

ВИВЧЕННЯ КОМПЛЕКСНОЇ СТІЙКОСТІ ВАНАДІЙ (VO_3^-) ТА ВОЛЬФРАМ (WO_4^{2-}) СТІЙКИХ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ ТЮТЮНУ

Лариса БРОННІКОВА^{1,2}, Ірина ЗАЙЦЕВА¹

Іони важких металів спричиняють комплексну дію на живі організми. Стійкість до них повинна викликати істотні зміни, які обов'язково мають бути генетично зумовленими. Здійснюючи відбір стійких клітинних варіантів, тобто таких клітин, котрі відзначаються стабільним ростом у присутності постійної дії стресового фактора, необхідно досліджувати причину стійкості. Очевидно, що крос-стійкість можлива за умов поєднання генетичних та епігенетичних змін. Це особливо доцільно враховувати, оскільки епігенетичні зміни викликаються механізмами, які звичайно працюють у разі клітинної диференціації. Дослідження клітинних ліній, стійких до ІВМ, показало, що культура клітин загалом та клітинна селекція зокрема не вичерпали своїх потенційних можливостей. Як метод вивчення фундаментальних механізмів роботи клітини за нормальних умов та за умов стресу її складно перевершити. Як спосіб отримання стійких рослин вона є перспективним біотехнологічним підходом. Як ідеологія дослідження вона спрямована на поширення екологічної безпеки у експериментальній і виробничій діяльності. Ванадій- та вольфрам стійкі клітинні лінії тютюну культивували на селективних середовищах, що мають токсичну концентрацію альтернативних оксидантів. Відібрані в результаті клітинної селекції клони володіли комплексною стійкістю до вольфрамату та ванадату. Стійкість клітин пов'язана з відбором стійких, можливо ванадій залежної нітратредуктази (NR).

Ключові слова: тютюн, клітинні лінії, стійкість, ванадій, вольфрам, нітратредуктаза (NR).

¹Кафедра фізіології та інтродукції рослин, Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, проспект Науки, 72, Дніпро, 49010, Україна;

²Відділ генетичної інженерії, Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022, Україна; e-mail: Zlenko_lora@ukr.net, Zlenkolora@gmail.com; irinza.ldfr@gmail.com

Reversal of complex vanadium (VO_3^-) and tungsten (WO_4^{2-}) resistance in tobacco cell lines. Bronnikova L.^{1,2}, Zaitseva I.¹

Heavy metal ions have a complex effect on living organisms. Resistance to them should cause significant changes that must be genetically determined. When selecting resistant cellular variants, cells that are characterised by stable growth in the presence of a constant stress factor, it is necessary to investigate the cause of resistance. Obviously, cross-resistance is possible when genetic and epigenetic changes are combined. This is particularly relevant because epigenetic changes are caused by mechanisms that normally operate during cellular differentiation. The study of cell lines resistant to PMI has shown that cell culture in general and cell selection in particular has not exhausted its potential. As a method of studying the fundamental mechanisms of cell functioning under normal and stress conditions, it is difficult to surpass. As a way to produce resistant plants, it is a promising biotechnological approach. As a research ideology, it is aimed at promoting environmental safety in experimental and production activities. Vanadium- and tungsten-resistant tobacco cell lines were cultured on selective media containing toxic concentrations of alternative oxyanions. The clones selected as a result of cellular selection possessed complex resistance to tungstate and vanadate. The resistance of the cells is associated with the selection of resistant cells, possibly by vanadium-dependent nitrate reductase (NR).

Key words: tobacco, cell lines, resistance, vanadium, tungsten, nitrate reductase (NR).

¹Department of Plant Physiology and Introduction, Oles Honchar Dnipro National University, 72, Nauky Avenue, Dnipro, 49010, Ukraine;

²Department of Genetic Engineering, Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, 31/17, Vasylkivska Str., Kyiv, 03022, Ukraine; e-mail: Zlenko_lora@ukr.net, Zlenkolora@gmail.com; irinza.ldfr@gmail.com

Вступ

Біологічна дія деяких хімічних речовин, навіть окремих іонів, може мати схожість. Разом із тим часто вплив конкретного іону буває специфічним та особливо вираженим. Наприклад, під час вивчення проблеми солестійкості постало питання про первинність стресового впливу засолення, тобто того, що є причиною патогенезу: осмотичний тиск, що створений середовищем, або вплив окремого іону (аніону) – компонента засолення (Aihemaiti et al. 2020; Harja et al. 2018; Sinh et al. 1993). Вивчається також адаптація солестійкості рослин до альтернативних іонів (Angulo-Bezaran et al. 2021; Pasternak et al. 2024; Sergeeva et al. 2019).

