
ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 577.21:575.113

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ *acdS*-ГЕНА БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS PUTIDA* В-37 В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ *NICOTIANA TABACUM*

А. А. МЕЛЬНИКОВА¹⁾, Е. А. ХРАМЦОВА¹⁾,
Е. С. КОРОЛЕВА¹⁾, Д. А. РУТКЕВИЧ¹⁾, Т. А. КУКУЛЯНСКАЯ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Осуществлен перенос рекомбинантной плазмиды pBI121*acdS*, несущей *acdS*-ген бактерий *P. putida* В-37, в клетки *A. tumefaciens* AGL0. С помощью агробактериальной трансформации получены трансгенные растения *N. tabacum*. Методом полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров к данному гену подтверждена интеграция *acdS*-гена *P. putida* В-37 в геном трансгенных растений *N. tabacum*, а с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией – факт экспрессии гетерологичного гена в растениях *N. tabacum*. Анализ экспрессии *acdS*-гена бактерий *P. putida* В-37 в трансгенных растениях *N. tabacum*,

Образец цитирования:

Мельникова АА, Храмцова ЕА, Королева ЕС, Руткевич ДА, Кукулянская ТА. Анализ экспрессии *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* В-37 в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2019;1:45–53.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-45-53>

For citation:

Melnikava AA, Khramtsova AA, Karaleva KS, Rutkevich DA, Kukulianskaya TA. Expression analysis of *acdS*-gene of *Pseudomonas putida* В-37 in transgenic plants *Nicotiana tabacum*. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2019;1:45–53. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-45-53>

Авторы:

Алесья Андреевна Мельникова – младший научный сотрудник кафедры генетики биологического факультета.
Елена Аркадьевна Храмцова – кандидат биологических наук; доцент кафедры генетики биологического факультета.
Екатерина Сергеевна Королева – студентка биологического факультета. Научный руководитель – Е. А. Храмцова.
Дарья Андреевна Руткевич – студент биологического факультета. Научный руководитель – Е. А. Храмцова.
Татьяна Александровна Кукулянская – кандидат биологических наук; доцент кафедры биохимии биологического факультета.

Authors:

Alesia A. Melnikava, junior researcher at the department of genetics, faculty of biology.
Alena A. Khramtsova, PhD (biology); associate professor at the department of genetics, faculty of biology.
elena_khramtsova@inbox.ru
Katsiaryna S. Karaleva, student at the faculty of biology.
Daria A. Rutkevich, student at the faculty of biology.
Tatsiana A. Kukulianskaya, PhD (biology); associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology.

проведенный с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени, показал, что величина экспрессии была в 1,27 раза выше, чем у референс-гена. Это подтверждает факт экспрессии гена в данных растениях на высоком уровне. Указанный факт экспрессии был также подтвержден определением удельной активности 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-деаминазы в трансгенных растениях *N. tabacum*.

Ключевые слова: АЦК-деаминаза; *Nicotiana tabacum*; *acdS*-ген; *Pseudomonas putida*.

EXPRESSION ANALYSIS OF *acdS*-GENE OF *PSEUDOMONAS PUTIDA* B-37 IN TRANSGENIC PLANTS *NICOTIANA TABACUM*

A. A. MELNIKA^a, A. A. KHRAMTSOVA^a,
K. S. KARALEVA^a, D. A. RUTKEVICH^a, T. A. KUKULIANSKAYA^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus
Corresponding author: A. A. Khramtsova (elena_khramtsova@inbox.ru)

In current work was realized the transfer of recombinant plasmid pBI121*acdS*, carrying *P. putida* B-37 bacterial *acdS*-gene to the *A. tumefaciens* AGL0 cells. Transgenic plants of *N. tabacum* were created by agrobacterial transformation. Integration of *P. putida* B-37 bacterial *acdS*-gene to transgenic plants of *N. tabacum* was verified by PCR analysis, using specific primers to present gene. Presence of target *acdS*-gene in transgenic plants genome was proved by RT-PCR analysis. With help of Real-time PCR was shown the difference between reference gene and target *P. putida* B-37 bacterial *acdS*-gene expression. Expression of target gene exceeded reference gene in 1.27 times, those fact proved expression of *acdS*-gene in plants on high level. Expression of the heterologous gene in *N. tabacum* plants was also proved by biochemical method of ACC-deaminase specific activity define.

