

СЕРГЕЕВА Л.Е.<sup>1</sup>, МИХАЛЬСКАЯ С.И.,<sup>1</sup> БРОННИКОВА Л.И.,<sup>1</sup>  
ГАМАЛЕЙ В.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии растений и генетики НАН Украины  
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17; e-mail: Zlenko\_lora@ukr.net

<sup>2</sup>Институт земледелия НААНУ України

Украина, Киевская обл., 08162, пгт Чабаны, ул. Машиностроительная, 2Б

## ДЕЙСТВИЕ ОКСИАНИОНОВ ВОЛЬФРАМА И ВАНАДИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ НИТРАТОВ И РОСТ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР СОИ

Ассимиляция нитратов — это фундаментальный процесс, присущий любому растительному организму, включая тех, которые способны усваивать атмосферный азот используя симбиоз с почвенными микроорганизмами. В усвоении нитратов задействованы как системы их поглощения/переноса, так и редукции. Абсорбция  $\text{NO}_3^-$  осуществляется посредством высокоаффинной транспортной системы (HATS). Она характеризуется субстратной индуцибельностью, а также является мишенью отрицательного обратного ингибирования внутриклеточными соединениями [11, 12]. Абсорбированные клеткой нитраты метаболизируются ферментами цепи усвоения азота. Так непосредственно  $\text{NO}_3^-$  является субстратом нитратредуктазы (НР; К.Ф. 1.6.6.1) катализирующей реакцию  $\text{N}^{5+} \rightarrow \text{N}^{3+}$ . Таким образом, интегральные показатели: рост, продуктивность, качественные параметры зависят от стабильности всего процесса азотного метаболизма.

С другой стороны, установлены факторы, влияющие на отдельные звенья этого процесса. Так хлораты, попадая в клетку вследствие большой химической аналогии с нитратами, становятся субстратом для НР и восстанавливаются в хлорит. Токсичность последнего при достаточно продолжительном воздействии приводит к гибели растения. (Ранее, благодаря такому эффекту, хлораты широко использовались в качестве гербицидов [9]). Анион  $\text{ClO}_3^-$  переносится с помощью того же транспортера, что и  $\text{NO}_3^-$  и выступает лишь слабым неконкурентным ингибитором поглощения нитратов [6, 13]. *In vitro* хлорат постоянно используется для исследования активности НР; с его помощью отобрано большое количество мутантных клеточных линий и растений с низкой активностью НР, дефектных по НР — устойчивых к  $\text{ClO}_3^-$  [5, 8].

Влияют на нитратредуктазную активность и ионы тяжелых металлов (ИТМ), в частности вольфраматы и ванадаты. Так добавление вольфрамата к культуральной среде снижало активность НР и содержание нитратов в листьях сои [10]. Внесение 150 мкМ ванадата в питательный раствор вызвало быстрое снижение активности НР в листьях табака, которая после 24 часов воздействия составляла всего 5% от контроля. Падение активности фермента сопровождалось убылью содержания белка и увеличением уровня нитратов [7].

В наших экспериментах были получены клеточные линии сои (сорта Киевская — 27; КС — 27 №3; КС — 27 №5), устойчивые к летальным для

клеточных культур дикого типа концентрациям вольфрамат-аниона [3]. Данные клоны отличаются стабильным ростом на селективных средах с ионом  $WO_4^{2-}$  более 5 лет. Эти линии демонстрируют также устойчивость к ванадату и хлорату. Поскольку жизнеспособность каллюса обеспечивалась за счёт метаболизма нитратов целесообразно было измерить содержание этого аниона в клетках.

### Материалы и методы

Объектом исследования были клеточные линии сои, отобранные на селективной среде, содержащей ионы вольфрамата в летальной для культуры клеток дикого типа концентрации. До начала эксперимента клоны пассировали в таких стрессовых условиях. Для исследования содержания нитратов каллюс переносили на среду, содержащую летальную дозу  $VO_3^-$ , а также на среду с хлоратом калия. Жизнеспособность клеток оценивали, измеряя относительный прирост их биомассы ( $\Delta m$ ):  $\Delta m = (m_k - m_n) / m_n$ ; где  $m_n$  — масса каллюса в начале пассажа;  $m_k$  — масса каллюса в конце пассажа. Содержание нитратов определяли потенциометрическим методом с помощью ионселективных электродов в водной вытяжке из сырой каллюсной массы [2]. Соотношение растительный материал/вода 1:5.

### Результаты и обсуждение

В таблице приведен относительный прирост биомассы каллюса, растущего на средах, содержащих летальные концентрации токсикантов.

