

УДК 573.6.086.83

ИОНЫ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ *IN VITRO*: НОВЫЕ ИДЕОЛОГИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЁННЫХ ФОРМ РАСТЕНИЙ

Л.Е. Сергеева, Л.И. Бронникова

Киев, Украина, Zlenko_lora@ukr.net

Генетические изменения организма являются причиной проявления его особых свойств. При этом изменения могут затрагивать весь организм либо отдельно взятый участок метаболизма. Для получения генетически изменённых форм растений была предложена концепция использования ионов тяжёлых металлов в клеточной селекции. Целью настоящей работы было создание селективных систем, содержащих летальные дозы ионов Ba^{2+} , Cd^{2+} , WO_4^{2-} , VO_3^- , для отбора устойчивых клеточных линий. Катионы Ba^{2+} и Cd^{2+} использовали для выделения форм с повышенным уровнем устойчивости к осмотическим стрессам; анионы WO_4^{2-} , VO_3^- добавляли с целью получения вариантов со стрессоустойчивым полным циклом метаболизма азота. Методом клеточной селекции получены растущие культуры табака, сои, пшеницы. Частота отбора вариантов соответствовала 10^{-6} . Устойчивые к выбранным катионам линии развивались в условиях прямого действия засоления или водного стресса. Устойчивые к вольфрамату или ванадату линии при культивировании в стрессовых условиях увеличивали биомассу за счёт метаболизма нитратов. Клеточная селекция с ионами тяжёлых металлов обеспечивает отбор вариантов с различными генетическими изменениями. Метод может быть использован для манипуляций с клеточными культурами других видов растений.

Ключевые слова: клеточная селекция; стрессоустойчивость; катионы Ba^{2+} , Cd^{2+} ; анионы WO_4^{2-} , VO_3^-

Растения могут адаптировать свою программу развития соответственно окружающим условиям. При этом организмы с повышенным уровнем устойчивости должны иметь особый уровень взаимосвязей, координирующих различные типы реакций на стресс. Очевидно, что в основе реализации этого феномена лежат генетические причины. Выделение и изучение генетически изменённых вариантов может предоставить фундаментальную информацию о жизнедеятельности организма, а также существенно обогатит видовое разнообразие природного фонда.

Для получения форм растений с повышенным уровнем стрессоустойчивости успешно используют новые биотехнологические подходы. Однако наряду с безусловными достижениями существуют (и всегда будут существовать) проблемные вопросы, требующие постоянного внимания, а нередко – новых идеологий для решения проблемы.

Система *in vitro* является комплексным фактором, влияющим на генетическую программу растений. Получение клеточных культур (дедифференциация) из различных частей растения, манипуляции с ними могут служить базисом для последующего отбора вариантов с качественно новыми показателями.

Адекватным методом получения форм с изменёнными характеристиками является клеточная селекция. Были получены ауксотрофные мутанты, суперпродуценты некоторых веществ, стрессоустойчивые клеточные линии [Maliga, 1984]. Как правило, при отборе используют одно селективное соединение (фактор). Однако недостаточное давление создаёт предпосылки для появления культур-адаптантов, регенеранты из которых не имеют желаемой характеристики.

Абиотические стрессы провоцируют комплекс взаимосвязанных реакций, протекающих одновременно или поочередно. Поэтому для первичной селекции целесообразно задействовать агент, оказывающий как общее патологическое давление, так и специфическое воздействие. Если стрессовый фактор отличается высокой токсичностью в относительно малых количествах и вызывает существенные нарушения в клетке, клеточная селекция может стать приоритетным методом получения новых форм растений. Этому условию отвечают ионы тяжёлых металлов (ИТМ), токсичные в следовых количествах, которые считаются физиологически бесполезными. При этом ИТМ могут воздействовать как в форме катионов, так и анионов [Nies, 1999].

Нами была предложена гипотеза использования ИТМ в клеточной селекции для отбора форм с комплексной устойчивостью. Для установления корректности и системности подхода использовали катионы (Ba^{2+} , Cd^{2+}) и анионы (VO_3^- , WO_4^{2-}). Если ион Cd^{2+} всесторонне изучается, то Ba^{2+} малоисследован; к анионам VO_3^- , WO_4^{2-} проявляют интерес в исключительных случаях. Ионы в клеточной селекции прежде не использовали.

Катионы Ba^{2+} , Cd^{2+} применяли для отбора клеточных культур с повышенным уровнем устойчивости к осмотическим стрессам. Установлено, что Ba^{2+} влияет на перемещение ионов K^+ . Поскольку одним из главных отрицательных аспектов солевого стресса является критическая потеря K^+ , то Ba^{2+} использовали при селекции солеустойчивых вариантов. Cd^{2+} воздействует на водный статус, поэтому с его участием выделяли варианты, устойчивые к водному стрессу. На селективных средах, содержащих летальные для клеточных культур дозы ионов Ba^{2+} и Cd^{2+} , были получены клеточные линии табака, сои, пшеницы.

Plant Protection News, 2016, 3(89), p. 152–153

Отобранные культуры росли в присутствии летального засоления (соли морской воды) либо водного стресса (маннит).

Анионы VO_3^- , WO_4^{2-} были выбраны, исходя из их воздействия на нитратредуктазу, НР (К.Ф. 1.6.6.1) [Львов, 1989]. НР – это кодируемый ядерными генами гомодимер, катализирующий восстановление нитратов в нитриты. Анионы VO_3^- , WO_4^{2-} ингибируют НР, однако механизмы репрессии различны. Используя предложенную методику, на селективных средах получены растущие клеточные линии. Увеличение биомассы в присутствии ингибиторов происходило за счёт усвоения нитратов как единственной формы азота.

Частота отбора устойчивых вариантов не превышала 10^{-6} , что свидетельствует в пользу генетических изменений. Желаемый показатель сохранялся у устойчивых линий при произвольной смене условий выращивания. Метод может быть использован для манипуляций с клеточными культурами других видов растений.

HEAVY METAL IONS IN VITRO: NEW IDEAS FOR OBTAINING GENETICALLY CHANGED PLANT FORMS

L.E. Sergeeva, L.I. Bronnikova

Zlenko_lora@ukr.net

The organism peculiar features depend on genetic changes. Such changes can involve entire organism or separate chain of the metabolism. There was proposed the idea of using the cell selection with heavy metal ions for obtaining genetically changed plant forms. The creation of selective systems with lethal doses of Ba^{2+} , Cd^{2+} , WO_4^{2-} , VO_3^- ions was the object of the investigation. Ba^{2+} and Cd^{2+} cations were drawn for obtaining forms with high level tolerance to osmotic stresses. WO_4^{2-} and VO_3^- oxyanions were added for obtaining variants with stable nitrogen metabolism under anion pressure. The resistant cell cultivars of tobacco, soybean, wheat were collected via cell selection. The appearance quantity was 10^{-6} . Ba^{2+} -resistant and Cd^{2+} -resistant lines challenged salinity and water stress. The biomass accumulation of WO_4^{2-} and VO_3^- -resistant lines cultivated under stress conditions was the result of the nitrate metabolism. Cell selection with heavy metal ions ensure the obtaining genetically changed variants. The method can be used for manipulation with other plant cell cultivars.