Key words: ACC-deaminase; *Nicotiana tabacum*; *acdS*-gene; *Pseudomonas putida*.

Введение

В настоящее время одна из ключевых задач – получение растений, обладающих повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам среды. Растения, произрастающие в сложных условиях, подвергаются стрессу, который вызван недостатком питательных веществ и химической токсичностью. Естественной реакцией растений на стресс является продукция стрессового гормона этилена, который приводит к снижению роста, уменьшению биомассы и ускорению процессов старения, пожелтению и опадению плодов [1; 2].

Этилен в оптимальной концентрации выполняет важную роль в процессах, связанных с нормальным ростом и развитием растений, однако в условиях абиотического и биотического стрессов его уровень повышается, что приводит к ингибированию роста корня, старению листьев и их опадению, разрушению хлорофилла [3; 4]. Одним из подходов к снижению уровня стрессового этилена в растениях является использование фермента АЦК-деаминазы, который разлагает предшественника этилена – АЦК – до аммиака и α -кетобутирата. В последнее время особое внимание уделяется исследованиям, направленным на разработку способов снижения продукции растениями стрессового этилена путем создания трансгенных растений, несущих бактериальный *acdS*-ген, кодирующий АЦК-деаминазу, и, как следствие, обладающих устойчивостью к стрессовым факторам среды [5–7].

Экспрессия *acdS*-гена бактерий в растениях существенно повышает показатели их роста и продуктивности. В настоящее время показано, что такая экспрессия в трансгенных растениях приводит к усиленной деградации стрессового этилена в корневой зоне и снятию негативного эффекта его действия, придает устойчивость к засухе, засолению и загрязнению почвы солями тяжелых металлов [8–12]. Создание трансгенных растений, синтезирующих бактериальную АЦК-деаминазу, которые характеризуются повышенной устойчивостью к абиотическим стрессам, вызванным засолением почв или загрязнением их тяжелыми металлами, является в настоящее время высокоактуальным в связи с постоянно усиливающимся техногенным воздействием на природные сообщества и ухудшением экологической обстановки на территориях, занятых сельскохозяйственным производством.

Таким образом, цель данной работы – получение трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, несущих *acdS*-ген бактерий *Pseudomonas putida* B-37, и анализ его экспрессии в растениях табака.

Материалы и методы исследования

В качестве основных **объектов исследований** использовались бактериальные штаммы *P. putida* B-37, *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 и растения табака *N. tabacum*. Также применялись бактериальный штамм *E. coli* XL-1 Blue из коллекции научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии биологического факультета БГУ и генетическая конструкция pBI121*acdS*, полученная нами ранее [13].

Выделение плазмидной ДНК осуществляли методом щелочного лизиса по [14].

Электрофоретический анализ ДНК проводили в агарозном геле с использованием буферной системы TAE согласно методическим указаниям, изложенным в руководствах [15].

Рестрикцию ДНК осуществляли в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя ферментов *Thermo Fisher Scientific* (Литва).

Прямую трансформацию *A. tumefaciens* проводили методом замораживания-оттаивания согласно рекомендациям, изложенным в руководстве [15].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли по заданной программе с использованием аппарата C1000 Touch™ ThermalCycler фирмы *Bio-Rad Laboratories* (США). При постановке ПЦР применяли реактивы производства *Thermo Fisher Scientific*: Taq-полимеразу, 10-кратный Taq-буфер для ПЦР, смесь дНТФ и деионизированную воду в концентрациях, предложенных производителем. Результаты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза в агарозном геле.

