

RAPD-АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ СОИ С ПЕРЕКРЕСТНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ОКСИАНИОНАМ ВОЛЬФРАМА И ВАНАДИЯ



*Исследовали влияние оксианионов ванадия на геном сои (*Glycine max* L., Merr.) в устойчивой к вольфраму (WR) клеточной линии. WR-линия показывает перекрестную устойчивость к оксианионам V^{5+} . Установлено наличие одинаковых по размеру RAPD-ампликонов, дифференциально синтезируемых с ДНК исходного каллуса и WR-линии, которая последовательно культивируется в присутствии летальных доз оксианионов W^{6+} и V^{5+} . Предположено, что в геноме сои имеются локусы, повышенная нестабильность которых обусловлена действием разных стрессоров.*

© Е.Н. ТИЩЕНКО, С.И. МИХАЛЬСКАЯ, Л.Е. СЕРГЕЕВА, 2009

Введение. Изучение структурно-функциональной изменчивости генома вносит существенный вклад в понимание механизмов комплексной толерантности растений к неблагоприятным факторам окружающей среды. Засуха и засоление — одни из основных абиотических стрессоров, оказывающих негативное влияние на продуктивность, рост и развитие сельскохозяйственных культур. Вместе с тем увеличивающееся в последнее время антропогенное загрязнение окружающей среды токсичными элементами ставит эту проблему в число приоритетных.

Один из аспектов толерантности культурных растений связан с генетическим разнообразием в популяциях растений, которое является результатом качественных и/или количественных изменений в полинуклеотидных последовательностях ДНК [1]. Источником такого разнообразия может быть соматическая изменчивость при культивировании *in vitro* растительных тканей [2–4]. Вместе с тем поиск новых форм с повышенной устойчивостью к комплексу абиотических факторов затруднен при использовании и биотехнологических, и традиционных селекционно-генетических методов.

Для отбора ценных мутаций предложено направление клеточной селекции, заключающееся в создании моделированных систем *in vitro* с использованием летальных доз таких ионов тяжелых металлов, которые в микроколичествах способны оказывать многовекторные стрессовые воздействия на растительные клетки [5]. Предположено, что устойчивость к иону токсичного элемента будет приводить к повышенной кросс-толерантности к другим абиотическим стрессорам. В качестве селективного агента представляют интерес ионы вольфрама и ванадия, которые оказывают негативное воздействие на процессы дыхания и фосфорилирования белков в растениях [6], к тому же W^{6+} является токсичным аналогом иона молибдена, который входит в состав кофактора нитратредуктазы — ключевого фермента ассимиляции нитратов, чувствительного к различным абиотическим стрессорам [7].

Нами получены клеточные линии сои (*Glycine max* L., Merr), устойчивые к токсичным концентрациям вольфрамат-оксианионов (WR-линии). Эти линии проявляют также устойчивость к осмотическим веществам, в частности, в отличие от исходного каллуса они спо-

способны расти и пролиферировать на 0,8 М манните, на 1%-ном сульфатном или сульфатно-хлоридном засолении [8]. Такие линии являются удобным объектом для изучения молекулярных механизмов комплексной устойчивости растений на клеточном уровне. Целью настоящей работы был анализ изменчивости генома вольфрам-устойчивой клеточной линии (WR-линии) сои в ответ на действие летальных доз иного стрессора – ванадатоксианионов.

Материалы и методы. ДНК исходного каллуса (КК27), индуцированного из листьев стерильных растений сои сорта Киевская 27 (селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины), и WR-линии 7–8-го пассажа, культивируемой в присутствии летальной дозы оксианионов вольфрама или ванадия (по 1 мМ), выделяли по модифицированному нами методу Деллапорта [9].

Уровень полиморфизма ДНК анализировали методом RAPD-ПЦР [10], используя девять декамерных праймеров (табл. 1). Амплификацию ДНК осуществляли в программируемом приборе «Терцик» (Россия) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 25–30 пг ДНК, 2,5 мкл 10-кратного реакционного буфера (Promega, без MgCl₂), по 0,2 мМ каждого дАТФ, дГТФ, дТТФ, дСТФ, 0,3 мкМ праймера, 1 ед. Таq-полимеразы (Promega), 1,5 мМ MgCl₂. На реакционную

смесь наслаивали по 20–30 мкл минерального масла. Условия амплификации: предденатурация 94 °С, 3 мин; затем 42 цикла – денатурация 94 °С, 1 мин; отжиг – 36 °С, 1 мин; синтез – 72 °С, 2 мин; конечная элонгация – 72 °С, 7 мин.

