

DNA to a number of plasmid and chromosomal DNA of microorganisms, representatives of various species and genera.

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

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
Украина, 0302, Киев, ул. Васильковская 31/1, e-mail: oltyko@gmail.com*

НЕСТАБИЛЬНОСТЬ RAPD-АМПЛИКОНОВ СОИ ПРИ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ОКСИАНИОНАМ ВОЛЬФРАМА И ВАНАДИЯ

Генетические аспекты устойчивости/толерантности культурных растений к разнообразным абиотическим факторам имеют важное фундаментальное и прикладное значение. Основными неблагоприятными факторами окружающей среды, оказывающими негативное влияние на процессы развития сельскохозяйственных культур и их продуктивность, являются засуха и засоление. Вместе с тем увеличивающееся в последнее время антропогенное загрязнение окружающей среды токсичными элементами ставит и эту проблему в число приоритетных. Актуальным является получение растительных форм с комплексной устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Один из вопросов комплексной устойчивости связан с генетическим разнообразием в популяциях растений, которое является результатом изменчивости полинуклеотидных последовательностей ДНК и/или пloidности генома. Источником такого разнообразия может быть соматическая изменчивость при культивировании растений *in vitro* [1]. Однако, поиск новых форм с повышенной устойчивостью к комплексу абиотических факторов затруднен при использовании и традиционных, и биотехнологических методов селекции. В связи с чем нами [2] для гарантированного отбора ценных мутаций, возникающих при культивировании *in vitro* тканей растений, предложено направление клеточной селекции, которое заключается в создании моделированных систем *in vitro* с использованием токсичных концентраций ионов тяжелых металлов, которые даже в микроколичествах оказывают многовекторные стрессовые воздействия на растительный организм. Такой подход экспериментально обоснован на примере табака, а именно, получены клеточные линии и растения-регенеранты, обладающие уникальным свойством – комплексной толерантностью к разным типам засоления (хлоридному и хлоридно-сульфатному), водному стрессу и селективному агенту. В качестве последнего представляют интерес оксианионы вольфрама и ванадия, которые оказывают негативное воздействие на процессы дыхания и фосфорилирования в растениях [3]. К тому же, оксианион вольфрама является токсичным аналогом иона молибдена, входящего в состав кофактора нитратредуктазы – ключевого фермента ассимиляции нитрата, чувствительного к различным абиотическим стрессам [4].

Нами получены клеточные линии сои (*Glycine max* L., Merr), устойчивые к токсичным концентрациям вольфрамат-оксианионов. Такие линии показывают устойчивость к ионным и осмотическим стрессорам. Целью данной работы был анализ изменчивости ДНК вольфрамустойчивой клеточной линии (WR-линия) при действии летальных доз ванадатоксианионов.

Материалы и методы

ДНК исходного каллуса, индуцированного из листьев стерильных растений сои (*Glycine max* L., Merr.) сорта Киевская 27 (селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины), и полученной от него WR-линии, культивируемой в

присутствии летальной дозы оксианионов вольфрама или ванадия (по 1мМ), выделяли по модифицированному нами методу Деллапорта [5].

Уровень полиморфизма ДНК анализировали методом RAPD-анализа (Random Amplified Polymorphic DNA), используя 9 декамерных праймеров (табл.). 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 Tag-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. Продукты реакции амплификации разделяли по размеру фрагментов путем электрофореза в 2,0 %- ном агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия в 1хTBE при напряжённости 3-4 в/см в течение 4-6 часов. Для количественной оценки продукты амплификации разной интенсивности 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, учитывая воспроизводимые минорные и мажорные продукты синтеза 2-х биологических повторностей опыта.

Результаты и обсуждения

Исследование клеточных линий, устойчивых к летальным дозам стрессора, значительно расширяет представление об уровне структурно-функциональных изменений генома и позволяет получить информацию о молекулярно-генетических аспектах устойчивости как конечного результата реализации защитных механизмов растительных клеток, индуцируемых в ответ на неблагоприятные факторы окружающей среды.

Методом «плейтинга» получены WR-линии сои. При этом принципиальное значение имел выбор селективирующей (токсичной) концентрации стрессора. Ею считали такую минимальную концентрацию оксианионов вольфрама (1мМ), при которой полностью останавливался рост исходного каллуса и при последующем возврате в нормальные условия жизнедеятельность клеток не восстанавливалась. Если при переносе в нормальные условия пролиферация и рост клеток возобновлялся, то концентрацию этого стрессора постепенно повышали. Полученные клеточные линии в отличие от исходных каллусов выдерживали селективное давление 0,8 М маннита, а также по 1 % солей морской воды либо сульфата натрия, которые при культивировании *in vitro* моделируют условия ионных и осмотических стрессов.