Аmplификацию гена *acdS* производили с использованием следующих праймеров:

- Forward: (Fatg) 5'-tccggatccatgaacctgaatcgttttaacgttatc-3';
- Reverse: (Rtga) 5'-tccggatccctcagccgttgccgaacargaag-3'.

Параметры циклов амплификаций: 5 мин при 94 °C – 1 цикл; по 30 с при 94 и 54 °C, 1,5 мин при 72 °C – 35 циклов; 30 с при 72 °C – 1 цикл.

Аmplификацию гена *virE2* производили с использованием следующих праймеров:

- Forward: (VirE2-F) 5'-cgaatacattctcgtgcgtcaaacg-3';
- Reverse: (VirE2-R) 5'-tttcgagtcataatgcctgac-3'.

Параметры циклов амплификаций: 5 мин при 94 °C – 1 цикл; по 30 с при 94 и 59 °C, 1 мин при 72 °C – 30 циклов; 7 мин при 72 °C – 1 цикл.

Выделение растительной РНК. Растительный материал растирали тонким металлическим шпателем. Добавляли 500 мкл буфера для экстракции, центрифугировали 10 мин при 12 000 об/мин. Отбирали водную фазу, соединяли ее с равным объемом 4-молярного LiCl. Центрифугировали 30 мин при 10 000 об/мин, к осадку добавляли 250 мкл H₂O, 25 мкл 3 моль/л AcNa (pH 5,2) и 550 мкл 96 % этанола. Пробу центрифугировали 30 мин при 12 000 об/мин. Осадок промывали 1 мл 70 % этанола. Образцы центрифугировали 5 мин при 10 000 об/мин. Удаляли супернатант, подсушивали осадок и растворяли его в 40 мкл H₂O.

Синтез кДНК. В стерильный эппендорф на льду добавляли в следующем порядке реактивы: мРНК (0,1–5,0 нг), праймеры (0,5 мкг), ДЕПК-воду (до 12,5 мкл). Затем вводили 4 мкл 5х-буфера для реакции, 0,5 мкл ингибитора РНКазы, 2 мкл смеси нуклеотидов, 1 мкл обратной транскриптазы. Инкубировали 10 мин при 25 °C, 60 мин – при 42 °C. Ингибировали реакцию нагреванием до 70 °C в течение 10 мин.

Для синтеза кДНК использовали обратную транскриптазу Revert Aid TM Premium Reverse Transcriptase, произведенную фирмой *Fermentas*.

Культивирование и агробактериальная трансформация табака. Листья растений *N. tabacum* 6–8-недельного возраста, выращенные на среде А1 при 24 °C и 16-часовом световом дне, разрезали на фрагменты около 0,25 см², отделив предварительно центральную жилку, делали насечки по краям и выкладывали на чашки с агробактериями на среде А2, нижней стороной вниз, по 10–12 штук на чашку. Инкубировали 2 сут в темноте при 28 °C, затем переносили диски на среду А3 с селективным агентом для стимуляции каллусогенеза (канамицин – Km) и тиментином для элиминации агробактериального роста. Помещали на свежую среду А3 раз в неделю до образования каллусов. При появлении каллусогенеза осуществляли перенос на чашки со средой А4 с селективным антибиотиком и необходимыми гормонами для стимуляции образования побегов. Последние переносили на среду А5 с антибиотиком и затем в почву.

Выделение тотальной ДНК. Растительный материал помещали в пробирку, вливали жидкий азот, выдерживали несколько секунд до его испарения и быстро растирали листовую ткань в порошок. Добавляли буфер для выделения ДНК до объема 750 мкл; ресуспендировали и инкубировали пробу при 65 °C в течение 10 мин. Затем вводили 200 мкл 5 моль/л ацетата калия, пробирку энергично встряхивали. Инкубировали пробу на ледяной бане 20 мин. Центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатант переносили в новую пробирку, добавляли равный

объем изопропанола, перемешивали и центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 2 мин. Удаляли супернатант и ресуспендировали осадок в равном объеме 80 % этанола. Супернатант удаляли, осадок подсушивали. Растворяли ДНК в 50 мкл ТЕ-буфера и хранили при -20°C .