Электрофорез проводили в 2,0%-ном агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия в 1×ТВЕ при напряженности 3–4 В/см в течение 4–6 ч. Продукты амплификации представляли в виде бинарной матрицы, где наличие или отсутствие одинаковых по размеру фрагментов соответствовало значениям 1 и 0. Уровень гомологии и дивергенции ДНК, представленной в спектрах сравниваемых ампликонов, определяли по коэффициентам Жаккарда [11], учитывая воспроизводимые минорные и мажорные продукты синтеза двух биологических повторностей опыта.

Суммарный белок WR-линии экстрагировали в буфере, содержащем 50 мМ имидазола-НСl (рН 6,5), 2 мМ PVP, 2 мМ PMSF, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 0,5 мкл тритона X-100, и центрифугировали 20 мин при 3000 g. Супернатант еще дважды центрифугировали при 12 000 g. Высушенный осадок ресуспендировали в 50 мМ трис-НСl буфере (рН 7,5) и по методу Брэдфорда определяли содержание белка при трех биологических повторностях опыта [12].

Таблица 1

Сравнительная характеристика продуктов амплификации ДНК КК27 и WR-линии, культивируемой на питательных средах с 1 мМ оксианионов вольфрама (WR^W) или ванадия (WR^V)

Праймеры	Количество ампликонов		
	Исходный каллус КК27	Линия	
		WR ^W	WR ^V
P1 (5'-CTC AGC CCA G-3')	16	16	16
P2 (5'-GCG CAT TAG A-3')	14 [1, 1]	12 [0, 0]	14 [1, 1]
P3 (5'-GGC TAG GGC A-3')	14 [0, 1]	14 [1, 0]	14 [0, 1]
P4 (5'-ATC AAG CTG C-3')	8	8	8
P5 (5'-GGT TCC AGC T-3')	16	16	16
P6 (5'-CTG AGG CAA A-3')	4	4	4
P7 (5'-GAG CCA ACC G-3')	18	18	18
P8 (5'-CAC GGC GGG T-3')	13	13	13
P9 (5'-GCC ATC AAG A-3')	7	7	7
Всего	110	108	110

Примечание. В квадратных скобках представлены вариабельные ампликоны, где 1 и 0 означают присутствие и отсутствие фрагмента соответственно.

Для цитогенетического анализа ткани WR-линии 7-го дня пассирования фиксировали в ацеталкоголе, готовили давленные ацетоорсеиновые препараты по методике [13] и анализировали под микроскопом «Amplival» при увеличении 100×15 .

Результаты исследований и их обсуждение. Для получения устойчивых клеточных линий принципиальное значение имеет выбор селективной (токсичной) концентрации стрессора. В нашем случае ею считали такую концентрацию оксианионов вольфрама (1 мМ), при которой останавливался рост исходного каллуса, а последующий возврат в нормальные условия не восстанавливал жизнедеятельность клеток. Изучение WR-линии на устойчивость к оксианионам ванадия показало, что она способна выдерживать летальные дозы этого стрессора, равные 1 мМ.

Для дифференциации неустойчивых и устойчивых клеточных линий, помимо интегрального критерия устойчивости — относительно прироста биомассы каллуса, использовали один из основных показателей необратимого перехода клеток на путь гибели — фрагментацию ДНК [8]. Установлено, что при выбранной селективной концентрации оксианионов вольфрама и ванадия суммарная ДНК исходного каллуса сои в отличие от устойчивой линии подвергается интенсивной деградации с образованием непрерывного спектра фрагментов широкого диапазона молекулярных масс (рис. 1). Отсутствие в спектре фрагментации ДНК мультимеров, размер которых составляет ~180 п.н., свидетельствует в пользу того, что токсичные концентрации оксианионов ванадия, как и вольфрама, вызывают гибель клеток сои путем некроза.