Однако, культуральные среды существенно различались и по азотному составу. Среды с добавками ионов тяжелых металлов содержали только нитратную форму азота, тогда как среда с хлоратом в своем составе имела только аммиачную. Такое сочетание азот/токсикант вызывало гибель контроля (табл.). В тоже время общий летальный исход происходил вследствие противоположных причин. В первом случае, (в присутствии ионов вольфрама и ванадия) причина гибели клеточной культуры дикого типа заключалась в разрыве цепи усвоения азота — реакции на прямое воздействие анионов на НР. Полная инактивация фермента останавливала процесс редукции нитратов, что, в свою очередь, приводило к исчерпанию азотного пула, необходимого для синтеза белков и пролиферации клеток. На это

*Таблица*

**Относительный прирост биомассы ( $\Delta m^*$ ) клеточных культур сои при культивировании в различных стрессовых условиях**

Среда линия	$\Delta m^*$			
	$B_5$	$B_5 + VO_3^-$	$B_5 + WO_4^{2-}$	$B_5 + ClO_3^-$
КС-27 №3	0,200±0,040	0,850±0,090	0,810±0,060	2,96±0,880
КС-27 №5	0,680±0,130	0,590±0,190	0,990±0,070	1,705±0,001
Контроль	0,480±0,190	-	-	-

\* Примечание:  $B_5$  — контрольная среда;  $B_5 + VO_3^-$  — среда  $B_5$  с добавлением 1 мМ ( $V^{5+}$ );  $B_5 + WO_4^{2-}$  — среда  $B_5$  с добавлением 1 мМ ( $W^{6+}$ );  $B_5 + ClO_3^-$  — среда  $B_5$  с добавлением 1 мМ 20 мМ хлората калия.

указывают и другие авторы [3, 7]. При добавлении хлората гибель клеточной культуры контроля была обусловлена внутриклеточным накоплением хлорита, а не дефицитом азота, поскольку селективная среда содержала только аммиачную форму азота. Нормальное функционирование НР способствовало росту уровня эндогенного хлорита вплоть до летальной концентрации.

Рост устойчивых клеточных линий сои на селективных средах, содержащих нитратную форму азота и анионы вольфрамата либо ванадата, свидетельствует об активной ассимиляции азота. Этот процесс сохраняется в течении всего пассажа, что прослеживается по динамике изменений уровня белка [4]. Данное событие является прямым следствием функционирования НР. Данные гистограммы свидетельствуют о поглощении нитратов.

Видно, что содержание нитратов в клетках устойчивых линий сои при культивировании в стрессовых условиях увеличивается. При этом уровень нитратов в клетках, растущих на средах с добавлением  $\text{VO}_3^-$  выше, чем в клетках, культивируемых в условиях действия  $\text{WO}_4^{2-}$ . Повышенное содержание нитратов при стрессе может выступать защитной реакцией [1]. Это также полностью коррелирует с динамикой синтеза белка.

Такое высокое (относительно показателей, измеренных на контрольной среде) значение уровня  $\text{NO}_3^-$  может указывать на то, что у отобранных клеточных линий сои ионы  $\text{WO}_4^{2-}$  и  $\text{VO}_3^-$  стимулируют транспорт нитратов, делая их более доступными для последующей редукции ферментом — “модифицированной” нитратредуктазой.

В пользу гипотезы о появлении такой нитратредуктазы свидетельствуют два аргумента. Во-первых, активное восстановление нитратов в условиях, которые вызывают инактивацию “обычного” фермента и гибель организма дикого типа (культивирование в присутствии вольфрамат- и ванадат-анионов). Во-вторых, рост клеточных линий на среде с хлоратом. Последнее возможно в случае отсутствия (низкой концентрации) хлорита, вследствие

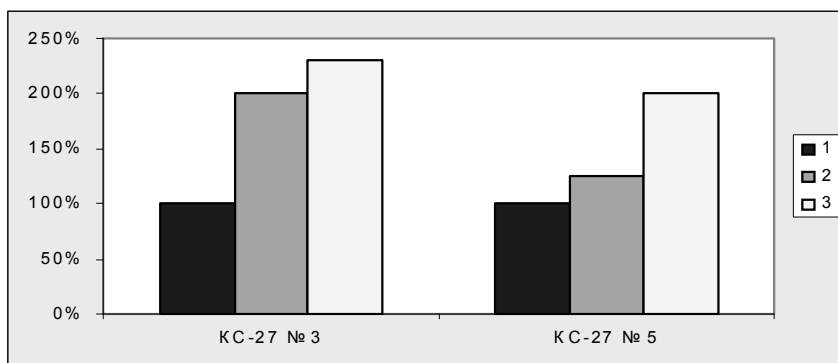


Рис. Содержание нитратов (в % к контролю) в клетках устойчивых линий сои, при культивировании в стрессовых условиях: 1 — контрольная среда; 2 — среда с добавлением  $\text{WO}_4^{2-}$ ; 3 — среда с добавлением  $\text{VO}_3^-$

более высокой субстратной специфичности новой модификации НР. Не исключена также возможность быстрой детоксикации хлорита, вследствие его разложения. Это событие, однако, менее вероятно, поскольку концентрация хлорита все время возрастает.

