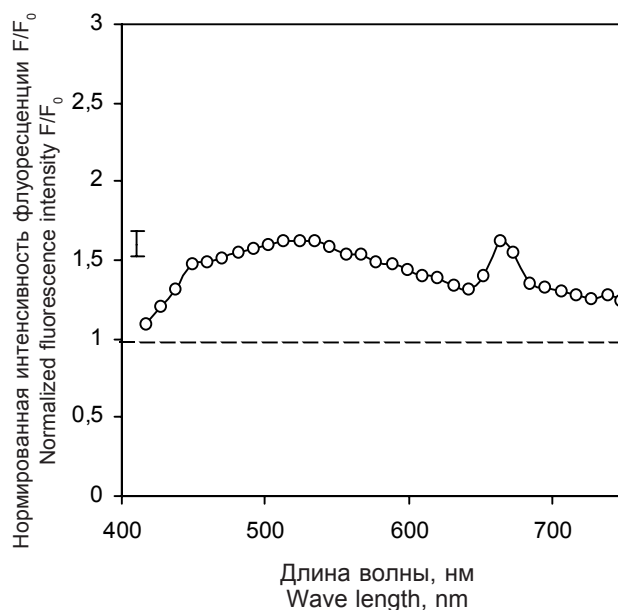


Рис. 3. Нормированный спектр флуоресценции меристем винограда при воздействии лазером с длиной волны 405 нм через 3 мин после действия 1 М раствора 1,2-ПД.

Fig. 3. Normalized fluorescence spectrum of grape meristem under 405 nm wave length laser excitation in 3 minutes after adding of 1M 1,2-PD solution.

the 660–680 nm region the intensity decreased, that means probably the damaging of the chloroplast structures.

Viability of meristems after 1 minute incubation in NaCl solution was equal to zero already to second day of culture, *i. e.* all the meristems died.

The effect of 1M solution of 1,2-PD. After 12 mins of 1 M 1,2-PD solution effect a significant rise in the intensity of fluorescence in whole wave length range was noted. We believe that this is caused by two factors. On the one hand, 1M 1,2-PD solution contributed to the strengthening of oxidative reactions in cell membrane structures and on another hand the increase in fluorescence intensity is caused by the rise in the excited states of chlorophyll molecules [8].

The meristem viability after 3 min incubation in 1 M 1,2-PD solution made about 78%.

The effect of 7% PVP solution. Exposure of meristems in the solution of high molecular cryoprotectant during 1 hour resulted in rise of the fluorescence intensity around 530 nm, and in 120 min the intensity did not differ from the control one (Fig. 4).

Within long-wave area (680 nm) the fluorescence intensity after 1 hr of incubation was set at the level, exceeding the control in 1,5 times, and after 2 hrs of exposure it was 2,5 times higher than control.

Obviously PVP being non-penetrating substance caused dehydration resulted in structural impairments of membranes, that was accompanied with activation

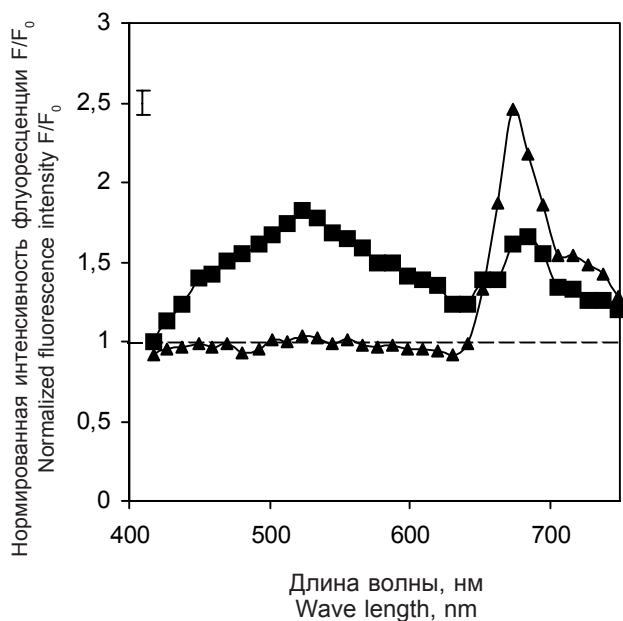


Рис. 4. Нормированные спектры флуоресценции меристем винограда при возбуждении лазером с длиной волны 405 нм после действия 7%-го раствора ПВП: ■ – через 1 ч; ▲ – через 2 ч.

Fig. 4. Normalized fluorescence spectra of grape meristem under 405 nm wave length laser excitation after adding of 7% PVP solution: ■ – in 1 hour; ▲ – in 2 hours after adding.

