

УДК 57.085.23:575.22

ОСОБЕННОСТИ РОСТА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ СОИ, ОТОБРАННЫХ НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ ИОНЫ-ИНГИБИТОРЫ НИТРАТРЕДУКТАЗЫ

Л.Е. СЕРГЕЕВА, С.И. МИХАЛЬСКАЯ, Е.Н. ТИЩЕНКО

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17
e-mail: plant@ifrg.freenet.kiev.ua

На селективной среде с добавлением токсических концентраций оксианионов вольфрама получены устойчивые клеточные линии сои сорта Киевская-27. Отобранные клоны демонстрируют устойчивость более пяти лет. Исследовали рост W-устойчивых линий на различных селективных средах: с оксианионами вольфрама или ванадия и хлоратом калия. В условиях действия любого стрессового фактора данные линии сохраняли нормальный рост. Рост клонов на селективных средах, содержащих только нитратную форму азота, может указывать на отбор нового типа нитратредуктазы.

Ключевые слова: соя, вольфрамат-, ванадат-анионы, хлорат калия, устойчивость, нитратредуктаза.

Введение. Проблема стресса и устойчивости по причине своей фундаментальности, многоуровневости и динамичности постоянно будет объектом пристального внимания и изучения. Возрастающий интерес к данной проблеме, к сожалению, не уменьшает количества неоднозначных определений и трактовок одного и того же феномена. Так, термином “устойчивость” называют и толерантность (переносимость) и резистентность (сопротивляемость), хотя уже по определению очевидна нетождественность указанных событий. Чёткое разграничение этих понятий, характеристика их особенностей позволит уточнить и ускорить процесс получения устойчивых форм. Что является неоспоримым показателем устойчивости? По нашему мнению – это стабильное (пусть и специализированное) функционирование биообъекта, метаболизм в условиях действия стрессового фактора, следствием чего всегда будет рост, увеличение биомассы, развитие организма. Интенсивность метаболизма в любом случае в наибольшей степени определяется активностью ферментов синтеза. Особенно это актуально в условиях стресса, ингибирующего или даже полностью инактивирующего ферменты.

Особой реакцией на стрессовое воздействие отличается нитратредуктаза (НР) (К.Ф.1.6.6.1) – “первое звено” в цепочке метаболизма азота, – катализирующая двухэлектронное восстановление нитрата в нитрит. НР представляет собой ферментный комплекс, состоящий из двух частей – диафоразной и редуктазной [1]. Эти составляющие фермента существенно различаются по характеру стресс-чувствительности [1]. Диафоразная часть – термолабильна, ингибируется реагентами на сульфгидрильные группы. Терминальная часть, напротив, заметно устойчива к повышению температуры. Однако последняя сильно угнетается (вплоть до структурного разрушения) при осмотических стрессах, при воздействии ионов тяжелых металлов. Очевидно, что ингибирование НР будет существенно отражаться на интегральном росте, развитии и продуктивности растения. С другой стороны активность фермента в условиях стресса обеспечит устойчивость организма.

В естественных условиях известны примеры организмов с устойчивыми формами нитратредуктаз. Это бактерии или низшие грибы. Так НР солелерантных дрожжей *Rhodotorula glutinis* сохраняла 100 % активность при воздействии 1мМ вольфрамата [2]. В другой публикации указывается, что НР галоалкалофильной денитрифицирующей бактерии *Halomonas sp.* штамм AGJ1–3 характеризовалась высоким температурным оптимумом (70 °С), повышенной термостабильностью и низкой субстратной специфичностью [3]. Отличались исключительной термоустойчивостью и не содержащие молибденового кофактора нитратредуктазы, выделенные из ванадат-восстанавливающей бактерии *Pseudomonas isachenkovii* [4].

Обращает внимание, что все изучавшиеся нитратредуктазы характеризуются несколькими общими свойствами. Во-первых, они выделены из устойчивых к абиотическим стрессам организмов и активны в стрессовых условиях. Во-вторых, НР – азы отличаются особой реакцией на воздействие ионов вольфрама и ванадия.