Количественная ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 25 мкл составляли следующим образом: 2 \times ПЦР-буфер Maxima SYBR Greenq PCR Master Mix (*Thermo Scientific*, США) – 12,5 мкл; праймер F – 0,5 мкл; праймер R – 0,6 мкл; образец кДНК (20 нг/мкл) – 2 мкл. Конечный объем доводили водой до 25 мкл. Программа амплификации была следующей: 2 мин при 50°C – 1 цикл; 10 мин при 95°C – 1 цикл; 15 с при 95°C , 30 с при 55°C , 60 с при 60°C – 40 циклов. Использованные праймеры:

- RT-ATG-For1 – 5' – ATGAACCTGAATCGTTTGAACGTTATC-3';
- RT-ATG-Rev1 – 5' – CACTGTTGCAGTCTTCACGTTTG-3'.

Определение содержания белка в растительных гомогенатах проводили биуретовым методом [16]. Активность АЦК-деаминазы оценивали по количеству α -кетобутирата, образующегося за 1 мин на 1 мг белка в растительном гомогенате при деаминировании 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата. Количество α -кетобутирата определяли спектрофотометрически при 540 нм. Реакционную смесь, содержащую 20 мкл растительного гомогената и 10 мкмоль АЦК и 200 мкл 0,1 моль/л трис-буфера (pH 7,4), инкубировали 60 мин при 30°C . Реакцию останавливали добавлением 180 мкл 0,56 моль/л HCl и вносили 30 мкл 0,1 % раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Пробы инкубировали в течение 15 мин при 30°C , останавливали реакцию добавлением 200 мкл NaOH (2 моль/л) и измеряли оптическую плотность при 540 нм.

Результаты и их обсуждение

Ранее нами была создана генетическая конструкция, несущая *acdS*-ген бактерий *P. putida* B-37 под контролем промотора 35SCaMV в составе бинарного вектора pBI121. Показано, что данная рекомбинантная плазмида pBI121*acdS* способна встраиваться в растительный геном, и установлено наличие транзientной экспрессии *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37 в растительных клетках *Nicotiana benthamiana* [13]. Следовательно, полученная генетическая конструкция может быть использована для создания трансгенных растений, эффективно экспрессирующих *acdS*-ген бактерий *P. putida* B-37 и обладающих повышенной устойчивостью к стрессовым факторам среды, таким как засоление почвы, загрязнение ее солями тяжелых металлов, засухе и др.

Трансформация клеток *A. tumefaciens* AGL0. Трансгенные растения *N. tabacum* получали с помощью агробактериальной трансформации. Для этого использовали гипервирулентный штамм агробактерий *A. tumefaciens* AGL0. Перенос рекомбинантной плазмиды pBI121*acdS* в клетки *A. tumefaciens* AGL0 осуществляли путем прямой трансформации. Отбор трансформантов проводили на селективной среде, содержащей антибиотика Km в концентрации 50 мкг/мл и рифампицин в концентрации 20 мкг/мл. Из отобранных клонов выделена плазмидная ДНК, которая впоследствии использована в качестве ДНК-матрицы для ПЦР. Как видно из данных, представленных на рис. 1, в ходе ПЦР с использованием специфических праймеров к последовательности *acdS*-гена получен фрагмент ДНК размером 1000 п. н., соответствующий целевому гену бактерий *P. putida* B-37.

Таким образом, был осуществлен перенос рекомбинантной плазмиды pBI121*acdS* из клеток *E. coli* XL-1 Blue в бактерии *A. tumefaciens* AGL0.