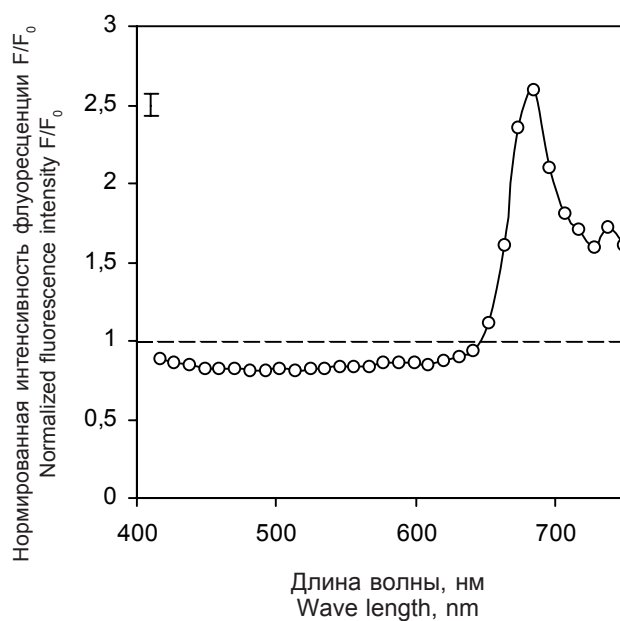


Рис. 5. Нормированный спектр флуоресценции меристем винограда при возбуждении лазером с длиной волны 405 нм через 20 мин после действия комбинации растворов 1 М 1,2-ПД и 7% ПВП.

Fig. 5. Normalized fluorescence spectrum of grape meristem under 405 nm wave length laser excitation in 20 min after adding of 1M 1,2-PD and 7% PVP solutions combination.

[10]. Кроме того, влияние ПВП активировало структурные изменения в хлоропластах клеток и переход хлорофила в возбужденное состояние. Такое состояние пигмента сохранялось длительное время, о чем свидетельствовал высокий показатель интенсивности свечения меристем через 2 ч [5].

Сохранность меристем после 2-часовой инкубации в растворе ПВП на 4-й день культивирования составила около 73%.

Совместное действие растворов криопротекторов 1 М 1,2-ПД и 7 % ПВП. При действии композиции растворов 1 М 1,2-ПД и 7% ПВП интенсивность свечения в области 530 уменьшилась (рис. 5), по сравнению с воздействием каждого вещества отдельно (см. рис. 3 и 4). Спектр флуоресценции длинноволновой области практически не отличался от такового для случая экспозиции с 7%-м раствором ПВП.

Сохранность меристем винограда после 120-минутной инкубации в смеси указанных криопротекторов составляла около 87%.

Выводы

Проведенные исследования влияния некоторых веществ на интенсивность флуоресценции меристем винограда показали, что инкубация в растворе 0,75 М NaCl приводит к уменьшению флуоресценции практически до нуля. Это может свидетельствовать о гибели клеток, что подтверждается

of peroxidase reactions in membranes and self-oxidation of flavin enzymes [10]. The effect of PVP activated also the structural changes in cell chloroplasts and chlorophyll transition into an excited state. This state of pigment was kept for a long time, that was confirmed with the high intensity of fluorescence in meristems in 2 hrs [5].

The viability of meristems after 2 hrs of incubation in PVP solution made about 73% to the 4th day of culture.

Joint effect of the solution of cryoprotectants of 1M 1,2-PD and 7% PVP. Under the effect of combination of 1 M solution of 1,2-PD and 7% PVP the fluorescence intensity around 530 nm increased in lesser extent (Fig. 5) than under the influence of each cryoprotectant separately (see Figs. 3 and 4). Fluorescence in long-wave bandwidth almost did not differ from that for 7% PVP.

The meristem viability after 2 hrs of incubation in the composition of the cryoprotectants made about 87%.

Conclusions

The investigations of the effect of some substances on the grape meristem fluorescence intensity showed that incubation in 0,75 M NaCl solution resulted in fluorescence drop almost down to zero. These can attest the cell death, that is confirmed by the grape meristems of such an intensity that it led to their death. The effect of incubation in 1,2-PD and PVP solely was almost the same. We believe that both cryoprotectants caused

данными о сохранности меристем при последующем культивировании. Влияние инкубации в растворах как 1,2-ПД, так и ПВП оказалось практически одинаковым. Оба криопротектора, как мы полагаем, вызвали в клетках меристем стресс умеренной интенсивности. Незначительность повреждающего действия данных криопротекторов подтверждают данные о сохранности меристем винограда при культивировании. Смесь данных криопротекторов практически не вызывает усиления окислительных процессов в клетках, в отличие от каждого отдельного компонента смеси. Сохранность меристем после воздействия на них смеси криопротекторов выше, чем после воздействия каждого криопротектора в отдельности.