Установлено, что ионы ванадата и вольфрамата существенно ингибируют активность обычных НР. При этом ион (W(VI)) выступает как токсичный аналог иона молибдена в молибденовом кофакторе фермента, замещая необходимый ион в составе молекулы. Вольфрамовые аналоги Мо-ферментов, как правило, не активны, за исключением формиадегидрогеназы у некоторых анаэробных микроорганизмов [1]. Конкуренция вольфрама – молибден была использована для успешного отбора мутантных форм организмов, у которых нитратредуктазная активность проявляется и в присутствии вольфраматов. Так, Сингх с соавторами получили мутантные штаммы цианобактерии *Nostoc muscorum* с такими характеристиками НР [5]. Экспериментально были получены формы фермента, сходные с наблюдающимися в природе. Однако во всех случаях эти события касались одноклеточных организмов.

Нами была высказана гипотеза о возможности экспериментального получения высших растений с измененными характеристиками НР. Ранее методами клеточной селекции нами были получены растения табака, нитратредуктаза которых не требовала активации коферментами при стрессе [6]. Далее в наших экспериментах были отобраны клеточные линии табака и сои, устойчивые к ионам вольфрамата [7]. Уровень устойчивости клеточ-

ных культур обычно оценивают по приросту их биомассы [8]. В данном случае рост напрямую зависит от активности НР (смотри материалы и методы).

Устойчивые к вольфрамат-аниону клеточные линии сои в настоящее время культивируются (и сохраняют рост) уже более пяти лет.

Материалы и методы

Устойчивые клеточные линии сорта Киевская-27 были отобраны с помощью стандартной процедуры “плейтинга” на селективной среде, содержащей токсичные для клеточных культур сои (*Glycine max L., Merr.*) концентрации вольфрамат-аниона (в составе вольфрамата натрия). Эти клеточные варианты постоянно культивировали на модифицированной питательной среде В₅ Гамборга с селективной добавкой (1 мМ W(VI)). Модификации оригинального состава заключались в полном исключении аммиачной формы азота и молибдата натрия. Для оценки ростовых параметров W-устойчивых клеточных линий каллусную массу культивировали на альтернативных средах: контрольная КГ-1 – модифицированная среда В₅ Гамборга; селективные среды (1W и 1V) – среда КГ-1 с токсичными добавками 1мМ ионов вольфрама или ванадия соответственно. (Поскольку мутантный W – резистентный штамм *Nostoc muscorum* проявлял устойчивость и к ионам ванадия).

Для проверки стабильности активности НР использовали селективные среды с добавками хлората калия KClO₃ и KClO₃-м. Первая среда содержала 20 мМ хлората калия и гидролизат казеина в качестве источника азота. Среда KClO₃-м отличалась от предыдущей нитратной формой азота.

Количественное содержание азота во второй среде с хлоратом калия соответствовало его количеству в среде КГ-1.

Жизнеспособность клеток определяли, используя общепринятый показатель относительного прироста биомассы (Δm): $\Delta m = (m_k - m_{и}) / m_{и}$; где $m_{и}$ – масса каллуса в начале пассажа; m_k – масса каллуса в конце пассажа.

Экстракцию белка проводили в 50 мМ имидазол-НСI буфере для экстракции (рН 6,5), объемом 5мл, который содержал 2 мМ PVP, 2 мМ PMSF, 10 мМ меркаптоэтанола, 0,5 мкл тритона X-100. Экстракционную смесь центрифугировали 20 минут при 3000 г. Отобранный супернатант ещё дважды центрифугировали при 12 000 г. 1 мл протеинового экстракта осаждали и высушивали. Осадок ресуспендировали в 50 мМ трис-НСI буфере (рН 7,5) и определяли содержание белка по методу Брэдфорда [9].

Эксперимент проводили в трехкратной биологической повторности. Степень чистоты использованных реактивов была не ниже х.ч.