Дія окремих аніонів на біологічні об'єкти ще дуже мало вивчена. Останнім часом з'являються публікації, присвячені дослідженню впливу деяких оксианіонів на ферменти, в тому числі нітратредуктази (НР) (Angulo-Bezaran et al. 2021; Pasternak et al. 2024). Інтерес до цієї проблеми пов'язаний з тим, що в результаті досліджень виявляються модифікації ферменту, який відрізняється стійкістю до стресових факторів (Koyama et al. 2020; Sergeeva et al. 2019). Низка авторів повідомляють про мутації ціанобактерії *Nostoc muscorum* з унікальними характеристиками НР (El-Fayoumy et al. 2023; Fu et al. 2018; Sergeeva et al. 2019).

Нітратредуктаза (НР) у вищих рослин це кодований ядерними генами гомодимер, каталізує відновлення нітратів у нітрити. Ферментний комплекс НР складається з двох частин, що послідовно беруть участь у переносі електронів від НАД(Ф)Н до нітрату. Це діафоразна частина, яка містить ФАД і каталізує переніс електронів від НАД(Ф)Н до цитохрому *c* або іншим акцепторам. І термінальна (редуктазна) частина, яка містить молібден і переносить електрони на нітрат. Частини суттєво відрізняються. Діафоразний комплекс піддається впливу ІВМ, сульфгідрильних груп, термолабільний. Термінальна частина чутлива до осмотичних стресів та окислювально-відновних перетворень. Для перевірки запропонованого припущення було створено модельну селективну систему, яка містила летальні дози VO_3^- або WO_4^{2-} . Шестивалентний вольфрам (у складі вольфрамат-аніону) є аналогом молібдену і здатен замінювати останній у складі кофактору ферменту нітратредуктази. Всі вольфрам-місткі ферменти, за винятком форміатдегідрогенази деяких анаеробів, неактивні.

Вивченням механізмів стійкості нітратредуктази рослин до різних стресових чинників займа-

лися багато науковців (Balasubraniam et al. 2023; Berger et al. 2020; Nao et al. 2023).

Мета цієї роботи – дослідити ріст клітинних ліній *Nicotiana tabacum* L. ванадій (V^{3-}) та вольфрам (W^{2-}) клітинних варіантів на селективних середовищах, що містять токсичну концентрацію альтернативного оксианіону.

Методика та матеріали

Об'єктом дослідження були стійкі до вольфраму та ванадію клітинні лінії тютюну *Nicotiana tabacum* L. сорту Дюбек та Самсун. Ці лінії були відібрані на селективних середовищах, що містять токсичні концентрації. В досліді вивчали ріст стійких ліній на середовищі з іншим оксианіоном.

Використані в досліді селективні середовища являють собою модифікацію середовища В5 Гамборга (Gamborg et al. 1968) з додаванням регуляторів росту та ванадат- або вольфрамат-іону. Модифікація живильного середовища складалась з додавання азоту тільки у формі нітратів (Maliga 2003; Morkunas et al. 2018; Ochoa-Villarreal et al. 2016; Pasternak et al. 2024).

Ванадій стійкі клітинні лінії вирощувались на середовищах, що містили 0,63мМ ванадату або 1,0мМ вольфрамат натрію, W-стійкі – на середовищах, що містили 1,25 або 1,5мМ тих же сполук.

Ріст стійких клітинних ліній оцінювали, вимірюючи відносний приріст маси сирової речовини: (тк – тп)/тп; де тп – маса калюсу, фіксована під час переміщення на свіже середовище; тк – маса культури в кінці пасажу. Контролем слугував калюс дикого типу, який був вирощений на контрольному середовищі. Досліди проводились у чотирикратній повторності.

Згідно із запропонованою методикою одержано стійкі до вольфрамат-іонів клітинні лінії тютюну. Ці клітинні варіанти культивували на середовищі з нітратною формою азоту та вольфрамат-аніоном одночасно. Присутність WO_4^{2-} у такій селективній системі інактивує звичайну НР і тим самим повністю порушує загальний ланцюг засвоєння азоту. Ріст клітинної культури за таких умов свідчить на користь отримання нової функціонуючої (стрес-стійкої) модифікації НР (Ochoa-Villarreal et al. 2016; Pasternak et al. 2024; Sergeeva 2017).