Возможно, также существование нескольких изоформ фермента, функционирующих в зависимости от культуральной среды. О вероятности реализации такого события указывают и другие авторы [14].

### **Выводы**

1. Клеточные линии сои, устойчивые к ионам  $\text{VO}_3^-$   $\text{WO}_4^{2-}$ , при культивировании на селективных средах с ионами тяжелых металлов накапливают нитраты в количествах в 1,25–2,3 раза больше чем при культивировании в нормальных условиях, что может выступать защитной реакцией на стрессовое воздействие, создаваемое средой.

2. Уровень нитратов в клетках при культивировании на средах с ванадатом выше, чем при культивировании на средах с вольфрамом.

3. Уровень накопления нитратов коррелирует с динамикой синтеза белка клетками, выращиваемыми в условиях стресса, создаваемого ионами тяжелых металлов.

### **Литература**

1. Львов Н.П. Молибден в ассимиляции азота у растений и микроорганизмов.— М. “Наука”, 1989.— 86 с.

2. Плеваков Б.П. Практикум по биохимии растений.— М.: Колос, 1985.— 255 с.

3. Сергеева Л.С., Михальська С.І. Дія оксианіонів вольфраму та ванадію на клітинні лінії тютюну і сої // Приемы повышения урожайности растений: от продуктивности фотосинтеза к современным биотехнологиям. Сб.тр.межд. научно-практ. конференции памяти проф. С.И. Лебедева.— Киев: НАУ, 2003.— С. 167–169.

4. Тищенко Е.Н., Михальская С.И., Сергеева Л.Е. RAPD — анализ клеточной линии сои с перекрестной устойчивостью к оксианионам вольфрама и ванадия // Цитология и генетика. 2009.— Т.43, №4.— С. 39–44.

5. Buchanan R.J., Wray J.L. Isolation of molybdenum cofactor defective cell lines of *Nicotiana tabacum* // MGG.— 1982.— P. 228–2348.

6. Deane — Drummond C.E., Glass A.D.M. Nitrate uptake into barley (*Hordeum vulgare*) plants. A new approach using  $^{36}\text{ClO}_3^-$  as an analogue for  $\text{NO}_3^-$  // Plant Physiology.— 1982.— 70.— P. 50–54.

7. Deng M., Moureaux T., Caboche M. Tungstate a molybdate analog inactivating nitrate reductase, deregulates the expression of the nitrate reductase structural gene // Plant Physiology.— 1989.— P. 304–309.

8. Evola S.V. Chlorate-resistant variants of *Nicotiana tabacum* L. I. Selection *in vitro* and phenotypic characterization of cell lines and regenerated plants // MGG.— 1983.— 189.— P. 447–454.

9. Guy M., Zabala G., Filner P. The kinetics of chlorate uptake by XD tobacco cells // Plant Physiology.— 1988.— 86.— P. 817–821.

10. Harper I.E., Nicholas I.C. Nitrogen metabolism of soybean // Plant Physiology.— 1978.— 62.— P. 662–664.

11. Lee R.B., Rudge K.A. Effects of nitrogen deficiency on the absorption of nitrate and ammonium by barley plants // Ann. Botany.— 1986.— 57.— P. 471–486.

12. *Siddigi M.Y., Glass A.D.M., Ruth T.I., Fernando M.* Studies of the regulation of nitrate in barley. I. Kinetics of  $^{13}\text{NO}_3^-$  influx // *Plant Physiology*.— 1989.— 93.— P. 1426–1432.
13. *Siddigi M.Y., King B.I., Glass A.D.M.* Effects of nitrite, chlorate, and chlorite on nitrate uptake and nitrate reductase activity // *Plant Physiology*. 1992.— 100.— P. 644–650.
14. *Wu S., Win Lu, Kris A.L., Harper J.E* Identification of DNA clones corresponding to two inducible nitrate reductase genes in soybean: analysis in wild type and nr 1 mutant // *Plant Mol. Biol.*— 1995.— 29.— P. 491–506.