Результаты и обсуждение

На селективной среде с вольфрамат-анионом получены устойчивые клеточные линии сои. В течение всего срока культивирования (более пяти лет) в таких стрессовых условиях клоны отличались характерными морфологическими особенностями: каллусная масса состояла из отдельных дискретных округлых клеточных кластеров. Ранее эта особенность отмечалась нами для других W-устойчивых линий сои [7]. После двух-трех пассажей (продолжительность отдельного пассажа 30–35 дней) клонов на исходной селективной среде линии переносили на контрольную среду и среду,

Таблица 1. Относительный прирост биомассы каллуса вольфрам-устойчивых клеточных линий сои при культивировании на различных средах

Линия	Культуральные среды				
	А			Б	
	КГ-1	1W	1V	KClO ₃	KClO ₃ -м
КС-27 №3	0,28±0,08	0,82±0,12	0,75±0,35	2,96±1,11	0,58±0,08
КС-27 №5	0,62±0,04	0,99±0,05	0,58±0,19	1,71±0,01	1,21±0,71

Примечания: А – культуральные среды: КГ-1 – контроль; 1W – КГ-1+1 мМ W⁶⁺; 1V – КГ-1+1 мМ V⁵⁺. Б – культуральные среды: KClO₃ – КГ-1+20 мМ KClO₃+2,0 г гидролизата казеина; KClO₃-м – КГ-1+20 мМ KClO₃+1,6 г KNO₃.

Таблица 2. Динамика накопления суммарного белка (мг/г сырой массы) у W-устойчивой линии сои сорта Киевская-27 при культивировании на селективных средах с ионами вольфрама или ванадия

Среды	Дни		
	7 дней	14 дней	30 дней
V ₅ + W ⁺⁶	6,50±0,27	8,87±0,11	5,10±0,21
V ₅ + V ⁺⁵	2,50±0,14	7,40±0,14	10,30±0,23

Примечание: данные в таблице средние из трех биологических и трех аналитических повторностей.

содержащую альтернативный стрессор – ванадат-анион. W-устойчивые клеточные линии сохраняли рост при любом произвольном чередовании культуральных сред. При этом продолжительность культивирования в норме или на стрессовом фоне не имела значения. Признак устойчивости у клеточных линий проявлялся и после двухлетнего культивирования в отсутствие стрессора. Достоверным показателем устойчивости является относительный прирост биомассы – Δm (табл. 1, А). Видно, что клетки, культивированные на селективных средах с вольфрамом и ванадатом не испытывают стресса, поскольку Δm в этом случае превышает этот параметр в норме (контрольная среда КГ-1).

Сингх с соавторами отмечали ранее, что вольфрам-устойчивый штамм *Nostoc muscorum* нуждался в добавлении ванадия к среде культивирования [10]. Н.П. Львов с соавторами описывали особенности жизнедеятельности

ванадат-редуцирующих микроорганизмов и характеристику их нитратредуктазы [4]. В публикации отмечено, что после исчерпания нитратов у исследуемых микроорганизмов субстратом для НР выступает ванадат. С. Авазери с соавторами также связывают устойчивость штамма *E. coli* к анионам теллуриду и селенату с появлением у нитратредуктазы бактерии новых свойств – восстановления этих элементов [11].

В табл. 2 представлена динамика накопления суммарного белка в течение одного пассажа у вольфрам-устойчивой клеточной линии при культивировании на селективных средах с токсическими концентрациями ионов вольфрама и ванадия. Приведенные результаты отражают различный характер функционирования клеток, поскольку стрессовое ингибирование роста отсутствует (см. выше). Активная жизнедеятельность клеток при росте каллуса на среде с добавкой воль-

фрамат-аниона (1–14 день), отражается в увеличении содержания белка. Снижение содержания белка в биомассе каллуса в конце пассажа вполне вероятно является следствием двух событий, обычно происходящего истощения ресурсов и старения культуры. В то же время стабильный рост количества общего белка в клетках при культивировании на среде с добавкой иона ванадия может свидетельствовать в пользу увеличения активности метаболизма с возрастом культуры. Эффективность обмена в клетке также повышается, поскольку обязательное истощение питательной среды (исчерпание нитратов) не сказывалось на биосинтезе. Таким образом становится очевидным, что рост вольфрамоустойчивых клеточных линий на селективных средах с различными оксианионами (W^{6+} и V^{5+}) обеспечивается за счет реализации различных механизмов устойчивости.