Для перевірки цього припущення стійкі клітинні лінії були перенесені в умову дії іншого інгібітору нітратредуктази – ванадату (VO_3^-). Ванадат пригнічує активність ферменту, не вбудовуючись. W-СКЛ виявились стійкими до ванадату також, що спостерігалось зі збільшення відносного приросту сирової біомаси (табл. 1, 2).

Результати та обговорення

Стійкі клітинні лінії тютюну до V та W у разі перенесення їх на селективне середовище зберігали свою життєдіяльність та ріст. Оскільки ріст калюсу на селективних середовищах прямо залежав від використання нітратів, то можна стверджувати, що активність нітратредуктази (НР) зберігається в присутності обох аніонів. Однак чутливість стійких клонів до конкретного оксіаніону неоднакова. Відносний приріст маси сирової речовини калюсу у всіх V-стійких клітинних ліній (табл. 1) знижувався у разі перенесення на середовище з вольфрамом. Оскільки вольфрам (W^{2+}) відомий як інгібітор ферментативних процесів (Мо-ферментів), то зменшення приросту видається закономірним (Aihemaiti et al. 2020; He et al. 2018; Kaufholdt et al. 2017). Однак збереження росту свідчить на користь припущення, що одночасно зі звичайною Мо-залежною нітратредуктазою (інгібований вольфрамом) у калюсних клітинах функціонує Мо-незалежний фермент з нітратною активністю. Сінґх зі співавторами повідомляв про наявність ванадієвої нітратредуктази у мутанту ціанобактерії *Nostoc muscorum* (Lohani et al. 2022; Macário et al. 2022; Sergeeva 2017).

Таблиця 1. Відносний приріст маси сирової речовини калюсу у ванадій стійких клітинних ліній за стресових умов

Table 1. Relative increase in dry matter mass of callus in vanadium resistant cell lines under stress conditions

Лінія	Середовище		
	Контроль B5	B5+0,63 мМ V	B5+1,0 мМ W
Контроль	5,44±0,49	Не ріс	Не ріс
СКЛ № 1	3,69±0,42	7,00±0,55	5,00±2,63
СКЛ № 3	4,75±0,57	4,75±1,03	1,85±0,80
СКЛ № 4	3,09±0,11	2,10±0,33	2,03±1,00

*Примітка: середовище містило тільки нітратну форму азоту.

Аналогічна ситуація складалась у разі культивування V-СКЛ. У цьому випадку стійкість проявлялась навіть у разі сумісної дії двох альтернативних чинників (табл. 2).

Таблиця 2. Відносний приріст сирової маси калюсу для ванадій стійких клітинних ліній за стресових умов

Table 2. Relative increase in callus dry mass for vanadium resistant cell lines under stress conditions

Лінія	Середовище		
	Контроль B5	B5+1,25 мМ V	B5+1,5 мМ W
Контроль	6,68±1,18	Не ріс	Не ріс
СКЛ № 1	7,11±0,46	2,41±0,30	2,14±0,51
СКЛ № 2	1,96±0,11	3,53±1,44	0,26±0,11
СКЛ № 4	6,30±0,29	1,98±0,44	2,53±0,96

*Примітка: середовище містило тільки нітратну форму азоту.

Оскільки застосовані аніони-інгібітори мають різний механізм шкодочинної дії на звичайну НР (впливають на різні частини ферментного комплексу), зрозуміло, чому активність відносного приросту біомаси залежала від типу чинника. Важливішим є той факт, що стійкість клітинної культури не залежала від іону, в присутності якого велась первинна селекція. Імовірно, що в результаті селекції відбирались варіанти НР зі змінами в ділянках молекули ферменту, які об'єднують частини НР або координують їх індивідуальні функції. Оскільки активність звичайної НР стимулюється доступністю нітратів, визначали їх вміст у клітинах СКЛ.