Агробактериальная трансформация клеток *N. tabacum*. Агробактериальная трансформация растений табака 6–8-недельного возраста клетками *A. tumefaciens* AGL0, несущими рекомбинантную плазмиду pBI121*acdS*, произведена методом листовых дисков. Через 2 сут инкубирования листовые диски перенесены на чашки Петри с селективным агентом. Для элиминации *A. tumefaciens* в среду был добавлен цефотаксим в концентрации 150 мкг/мл.

В качестве контролей использованы нетрансформированные фрагменты листьев. Положительный контроль (без содержания Km) показывал способность среды инициировать каллусообразование; отрицательный контроль демонстрировал чувствительность растительных клеток к содержанию в среде антибиотика Km.

Через три недели на образцах и положительном контроле наблюдался процесс каллусообразования. Четырехнедельные образцы представлены на рис. 2.

Каллусная ткань была перенесена на среду, стимулирующую образование сначала побегов, а затем корней. Растения-регенеранты далее помещались в условия закрытого грунта.

Определение интеграции *acdS*-гена *P. putida* B-37 в растения *N. tabacum*. Для проверки наличия вставки *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37 в геном растений-регенерантов проводили выделение тотальной ДНК с последующим проведением ПЦР с использованием специфических праймеров к данному гену. В результате получен фрагмент ДНК размером ~1000 п. н., соответствующий размеру *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37 (рис. 3).

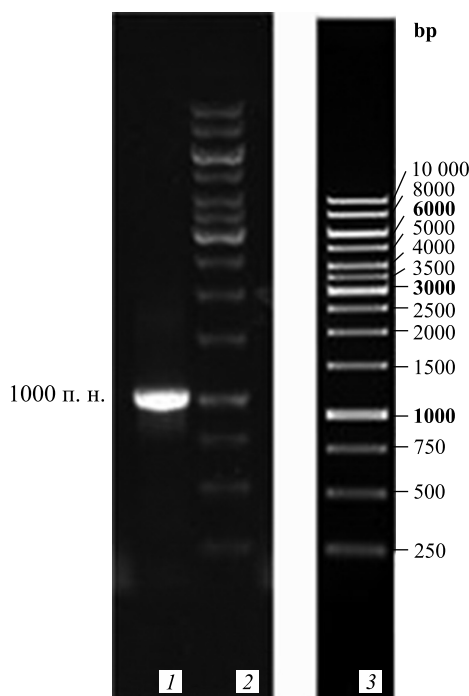


Рис. 1. Электрофореграмма результатов ПЦР:
1 – фрагмент (~1000 п. н.), соответствующий *acdS*-гену бактерий *P. putida* B-37; 2, 3 – маркерная ДНК Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

Fig. 1. Electrophoregram of PCR results:
1 – fragment (~1000 bp), corresponding to the *acdS*-gene of bacteria *P. putida* B-37; 2, 3 – Gene Ruler 1 kb DNA Ladder marker DNA



Рис. 2. Трансформированные четырехнедельные листовые диски:
1 – трансформированные клетки растения табака *N. tabacum* с плазмидой pBI121*acdS*;
2 – положительный контроль (без антибиотика Km); 3 – отрицательный контроль (с антибиотиком Km)

Fig. 2. Transformed four-week leaf disks:
1 – transformed cells of the tobacco plant *N. tabacum* with plasmid pBI121*acdS*;
2 – positive control (without antibiotic Km); 3 – negative control (with antibiotic Km)

Для того чтобы удостовериться в том, что положительный результат ПЦР с праймерами к *acdS*-гену *P. putida* B-37 не является следствием контаминации проб клетками *A. tumefaciens* AGL0, была проведена ПЦР со специфическими праймерами к *virE2*-гену указанных бактерий. Показано, что все проверенные образцы не выявили при амплификации наличия продукта размером 620 п. н., соответствующего фрагменту агробактериального гена *virE2*.