На первый план выдвигается феномен устойчивости нитратредуктазы. Цитируемые ранее в настоящей статье авторы устойчивость НР к ионам вольфрама и ванадия объясняли появлением новых форм диссимиляторных НР, отличающихся уникальными характеристиками [4, 5]. Однако названные исследователи не оценивали стабильность НР в условиях действия “абсолютного” стрессора – хлората калия ($KClO_3$). Известно, что бертолетова соль (хлорат калия) – это химическое соединение, с помощью которого отбирают растительные формы, дефектные по нитратредуктазе [12, 13]. Авторы (эти и многие другие) указывают на отсутствие нитрат-редуцирующих свойств у таких растений и клеточных линий и гибель нормальных в присутствии $KClO_3$. В наших экспериментах клеточные культуры сои дикого типа

также погибали на среде с хлоратом калия.

Для определения устойчивости нитратредуктазы клеточные линии, отобранные на средах с вольфрамом и растущие в присутствии W^{6+} или V^{5+} , пассировали на средах с хлоратом калия (20 mM) и различной формой азота (аммиачная – среда $KClO_3$ и нитратная – $KClO_3$ -м). Такая концентрация $KClO_3$ используется во многих экспериментах для отбора дефектных по НР форм [13–15]. В табл. 1, Б приводятся данные относительного прироста биомассы каллуса. Если рост каллуса на селективной среде $KClO_3$ еще можно объяснить за счет потребления аммиачной формы азота, то жизнеспособность клеток, культивируемых на среде $KClO_3$ -м, обеспечивается за счет функционирования нитратредуктазы.

Поскольку, как было указано ранее, источником азота в средах была исключительно его нитратная форма, можно предположить, что устойчивость клеточных линий сопряжена с устойчивостью нитратредуктазы.

Выводы

Показано, что на селективной среде с ионами вольфрама можно отбирать клеточные линии сои, устойчивые к анионам (VO_3^- ; ClO_3^-), вызывающим гибель культур дикого типа. Поскольку потребление азота (редукция нитратов) происходит на фоне действия ионов – ингибиторов нитратредуктазы, можно говорить об отборе новой формы (стабильной) этого фермента. Резистентность клеточных линий сопряжена со стресс – устойчивостью нитратредуктазы.

Список литературы

1. Львов Н.П. Молибден в ассимиляции азота у растений и микроорганизмов. – М.: Наука, 1989. – 86с.