При культивировании WR-линии на питательных средах с 1 мМ оксианионов вольфрама (WR^W) или ванадия (WR^V) в течение одного пассажа наблюдаются отличия в динамике накопления суммарного белка (табл. 2). Характерной чертой WR^V является постепенное повышение содержания белков, в то время как WR^W имеет четко выраженный максимум на стадии стационарного роста, причем если в период экспоненциального роста WR^W этот параметр был в 2,6 раза больше, то в конце пассажа — приблизительно в 2 раза меньше, чем в

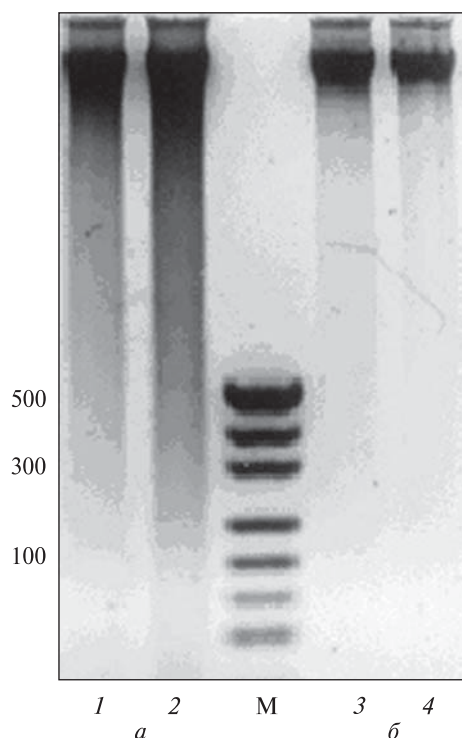


Рис. 1. Электрофореграмма суммарной ДНК: *a* — исходный штамм КК27, культивируемый в присутствии токсичных концентраций оксианионов ванадия (1) и вольфрама (2); *б* — вольфрам-устойчивая клеточная линия сои WR^W (3) и WR^V (4); М — маркер молекулярных масс pUC19 DNA/MspI Marker, 23 («Fermentas», Литва). Слева указан размер фрагментов в п.н.

WR^V. Полученные данные свидетельствуют о дифференциальном влиянии обсуждаемых стрессоров на процесс биосинтеза и/или стабильность белков, что, возможно, является отражением различий в механизмах адаптации и/или устойчивости клеток к оксианионам вольфрама и ванадия.

Таблица 2
Динамика накопления суммарного белка WR-линии при культивировании на средах с летальными дозами оксианионов вольфрама и ванадия

Вольфрам-устойчивая линия	Общее количество белка, мг/г сырой ткани при продолжительности культивирования		
	7 дней	14 дней	30 дней
WR ^W	6,50 ± 0,12	8,87 ± 0,11	5,10 ± 0,21
WR ^V	2,50 ± 0,14	7,40 ± 0,14	10,30 ± 0,23

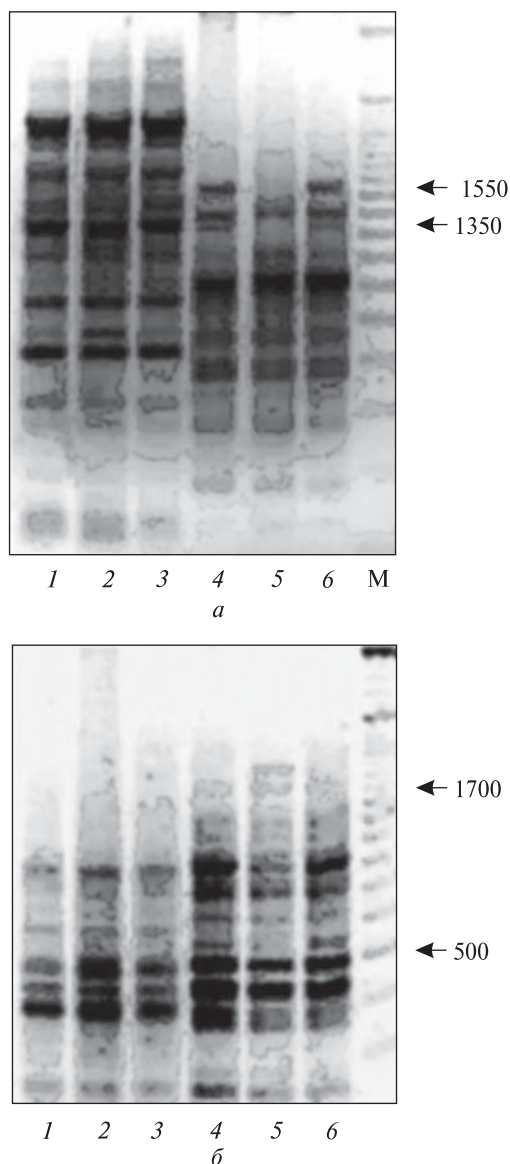


Рис. 2. Спектры продуктов амплификации ДНК сои: *a* – праймерами P1 (1, 2, 3), P2 (4, 5, 6); *б* – P4 (1, 2, 3), P3 (4, 5, 6) исходного каллуса КК27 (1, 4), а также вольфрам-устойчивой клеточной линии в присутствии токсичных концентраций оксианионов вольфрама WR^w (2, 5) и ванадия WR^v (3, 6). М – маркер молекулярных масс O'Range Ruler™, 100–6000 п.н. («Fermentas», Литва). Стрелками указаны варибельные ампликоны и их размер в п.н.