Таким образом, установлено, что в геноме растений-регенерантов *N. tabacum*, полученных из трансформированной каллусной культуры, содержится *acdS*-ген бактерий *P. putida* B-37. Однако следует отметить, что наличие чужеродного гена в растительном организме не может означать, что данный ген будет там эффективно экспрессироваться.

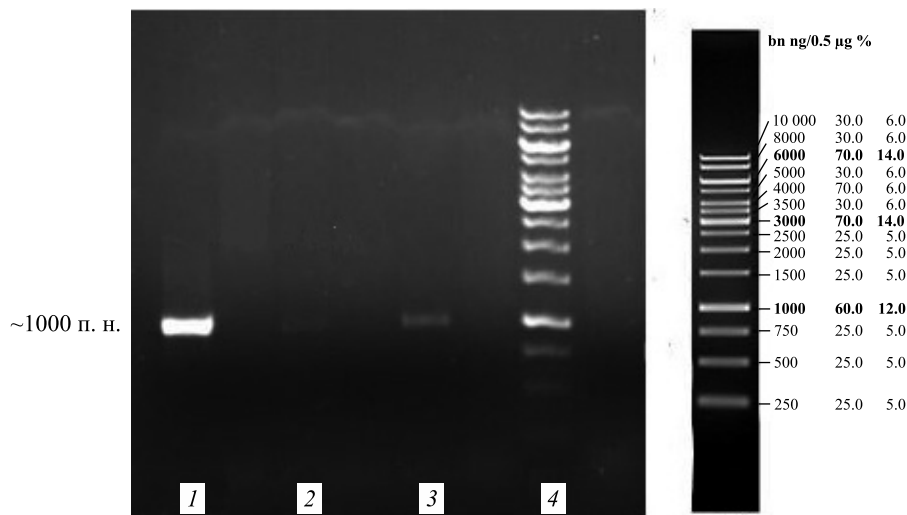


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР: 1 – положительный контроль на *acdS*-ген; 2, 3 – фрагменты ДНК размером ~1000 п. н.; 4 – маркерная ДНК Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

Fig. 3. Electrophoretic analysis of PCR products: 1 – positive control for *acdS*-gene; 2, 3 – DNA fragments ~1000 bp in size; 4 – Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

Анализ уровня экспрессии *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37 в трансгенных растениях *N. tabacum*. Установлено, что на эффективность экспрессии гетерологичного гена может оказывать влияние место его интеграции в геном растений, в частности, интеграция в область гетерохроматина может привести к замолчанию трансгена. Также в процессе развития растений возможно изменение уровня экспрессии трансгена или полная инактивация гетерологичного гена [17; 18].

Для подтверждения экспрессии гетерологичного гена в растениях табака проведена ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), где в качестве матрицы использована тотальная РНК, выделенная из растений-регенерантов. Полученную кДНК далее применяли для постановки ПЦР с праймерами к *acdS*-гену *P. putida* B-37.

Данные, представленные на рис. 4, показывают, что во всех анализируемых трансгенных растениях обнаруживается ПЦР-продукт размером 1000 п. н., соответствующий *acdS*-гену *P. putida* B-37.

В результате ОТ-ПЦР мРНК контрольных нетрансформированных растений продуктов амплификации целевого гена *acdS* не выявлено. Для контроля качества синтеза кДНК, как и ранее, использовался ген альфа-субъединицы фактора элонгации транскрипции *Ef-1α*. Таким образом, не только доказана успешная интеграция целевого гена АЦК-дезаминазы в растительный геном, но и подтвержден факт экспрессии гетерологичного гена в растениях *N. tabacum*. Однако на основании проведенных экспериментов нельзя судить об уровне экспрессии трансгена в растениях.