### Резюме

Исследовали клеточные линии сои, отобранные на селективной среде, содержащей ионы  $\text{WO}_4^{2-}$  в летальной для обычной клеточной культуры концентрации. Клеточные линии росли также в присутствии летальных доз  $\text{VO}_3^-$  и  $\text{ClO}_3^-$ . Содержание нитратов в клетках возрастало при культивировании на средах с анионами тяжелых металлов. Максимальный уровень отмечен при культивировании клеточных линий на среде с добавлением  $\text{VO}_3^-$ . Уровень нитратов коррелировал с содержанием белка.

Досліджували клітинні лінії сої, відібрані на селективному середовищі, яке містило іони  $\text{WO}_4^{2-}$  у летальній для звичайної клітинної культури концентрації. Клітинні лінії росли також в присутності летальних доз  $\text{VO}_3^-$  і  $\text{ClO}_3^-$ . Вміст нітратів у клітинах зростає під час культивування на середовищах з аніонами важких металів. Максимальний рівень відзначено при культивуванні клітинних ліній на середовищі із додаванням  $\text{VO}_3^-$ . Рівень нітратів корелював із вмістом білка.

The soybean cell lines selected on medium with the lethal to ordinary cell cultivars concentration of the  $\text{WO}_4^{2-}$  ions, there were investigated. Cell lines grew at presence of lethal doses of  $\text{VO}_3^-$  and  $\text{ClO}_3^-$  ions too. The intracellular nitrates contents increased during cultivation under heavy metal-anions pressure. The top level was marked in cell lines during their cultivation on medium with the addition of  $\text{VO}_3^-$ . The level of nitrates correlates with the protein contents.

**АДАМЧУК-ЧАЛАЯ Н.И.<sup>1</sup>, ТИТОВА Л.В.<sup>2</sup>, ИУТИНСКАЯ Г.А.<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины,  
Украина, 01601, Киев, ул. Терещенковская, 2, e-mail: m\_nv@mail.ru*

*<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
Украина, Д03680, Киев, ГСП, ул. Заболотного, 154, e-mail: cenoza@serv.imv.kiev.ua*

### **ОСОБЕННОСТИ МИКРОБНОГО ПЕЙЗАЖА РИЗОСФЕРЫ СОИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ**

Одной из наиболее актуальных в почвенной и сельскохозяйственной микробиологии является проблема микробно-растительных взаимоотношений. Важный аспект этой проблемы — колонизация почвенными микроорганизмами поверхности корня и почвы прикорневой зоны. Корни в почве окружены плотно прилегающими минеральными частицами и почвенными коллоидами. В таком субстрате микрофлора организована пространственно-градиентно (Buckley et al., 2003; Hinsinger et al., 2005; Watt et al., 2006). Непосредственно на корнях обитают микроорганизмы, которые существуют в градиенте корневых выделений. Концентрированный максимум такого градиента приходится на поверхность корней и резко падает по мере удаления от корня. Падение градиента вызвано диффузией корневых выделений в рыхло-непрерывный субстрат, которым и является почва, а также непрерывным поглощением доступных органических веществ всей почвенной микробиотой. Следствием такой пространственной организации растения в субстрате является организация субстратной микрофлоры (Buckley et al., 2003; Whalley et al., 2005). Выделяют такие зоны распределения: непосредственно на корнях — ризоплана, в первых миллиметрах от корней — прикорневая, несколько далее — ризосфера. В свою очередь, на корнях микроорганизмы тоже располагаются по градиенту концентраций питательных веществ и фитонцидов. Принципиально такая же организация системы растения-субстрат имеет место и в других ареалах обитания (иле водоёмов, прибрежном песке и т.д.) (Young et al., 1998; Greaver et al., 2007). Проблема возникает при изучении самой биологии сосуществования микроорганизмов с растением. Термин «ризосфера» несёт совершенно чётко определённую смысловую нагрузку, неразрывно связанную с экологией растений (Hinsinger et al., 2005; Whalley et al., 2005). Ассоциированные с растением микробные сообщества являются живыми системами, которые подвергаются влиянию внешних факторов, что ведёт как к качественным, так и количественным изменениям в сообществе микроорганизмов. В природных условиях такие самоорганизующиеся микробные ценозы функционируют успешно (хотя познанию их и попыткам управления ими уделяют очень большое внимание) (El-Shatnawi et al., 2001; Gregory, 2006). Мониторинг микроорганизмов в их естественной среде обитания необходим для лучшего понимания микробных экосистем и стратегий их выживания, что важно, в том числе, и для оценки