Ріст калюсу на поживних середовищах, що містила токсичну концентрацію вольфраму, є вагомим аргументом на користь наявності в клітинах стійкої нітратредуктази. Однак активність цього ферменту може як стимулюватись ванадієм (СКЛ № 2), так і не стимулюватись (у СКЛ № 1 та СКЛ № 4) (табл. 2). Інше можливе пояснення варіабельності росту вольфрам стійких ліній тютюну у разі культивування на середовищі з ванадат-оксіаніоном – порушення ферментної системи поглинання нітратів. Але це може стосуватись лише СКЛ № 4, оскільки вольфрам, як відомо, на поглинання нітратів не впливає. Не виключені інші фактори, які впливають на ріст, які не пов'язані з нітратредуктазною активністю.

У разі культивування за стресових умов у клітинах СКЛ відбувається редукція нітратів. Однак поряд із цим визначальним, незалежним від типу стресового чинника, процесом здійснюються реакції, які підпорядковуються дії стресора та регулюють (адаптують) азотний метаболізм. Очевидно, що в результаті первинної селекції вольфрамат-аніони забезпечують відбір не тільки стрес-стійкої НР, але цілої низки ферментів.

Доказом цього може бути ріст клітинних ліній у присутності хлорату калію. Звичайно, цю речовину використовують для отримання форм із неактивною НР (Fu et al. 2018; Kaufholdt et al. 2017; Maliga 2003). Оскільки перенесення хлорату та нітрату в клітину здійснюється за участю спільних транспортерів, а редукція аніонів NO_3^- і ClO_3^- каталізується НР, можна припустити, що токсичний продукт реакції $ClO_3^- \rightarrow ClO_2^-$ швидко детоксикується в результаті подальших перетворень.

Іони важких металів спричиняють комплексну дію на живі організми. Стійкість до них повинна викликати істотні зміни, які обов'язково мають бути генетично зумовленими. Здійснюючи відбір стійких клітинних варіантів, тобто таких клітин,

котрі відзначаються стабільним ростом у присутності постійної дії стресового фактора, необхідно досліджувати причину стійкості. Очевидно, що крос-стійкість можлива за умов поєднання генетичних та епігенетичних змін. Це особливо доцільно враховувати, оскільки епігенетичні зміни викликаються механізмами, які звичайно працюють у разі клітинної диференціації (Aihemaiti et al. 2020; Angulo-Bezaranano et al. 2021; El-Fayoumy et al. 2023; Zhang et al. 2023; Sergeeva et al. 2019).

Висновки

Таким чином, встановлено, що ванадій- та вольфрам стійкі клітинні лінії мають стійкість до токсичної концентрації альтернативного оксіані-

ону. Методами клітинної селекції можна відібрати клітинні лінії, саме ті, що володіють комплексною стійкістю до вольфрамат- та ванадат-оксіаніонів. Дослідження клітинних ліній, стійких до ІВМ, показало, що культура клітин загалом та клітинна селекція зокрема не вичерпали своїх потенційних можливостей. Як метод вивчення фундаментальних механізмів роботи клітини за нормальних умов та за умов стресу її складно перевершити. Як спосіб отримання стійких рослин вона є перспективним біотехнологічним підходом. Як ідеологія дослідження вона спрямована на поширення екологічної безпеки у експериментальній і виробничій діяльності.