Изучение клеточных линий, устойчивых к абиотическим факторам, способствует пониманию вопросов о скорости дивергенции различных типов полинуклеотидных последователь-

ностей и в целом о пределах изменчивости ДНК, свойственных этой молекуле в ответ на летальные дозы чередующихся стрессоров. Для изучения уровня изменчивости ДНК КК27 и WR -линии, культивируемой на питательных средах с 1мМ оксианионов вольфрама или ванадия, использовали RAPD-метод, который позволяет оценить варибельность значительного числа локусов, распределенных на протяжении всего генома. Все используемые нами девять произвольных декамерных праймеров с разной эффективностью обеспечивали синтез определенного набора фрагментов размером $\sim 200 \div 3500$ п.н., количество которых составляло от 4 до 18 (табл. 1 и рис. 2).

Сравнение спектров амплификации ДНК исходного каллуса и полученной от нее WR -линии показало, что среди 111 синтезированных фрагментов наблюдается разница для четырех ампликонов. В частности, с использованием праймера 5'-GCG CAT TAG A-3' установлено исчезновение фрагментов размером ~ 1550 и 1350 п.н. у WR^w -линии, тогда как при применении праймера 5'-GGC TAG GGC A-3' у этой линии появлялся новый ампликон размером ~ 1700 п.н. и отсутствовал фрагмент размером ~ 500 п.н. Установленные различия могут быть результатом замены пар оснований в одном и/или обоих сайтах связывания праймеров ДНК, делециями или вставками последовательностей внутри амплифицируемых локусов ДНК [10, 14].

При чередовании стрессовых факторов, предполагая, что каждый из них может приводить к нестабильности генома, теоретически можно ожидать следующие варьирования в паттернах ампликонов ДНК КК27, WR^w и WR^v : 1–0–0, 1–1–0, 1–0–1, 0–1–1, 0–0–1, 0–1–0. Только полиморфные фрагменты, которые идентифицированы в ДНК КК27 и культивируемой в течение семи пассажей WR^w -линии, были варибельными в ДНК WR^v . Так, фрагменты размером ~ 1550 , 1350 и 500 п.н., отсутствовавшие у WR^w -линии, появлялись у WR^v , а ампликон размером ~ 1700 п.н. WR^w -линии, который не наблюдался в ДНК исходного каллуса, исчезал в спектре WR^v , т.е. при использовании указанных праймеров происходили следующие типы изменений в ампликонах: 1–0–1, 0–1–0. Индекс подобия и ди-

вергенции среди проанализированных фрагментов в спектрах ДНК WR^w и WR^v, а также KK27 и WR^w составил 0,964 и 0,036 соответственно, тогда как различий между KK27 и WR^v не наблюдалось.

Тот факт, что для четырех указанных полиморфных ампликонов в спектре WR^v имеет место их появление/исчезновение (0–1, 1–0), свидетельствует об изменчивости полинуклеотидных последовательностей ДНК сои при чередовании летальных доз оксианионов вольфрама и ванадия, а также о влиянии последних на стабильность молекул ДНК. Динамичное варьирование близких по размеру ампликонов, наблюдаемое в спектрах ДНК KK27 и WR-линии, позволяет сделать предположение о наличии в геноме сои локусов с повышенной нестабильностью, что обусловлено влиянием различных стрессовых факторов. Возможно, помимо ионов вольфрама и ванадия, определенный вклад могут вносить и условия культивирования *in vitro*.

Следует отметить, что данные о дифференциальной стабильности последовательностей ДНК растений немногочисленны. Так, генетическая нестабильность установлена при изменении уровня ploидности (тетраплоид→диплоид→тетраплоид) в культуре *in vitro* с использованием колхицина у *Eragrostis curvula*, где ревертантные ампликоны включают в большинстве случаев некодирующие последовательности, хотя среди них встречаются и гомологи генам [15]. Показано, что при культивировании культуры тканей, полученных от разных линий кукурузы, осуществляются изменения в RAPD-ампликонах одного и того же размера [16]. Linacero et al. [17] предполагают существование в геноме ржи «горячих зон мутагенеза». Преимущественные точки локализации для FB-транспозона позволяют частично объяснить обсуждаемый феномен [18]. Тем не менее механизмы, связанные с нестабильностью конкретных локусов генома растений, не ясны.