2. Носиков А.Н., Чичикало Е.В., Голубева Л, И., Звягильская Р.А., Львов Н.П. Стимуляция нитратредуктазной активности в солетолерантных дрожжах *Rhodotorula glutinis* вольфрамом в присутствии молибдена // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 2. – С. 245–249.
3. Антипов А.Н., Морозкина Е.В., Сорокин Д.Ю., Голубева Л, И., Звягильская Р.А., Львов Н.П. Характеристика не содержащей молибден нитратредуктазы галоалкалофильной бактерии *Halotomas* sp. штамм AGJ 1–3 // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 7. – С.968–973.
4. Антипов А.Н., Ляликова Н.Н., Хижняк Т.В., Львов Н.П. Некоторые свойства диссимиляторных нитратредуктаз, не содержащих молибден и молибденовый кофактор // Биохимия. – 1999. – Т. 64, №5. – С.5–10.
5. Singh H.N., Vaishampayan A., Sonie K.C. Mutation from molybdenum dependent growth and further evidence for a genetic determinant common to nitrogenase and nitrate reductase in the blue – green alga *Nostoc muscorum* // Mutant Res. – 1978. – Vol. 50. – P.427–432.
6. Сергеева Л.Е., Львов Н.П., Сафаралиев П.М., Левенко Б.А. Активность нитратредуктазы у растений табака, регенерированных из солеустойчивой клеточной линии // Физиология и биохимия культ. растений. – 1993. – Т. 25, №6. – С.587– 591.
7. Сергеева Л.Е., Труханов В.А. Получение клеточных линий растений, устойчивых к вольфраму // Физиология и биохимия культ. растений. – 1997. – Т. 29, №6. – С.51–55.
8. Meredith C.P. Selection and characterization of aluminum – resistant variants from tomato cell cultures // Plant Sci. Lett. – 1978. – Vol. 12. – P.25–34.
9. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding // Anal. Biochemistry. – 1976. – Vol. 72. – P. 248 – 254.
10. Singh H.N., Chakravarty D., Srinivasa Rao K., Singh A.K. Vanadium requirement for cyanobacterium *Nostoc muscorum* // J. Basic Microb. – 1993. – Vol. 3. – P.201–205.
11. Avazeri C., Turner P.J., Weiner J.H., Giordano G., Vermeglio A. Tellurite reductase activity of nitrate reductase is responsible for the basal resistance of *Escherichia coli* to tellurite // Microbiology. – 1997. – Vol. 143. – P. 1181–1189.
12. King J., Khanna V. A nitrate reductase – less variant isolated from suspension cultures of *Datura innoxia* (Mill) // Plant Physiol. – 1980. – Vol. 66. – P. 632–636.
13. Negrutiu I., Dirks R., Jacobs M. Regeneration of fully nitrate reductase deficient mutants from protoplast culture of *Nicotiana plumbaginifolia* (Viviani) // Theor. Appl. Genet. – 1983. – Vol. 66. – P.341–347.
14. Buchanan R.J., Wray J.L. Isolation of molybdenum cofactor defective cell lines of *Nicotiana tabacum* // Mol. Gen Genet. – 1982. – Vol. 188. – P.228–234.
15. Vries S.E de, Dirks R., Mendel R.R., Schaart J.G., Feenstra W.J. Biochemical characterization of some nitrate reductase deficient mutants of *Nicotiana plumbaginifolia* // Plant Sci. – 1986. – Vol. 44. № 2. – P.105–110.

Представлена В.А. Кунахом
Поступила 19.10.2008

ОСОБЛИВОСТІ РОСТУ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ
СОЇ НА СЕЛЕКТИВНИХ СЕРЕДОВИЩАХ,
ЩО МІСТЯТЬ ІОНИ –
ІНГІБІТОРИ НІТРАТРЕДУКТАЗИ

Л.Е. Сергеева, С.І. Михальська,
О.М. Тищенко

Інститут фізіології рослин і генетики НАН
України,
Україна, 03022, м. Київ, Васильківська, 31/
17
e-mail: plant@ifrg.freenet.kiev.ua

На селективному середовищі, яке містило токсичні концентрації оксианіонів вольфраму отримано стійкі клітинні лінії сої сорту Київська – 27. Відібрані клони демонст-

рують стійкість більше п'яти років. Досліджували ріст W-стійких ліній на різних селективних середовищах: з оксианіонами вольфраму або ванадію та з хлоратом калію. За умови дії будь-якого стресового чинника дані лінії зберігали нормальний ріст. Ріст клонів на селективних середовищах, які містять тільки нітратну форму азоту, може вказувати на відбір нового типу нітратредуктази.

Ключові слова: соя, вольфрамат-, ванадат-аніони, хлорат калію, стійкість, нітратредуктаза

GROWTH PECULARITIES OF SOYBEAN CELL LINES ON CULTURAL MEDIA WITH IONS – INHIBITORS OF NITRATE REDUCTASE

L.E. Sergeeva, S.I. Mikhalskaya, E.N. Tishchenko

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska St., 31/17
e-mail: plant@ifrg.freenet.kiev.ua

On the selective medium with toxic concentration of tungstate oxyanions the resistant cell lines of soybean cv.Kievskaya-27 were obtained. The selected clones demonstrate their resistance more than five years. It was investigated the growth of W-resistant lines during their cultivations on various selective media: with the addition of tungstate or vanadium oxyanions and potassium chlorate. These lines retained the normal growth under stress pressure of any agent. The clones proliferation on selective media with only nitrate form of the nitrogen is a possible mark of the selection of the new type of the nitrate reductase.

Key words: soybean, tungstate -, vanadium – oxyanions, potassium chlorate, resistance, nitrate reductase.