- AIHEMAITI, A., GAO, Y., MENG, Y., CHEN, X., LIU, J., XIANG, H., XU, Y., JIANG, J. (2020) Review of plant-vanadium physiological interactions, bioaccumulation, and bioremediation of vanadium-contaminated sites. *Science of the Total Environment*, 712, 135637. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135637.
- ANGULO-BEZARANO, P.I., PUENTE-RIVERA, J., CRUZ-ORTEZA, R. (2021) Metal and metalloid toxicity in plants: an overview on molecular aspects. *Planta*, 10(4), 635. DOI: 10.3390/plants/0040635.
- BALASUBRAMIAM, T., SHEN, G., ESMAEILI, N., ZHANG, H. (2023) Plants' response mechanisms to salinity stress. *Plants*, 12, 2253, 1–22. DOI: 10.3390/plants12122253.
- BERGER, A., BOSCARI, A., ARAÚJO, N.H., MANCOURT, M., HANCHI, M., BERNILLON, S., KOLIN, O., PUPPO, A., BROUQUISSE, R. (2020) Plant nitrate reductases regulate nitric oxide production and nitrogen – fixing metabolism during the *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium melloti* symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 11. DOI: 10.3389/fpls.2020.01313.
- EL-FAYOUMY, E.A., SHANAB, S.M., HASSAN, O.M.A., SHALABY, E.A. (2023) Enhancement of active ingredients and biological actives of *Nostoc linkia* biomass cultivated under modified BGII0 medium composition. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13, 6049–6066. DOI: 10.1007/s13399-021-01509-7.
- FU, Y.-F., ZHANG, Z.-W., YUAN, S. (2018) Putative connections between nitrate reductase S – nitro solution and NO synthesis under pathogen attacks and abiotic stress. *Frontiers in Plant Physiology*, 9. DOI: 10.3389/2018.00474.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. (1968) Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158.
- HAO, L., WANG, X., SHI, J., LI, L., HAO, X. (2023) Vanadium(V) bio-detoxification based on washing water of vicia as microbial and carbon sources. *Frontiers in Environmental Science*, 11. DOI: fenvs.2023.1096845.
- HARJA, M., CIOCINTA, R.C., ONDRASEK, G., BUCUR, D., DIRJA, M. (2023) Accumulation of heavy metal ions from urban soil in spontaneous flora. *Journal Water*, 15(4), 768–775. DOI: 10.3390/w1504768.
- HE, M., HE, C.-Q., DING, N.-Z. (2018) Abiotic stresses: general defences for engineering multistress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1771. DOI: 10.3389/fpls.2018.01771.
- KAUFHOLDT, D., BAILLIE, C.-K., MÜNEM, R., MENDEL, R.R., HÄNSCH R. (2017) The molybdenum cofactor biosynthesis network: in vivo protein – protein interactions of an active associated multi – protein complex. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1946–1957. DOI: 10.3389/fpls.2017.01946.
- KOYAMA, L.A., TERAJ, M., TOKUCHI, N. (2020) Nitrate reductase actives in plants from different ecological and taxonomic groups grown in Japan. *Ecological Research*, 35(5), 708–712. DOI: 10.1111/1440-1703.12083.
- LOHANI, N., SING, M., BHALLA, P (2022) Biological parts for engineering abiotic stress tolerance stress in plants. *BioDesing Research*, 41. DOI: 10.34133/2022/9819314.
- MACÁRIO, I.P.E., VELOSO, T., ROMÃO J., CONCALVES, J.M., PEVERA, J.L., DUARTE, I.F., VENTURA, S.P.M. (2022) Metabolic composition of the cyanobacterium *Nostoc muscorus* as a function of culture time: A1HNMR metabolomics study. *Algal Research*, 66, 102792. DOI: 10.1016/j.algal.2022.102792.
- MALIGA, P. (2003) Isolation and characterization of mutants in plant cell culture. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 35(1), 519–542. DOI: 10.1146/annurev.pp.35.060184.002511.
- MORKUNAS, J., WOŹNIAK, K., MAI, V.C., RUCIŃSKA-SOBKOWIAK, K., JEANDER, P. (2018) The role of heavy metal in plant response to biotic stress. *Molecules*, 23(9), 2320. DOI: 10.3390/molecules23092320.
- OCHOA-VILLARREAL, M., HOWAT, S., HONG, S., JANG, M.O., JIN, Y.-W., LEE, E.-K., LOAKE, G.J. (2016) Plant cell culture strategies for the production of natural produced. *BMB Reports*, 49(3), 149–158. DOI: 10.5483/BMBRep.2016.49.3.264.
- PASTERNAK, T.P., STEINMACHER, D. (2024) Plant growth regulation in cell and tissue culture *in vitro*. *Plants*, 13(2), 327. DOI: 10.3390/plants13020327.

- SERGEEVA, L.E., MYKHALSKA, S.I. (2019) Cell selection with heavy metal ions for obtaining salt tolerant plant cell cultures. *Plant Physiology and Genetics*, 51(4), 315–323. DOI: 10.15407/frg2019/04/315.
- SERGEVA, L.E. (2017) Nitrate reductase activity in biotechnology tobacco plants under enzyme inhibitors action. *Plant Physiology and Genetics*, 49(2), 129–133. DOI: 10.15407/frg2017.02.129.
- SINH, H.N., CGACRAVARTY, D., SRINISAVA, A.K. (1993) Vanadium requirements for growth on N₂ or nitrate as nitrogen source in tungsten resistant mutant of the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Journal of Basic Microbiology*, 33(3), 201–205.
- ZHANG, Y., XU, L., LI, R., GE, Y., LI, Y., LI, R. (2023) Plants' Response to abiotic stress: mechanisms and strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10915. DOI: 10.3390/ijms241310915.