Литература

1. *Брайон А.В.* Распознавание целых и поврежденных клеток при флуоресцентно-микроскопическом анализе растительных тканей // *Вісник КДУ. Сер. біол.*– 1967.– №9.– С. 125–127.
2. *Владимиров Ю.А.* Свечение, сопровождающее биохимические реакции // *Соросовский образовательный журнал.*–1999.– №6.– С. 25–32.
3. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.П.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.– М.: Наука, 1972.– 252 с.
4. *Карнаухов В.Н.* Люминесцентный анализ клеток.– Пушкино, 2002.– 131 с.
5. *Петрова Л.Н., Ерошенко Ф.В.* Структурная организация фотосинтетического аппарата и качество зерна озимой пшеницы // *Научный журнал КубГАУ.*– 2006.– №24(8).– С. 5–6.
6. *Тарусов Б.Н., Веселовский В.А.* Сверхслабые свечения растений и их прикладное значение.– М.: Изд-во МГУ, 1978.– 151 с.
7. *Феофанов А.В.* Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях // *Успехи биологической химии.*– 2007.– Т. 47.– С. 371–410.
8. *Цей А.А., Веселовский В.А., Тарусов Б.Н.* Первичная неспецифическая хемилюминесцентная реакция растений в ответ на воздействие токсических факторов среды // *Сверхслабые свечения в медицине и сельском хозяйстве.*– М.: Изд-во МГУ, 1974.– Т. 50.– С. 77–85.
9. *Lavorel J.* On a relation between fluorescence and luminescence in photosynthetic systems // In: *Progress in photosynthetic research / Ed. by H. Metzner.*– Tübingen, 1969.– P. 883–898.
10. *Qinghua S., Zhiyi B., Zhujun Z. et al.* Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in seedlings of *Cucumis sativa* L // *Plant Growth Regulation.*– 2006.– Vol. 48, N2.– P. 127–135.

*Поступила 27.04.2010
Рецензент А.И. Осецкий*

in meristem cells the stress of moderate intensity. The insignificant level of caused by these cryoprotectants injuries are confirmed by meristem viability indices in culture. The composition of the cryoprotectants almost did not caused the rise in intensity of oxidative processes in the cells in comparison with effect of each separate component of the mixture. The viability of the meristems after incubation in cryoprotectants' composition was higher than after incubation in solutions of single cryoprotectants.

References

1. *Brayon A.V.* Identification of undamaged and damaged cells in fluorescent microscopy analysis // *Visnyk of Kiev State University. Series Biology.*– 1967.– N9.– P. 125–127.
2. *Vladimirov Yu.A.* Fluorescence accompanying biochemical reactions // *Soros Educational Journal.*– 1999.– N6.– P. 25–32.
3. *Vladimirov Yu.A., Archakov A.P.* Lipid peroxidation in biological membranes.– Moscow: Nauka, 1972.– 252 p.
4. *Karnaukhov V.N.* Luminescence analysis of cells.– Puschino, 2002.– 131 p.
5. *Petrova L.N., Yeroshenko F.V.* Structural organization of photosynthetic apparatus and quality of fall wheat grain // *Scientific Journal of Kuban State Agrarian University.*– 2006.– N24(8).– P. 5–6.
6. *Tarusov B.N. Veselovskiy B.A.* Ultra-low plants fluorescence and their applied value.– Moscow: Moscow State University, 1978.– 151 p.
7. *Feofanov A.V.* Spectral laser scanning confocal microscopy in biological studies // *Uspekhi Biologicheskoy Khimii.*– 2007.– Vol. 47.– P. 371–410.
8. *Tsey A.A., Veselovskiy V.A., Tarusov B.N.* Primary nonspecific hemiluminescence response of plants to influence of environmental toxic factors // "Ultra-low fluorescence in medicine and agriculture".– Moscow: Moscow State University, 1974.– Vol. 50.– P. 77–85.
9. *Lavorel J.* On a relation between fluorescence and luminescence in photosynthetic systems // In: *Progress in photosynthetic research / Ed. by H. Metzner.*– Tübingen, 1969.– P. 883–898.
10. *Qinghua S., Zhiyi B., Zhujun Z. et al.* Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in seedlings of *Cucumis sativa* L // *Plant Growth Regulation.*– 2006.– Vol. 48, N2.– P. 127–135.

Accepted in 27.04.2010