Учитывая приведенные литературные данные, можно предположить, что динамичное появление/исчезновение ампликонов в ДНК сои является отражением процессов, взаимосвязанных с цитогенетической изменчивостью, так как культивируемая вольфрам-устойчивая линия представляет собой миксоплоид-

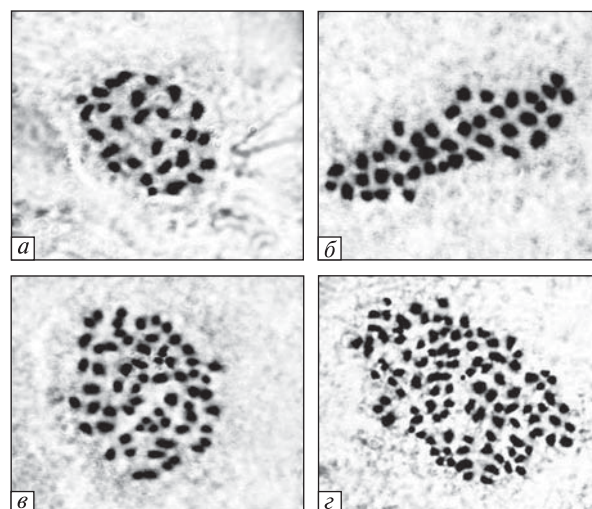


Рис. 3. Метафазы с разным числом хромосом в вольфрам-устойчивой клеточной линии сои (*Glycine max* L., Merr, $2n = 4x = 40$), культивируемой в присутствии селективной концентрации оксианионов вольфрама: а – 30 хромосом; б – 40 хромосом; в – около 60 хромосом; г – около 70 хромосом

ную популяцию, где встречаются как гипоплоидные, анеуплоидные, так и октоплоидные клетки при норме $2n = 40$ (рис. 3). Вместе с тем идентифицированные изменения в последовательностях нуклеотидов могут быть результатом активности мобильных генетических элементов, замен нуклеотидов, делеций, вставок в отдельных клетках WR-линии.

Таким образом, WR-линия обладает устойчивостью к дозе оксианионов ванадия, вызывающей гибель клеток исходного каллуса путем некроза. При ее культивировании на средах с токсичными концентрациями вольфраматили ванадатоксианионов в течение одного пассажа наблюдаются различия в динамике накопления суммарного белка. Показан высокий уровень гомологии проанализированных 111 RAPD-ампликонов. Идентифицировано четыре фрагмента, дифференциально синтезируемых с ДНК исходного каллуса, а также WR-линии, культивируемой последовательно на средах, которые содержат оксианионы W⁶⁺ и V⁵⁺. Наличие фрагментов одинакового размера, вариабельно амплифицируемых с ДНК KK27, WR^w и WR^v, позволяет предположить существование в ДНК сои локусов, повышенная нестабильность которых обусловлена действием разных стрессовых факторов.

E.N. Tishchenko, S.I. Mykhalska, L.E. Sergeeva
RAPD-ANALYSIS OF SOYBEAN CELL LINE WITH
CROSS-RESISTANCE TO TUNGSTEM
AND VANADIUM OXYANIONS

The effect of vanadium oxyanions on genome of soybean (*Glycine max* L., Merr.) in tungsten-resistant cell line was studied. The line is resistant to V^{5+} -oxyanions. RAPD-amplicons with identical length are differentially synthesized from DNAs of tungsten-resistant cell line as well as of the initial culture was shown by using the lethal dose of oxyanions W^{6+} and then V^{5+} . The presence of instable loci in soybean genome under different stressors is discussed.