При исследовании WR-линий сои на устойчивость к оксианионам ванадия показано, что они способны выдерживать летальные дозы этого стрессора, равные 1мМ. Помимо интегрального критерия устойчивости клеточных культур - относительного прироста биомассы каллуса для дифференциации неустойчивых и устойчивых клеточных линий использовали один из основных показателей необратимого перехода клеток на путь гибели – фрагментацию ДНК [5]. Показано, что под влиянием выбранной селективной концентрации ионов ванадия в отличие от устойчивых линий суммарная ДНК дикого штамма сои подвергается интенсивной дегградации с образованием непрерывного спектра фрагментов широкого диапазона молекулярных масс, где олигонуклеосомной фрагментации, характерной для программированной клеточной гибели, не наблюдается. Это свидетельствует о том, что токсичные концентрации оксианионов ванадия вызывают гибель клеток сои путем некроза.

Для изучения уровня генетической изменчивости ДНК исходного каллуса и WR-линий, культивируемой на питательных средах с 1мМ оксианионов вольфрама (WR^W)

или ванадия (WR^V), использовали RAPD-метод, позволяющий оценить вариабельность значительного числа локусов, распределенных на протяжении всего генома. Все используемые нами 9 произвольных декамерных праймеров с разной эффективностью обеспечивали синтез определенного набора фрагментов размером $\sim 200 \div 3\ 500$ п.н., количество которых составляло от 4 до 18.

Сравнение спектров амплификации ДНК исходного каллуса и полученной от нее WR-линий показало, что среди 111 синтезированных фрагментов наблюдается разница только для 4-х ампликонов (табл.). В частности, с использованием праймера 5'-GCG CAT TAG A-3' выявлено 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. Индекс подобия и дивергенции составил $0,964$ и $0,036$, соответственно.

Таблица

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

Праймеры	Количество ампликонов		
	Исходный каллус	WR-линия	
		WR^W	WR^V
5'-CTC AGC CCA G-3'	16	16	16
5'-GCG CAT TAG A-3'	14 [1, 1]	12 [0, 0]	14 [1, 1]
5'-GGC TAG GGC A-3'	14[0, 1]	14[1, 0]	12[0, 0]
5'-ATC AAG CTG C-3'	8	8	8
5'-GGT TCC AGC T-3'	16	16	16
5'-CTG AGG CAA A-3'	4	4	4
5'-GAG CCA ACC G-3'	18	18	18
5'-CAC GGC GGG T-3'	13	13	13
5'-GCC ATC AAG A-3'	7	7	7
Всего	110	108	108

Примечание:

в квадратных скобках представлены вариабельные ампликоны, где 1 и 0 означают присутствие и отсутствие фрагмента, соответственно;

При чередовании стрессовых факторов, предполагая, что каждый из них может приводить к нестабильности генома, теоретически можно ожидать следующие варьирования в паттернах ампликонов ДНК исходного каллуса, WR^W и WR^V : 1-0-0, 1-1-0, 1-0-1, 0-1-1, 0-0-1, 0-1-0. Часть фрагментов присутствуют во всех спектрах амплификации (1-1-1). Только полиморфные фрагменты, идентифицированные в ДНК исходного каллуса и длительно культивируемой WR^W -линий, показывали вариабельность в ДНК WR^V . При этом под влиянием токсичных концентраций оксианионов ванадия новых ампликонов не синтезировалось, однако происходило их варьирование. Так, фрагменты размером ~ 1550 и 1350 п.н., которые отсутствовали у WR^W -линии, появлялись у WR^V , а ампликон размером ~ 1700 п.н., который не наблюдался в ДНК исходного каллуса, исчезал в спектре WR^V . Фрагмент размером ~ 500 п.н. был присущ только ДНК исходного каллуса. То есть, при использовании указанных праймеров наблюдали следующие типы изменений в ампликонах: 1-0-0, 1-0-1, 0-1-0. Тот факт, что для 3-х из 4-х полиморфных ампликонов имеет место их появление/ исчезновение (1-0-1, 0-1-0) в спектре WR^V , свидетельствует об

изменчивости полинуклеотидных последовательностей ДНК сои при чередовании летальных доз оксианионов вольфрама и ванадия. Такая реверсия ампликонов позволяет сделать предположение о наличии в геноме сои локусов, повышенная нестабильность которых обусловлена действием различных стрессовых факторов. Не исключено, что помимо ионов W и V определенный вклад вносят и условия культивирования *in vitro*.

Следует отметить, что данные о дифференциальной нестабильности одних и тех же последовательностей в ДНК растений немногочисленны. В частности, генетический полиморфизм установлен при изменении уровня пloidности (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 [6]. Элвис и соавт. [7] предполагают существование в геноме ржи «горячих зон мутагенеза». Преимущественные точки локализации FB-транспозона позволяют частично объяснить этот феномен. Тем не менее механизмы, связанные с нестабильностью конкретных локусов генома растений, не ясны.

Таким образом, идентифицированы RAPD-ампликоны, дифференциально синтезируемые с ДНК WR-линии при чередовании стрессоров – оксианионов W и V. Предположено наличие в геноме сои локусов, повышенная нестабильность которых обусловлена действием различных стрессовых факторов.

Литература

1. Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // Theor. Appl Genet.- 60. – P.167-214.
2. Сергеева Л.Е. Изучение комплексной устойчивости ванадий- и вольфрамустойчивых клеточных линий табака // Физиология и биохимия культ. растений. - 2000.- т.32, №6.- С.490-493.
3. 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.
4. 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.
5. Тищенко Е.Н., Даскалюк Т.М., Михальская С.И. Марьюшкин. Денатурация ДНК при старении створок бобов сои // Біополімери і клітина. – 2004. – 20, №5. – С.410-415.
6. Mecchia M.A., Ochogavia A., Selva J.P., Laspina N., Felitti 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*) // Journal of Plant Physiology. – 2007. – 164, №8. – С.1051-1061.
7. 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.

Резюме

Установлено наличие одних и тех же RAPD-ампликонов, дифференциально синтезируемых с ДНК вольфрамустойчивой клеточной линии сои (*Glycine max* L., Merr.) при действии летальных доз оксианионов вольфрама или ванадия, а также её исходного штамма. Предположено наличие в геноме сои локусов, повышенная нестабильность которых обусловлена действием различных стрессовых факторов.

Встановлено наявність одних і тих RAPD-ампліконів, які диференційно синтезуються з ДНК вольфрам стійкої клітинної лінії сої (*Glycine max* L., Merr.) за дії

летальных доз оксианионів вольфрама або ванадія. Припущена наявність у геномі сої локусів, підвищена нестабільність яких обумовлена дією різних стресових факторів.

Using lethal dose of oxyanions W or V the same RAPD-amplicons that are differentially synthesized from DNAs of tungsten-resistant cell line as well as their wild culture of soybean (*Glycine max* L., Merr.) are shown. The presence of instable loci in genome of soybean under different stressors are under discuss.

ФЕДОРОВА Н.Б., ЧАДОВА Е.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. акад. Лаврентьева, 10, тел.(383)333 2976,

e-mail:bonife@bionet.nsc.ru

МУТАЦИЯ В ОНТОГЕНЕ ДРОЗОФИЛЫ ВЫЗЫВАЕТ ПЕРЕМЕЩЕНИЕ РЕТРОТРАНСПОЗОНА 412

Генетическая нестабильность (ГН) – картина, характерная для ряда явлений: канцерогенеза, гибридного дисгенеза, отдаленных последствий облучения. Несмотря на очевидную общность характера ГН и связь явлений между собой, до сих пор ГН рассматривается в каждой из этих трех областей изолированно. В общем случае под ГН понимают «длительное сохранение отклонений в строении и функционировании генетического аппарата, ДНК - белкового комплекса» [1]. ГН выражается в длительном образовании с высокой частотой точковых мутаций, хромосомных перестроек, канцерогенезе, анеуплоидии, хронической гибели части клеток в культурах *in vitro*.

Механизмы индукции и поддержания ГН дискутируются. В случае облучения причины возникновения ГН связывают с прямым повреждением ДНК и продуктов цитоплазмы. Одной из причин ГН при канцерогенезе предполагается анеуплоидия [2]. Феноменология ГН связана с увеличением транспозиционной активности мобильных генетических элементов (МЭ). Для канцерогенеза это - мобилизация ретровирусных элементов, для гибридного дисгенеза - систем МГЭ типа Р-М и I-R [3]. Облучение тоже является индуктором транспозиционной активности МГЭ. Под действием облучения скорости инсерций увеличиваются более чем на порядок величин [4].

Ранее нами был обнаружен новый класс мутаций – мутации генов, управляющих онтогенезом (онтогены) [5, 6]. Формально генетически это - факультативные доминантные летальные мутации (ФДЛ). Их факультативность (условность) заключается в том, что у особей одного генотипа они проявляют летальное действие, у особей другого генотипа – не проявляют. Перестройки способны снимать летальное действие ФДЛ [7], сохраняя тем самым мутации в популяции. Мутация в онтогене может сохраниться и в том случае, если она возникнет в уже перестроенном геноме. Последующая дестабилизация генома связана с массовыми перемещениями МЭ и феноменологически схожа с картиной дисгенеза.

Материалы и методы

Линии *Drosophila melanogaster*. Для получения мутаций была использованы линии дикого типа - *Berlin wild* и *Barnaul* и изогенная линия 51 с мутацией *radius incompletus, ri* (III; 47сМ). Для ведения в культурах и выявления свойств мутаций использовали линии: 1) *yellow (y)*; 2) *C(1)DX, y w f / Y*; 3) *Muller-5* и 5) *net dp b pr cn/In(2LR)Cy, Cy dp^{lv1} pr Bl cn² L⁴*.

Получение мутаций (ФДЛ). Для получения мутаций в X-хромосоме самцов дрозофилы *Berlin wild* и изогенной линии 51 облучали γ -лучами в дозе 30 Gr. Через три часа их скрещивали с самками *C(1)DX, y w f / Y*, несущими сцепленные X-хромосомы,