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

RAPD-АНАЛІЗ КЛІТИННОЇ ЛІНІЇ СОЇ
З ПЕРЕХРЕСНОЮ СТІЙКІСТЮ
ДО ОКСИАНІОНІВ ВОЛЬФРАМУ ТА ВАНАДІЮ

Вивчали вплив оксианіонів ванадію на геном сої (*Glycine max* L., Merr.) у стійкої до вольфраму (WR) клітинної лінії. Така лінія показує стійкість до оксианіонів V^{5+} . Встановлено наявність однакових за розміром RAPD-ампліконів, які диференційно синтезуються з ДНК вихідного калюсу та WR-лінії, що послідовно культивується у присутності летальних доз оксианіонів W^{6+} і V^{5+} . Припущено, що в геномі сої є локуси, підвищена нестабільність яких обумовлена дією різних стресорів.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cullis C.A. The environment as an active generator of adaptive genomic variation // *Plant Adaptations to Stress Environments* / Ed. H.R. Lerner. — New York, 1997. — P. 149–160.
2. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. Изменчивость в процессе дедифференцировки и каллусообразования in vitro // *Биополимеры и клетка*. — 1998. — **14**, № 4. — С. 298.
3. Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // *Theor. Appl. Genet.* — 1981. — **60**. — P. 167–214.
4. Phillips R.L., Kaeppler S.M., Olhoft P. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1994. — **91**. — P. 5222–5226.
5. Сергеева Л.Е. Изучение комплексной устойчивости ванадий- и вольфрамустойчивых клеточных линий табака // *Физиология и биохимия культур растений*. — 2000. — **32**, № 6. — С. 490–493.
6. Ridge I., Omer J., Osborne D.J. Different effects of vanadate on net proton secretion in the fern *Regnellidium diphyllum* and the dicotyledon *Nymphoides peltata*: relevance to cell growth // *J. Plant Physiol.* — 1998. — **153**, № 3/4. — P. 430–436.
7. Deng M., Moureaux T., Caboche M. Tungstate, a molybdate analog inactivating nitrate reductase, deregulates

the expression of the nitrate reductase structural gene // *Plant Physiol.* — 1989. — **91**. — P. 304–309.

8. Тищенко Е.Н., Сергеева Л.Е., Михальская С.И., Данильченко О.А. RAPD-анализ вольфрамустойчивой клеточной линии сои с комплексной толерантностью к осмотическим веществам // *Физиология и биохимия культур растений*. — 2008. — **40**, № 4. — С. 329–337.
9. Тищенко Е.Н., Даскалюк Т.М., Михальская С.И., Марьюшкин В.Ф. Денатурация ДНК при старении створок бобов сои // *Биополимеры и клетка*. — 2004. — **20**, № 5. — С. 410–415.
10. Williams J.G.K., Kubelic A.R., Livak K.J., Rafalski J.F., Tingey S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucl. Acids Res.* — 1990. — **18**. — P. 6531–6535.
11. Weising K., Nybom H., Wolff K., Meyer W. DNA FINGERPRINTING in PLANTS AND FUNGI. — 1995 by CRC Press, Inc. P.323.
12. Noquet C., Avice J.C., Ourry A., Volerec J.J., Cunningham S.M., Boucaud J. Effects of environmental factors and endogenous signals of N uptake/N partitioning and taproot vegetative storage protein accumulation in *Medicago sativa* // *Austr. J. Plant Physiol.* — 2001. — **28**. — P. 279–287.
13. Дубровна О.В. Спектр абераций хромосом в клеточных популяциях калюсных культур кормовых буряков при відборі на стійкість до токсину збудника бактеріозу // *Физиология и биохимия культур растений*. — 2003. — **34**, № 3. — С. 241–247.
14. Гостимский С.А., Кокаева З.Г., Боброва В.К. Использование молекулярных маркеров для анализа генома растений // *Генетика*. — 1999. — **35**, № 11. — С. 1538–1549.
15. Mecchia M.A., Ochogavia A., Selva J.P., Laspina N., Fellitti S., Martelotto L.G., Spangenberg G., Echenique V., Pessino S.C. Genome polymorphisms and gene differential expression in 'back-and-forth' ploidy-altered series of weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*) // *J. Plant Physiol.* — 2007. — **164**, № 8. — С. 1051–1061.
16. Майданюк Д.М., Андреев І.О., Снірідінова К.В., Кунах В.А. Геномна мінливість в культурі in vitro кукурдзи лінії Р346 і отриманих від неї соматональних ліній // *Биополимеры и клетка*. — 2007. — **23**, № 5. — С. 416–424.
17. Linacero R., Freitas A.E., Vazquez A.M. Hot sport of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye // *Theor. Appl. Genet.* — 2000. — **100**. — P. 506–511.
18. Alves E., Ballesteros I., Linacero R., Vazques A.M. RYS1, a foldback transposon, is activated by tissues culture and shows preferential insertion points into the rye genome // *Theor. Appl. Genet.* — 2005. — **111**. — P. 431–436.

Поступила 14.07.08