Для определения уровня экспрессии *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37 в трансгенных растениях *N. tabacum* применяли метод ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

Для определения уровня экспрессии гетерологичного гена в трансгенных растениях *N. tabacum* применяли протокол ПЦР-РВ с использованием интеркалирующих флуоресцентных агентов (SYBR Green). Общепринятым стандартом значений порогового цикла флуоресценции (*C_q*) при количественной оценке ПЦР является диапазон 15–30, рекомендованный для использования в большинстве сертифицированных протоколов и представленных на рынке коммерческих тест-систем [19]. Абсолютные значения *C_q* изучаемого гена *acdS* для использованных образцов находились в пределах 23–28 циклов.

Расчет данных ПЦР-РВ производили методом прямого сравнения по формуле $2^{-C_q(acdS) - C_q(Ef-1\alpha)}$. Установлено, что уровень экспрессии *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37 в одном из трансгенных растений *N. tabacum* был в 1,27 раза выше, чем у референс-гена (рис. 5).

Для подтверждения экспрессии чужеродного гена в растениях *N. tabacum* определена удельная активность АЦК-дезаминазы. Установлено, что в трансгенных растениях, не испытывающих стрессовых воздействий, активность АЦК-дезаминазы составляла $(4,32 \pm 0,18)$ нмоль/(ч · мг белка), что согласуется с литературными данными об удельной активности фермента в других трансгенных растениях [20].

Таким образом, были получены трансгенные растения *N. tabacum*, несущие *acdS*-ген бактерий *P. putida* B-37, и подтвержден факт его эффективной экспрессии в данных растениях.

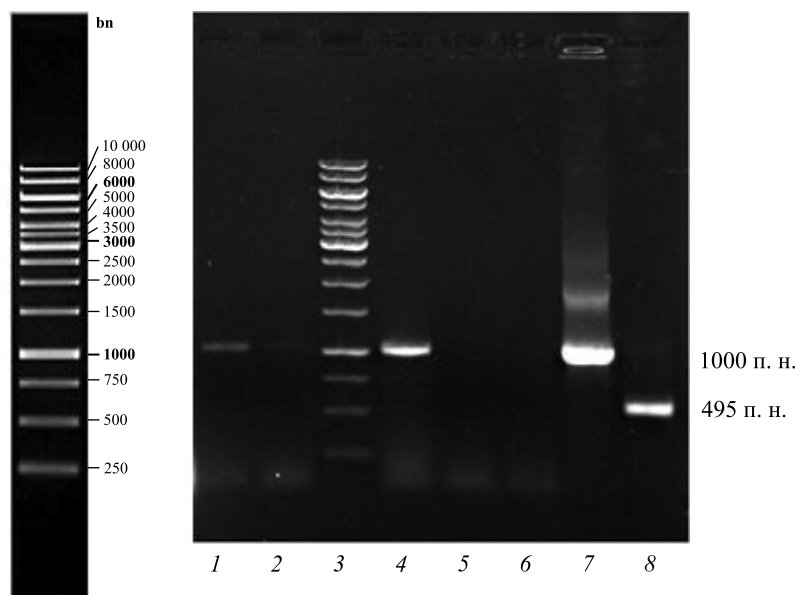


Рис. 4. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР:

- 1, 2, 4 – кДНК растительных образцов *N. tabacum*;
3 – маркерная ДНК Gene Ruler 1 kb DNA Ladder;
5, 6 – отрицательный контроль кДНК (нетрансформированные растения);
7 – контроль ДНК, фрагмент ~1000 п. н., соответствующий *acdS*-гену *P. putida* B-37;
8 – положительный контроль кДНК, *Ef-1α* (495 п. н.)

Fig. 4. Electrophoretic analysis of PCR products:

- 1, 2, 4 – cDNA of plant *N. tabacum* samples; 3 – Gene Ruler 1 kb DNA Ladder marker DNA;
5, 6 – negative control cDNA (untransformed plants); 7 – DNA control, fragment ~1000 bp, corresponding to the *acdS*-gene of *P. putida* B-37; 8 – positive control cDNA, *Ef-1α* (495 bp)

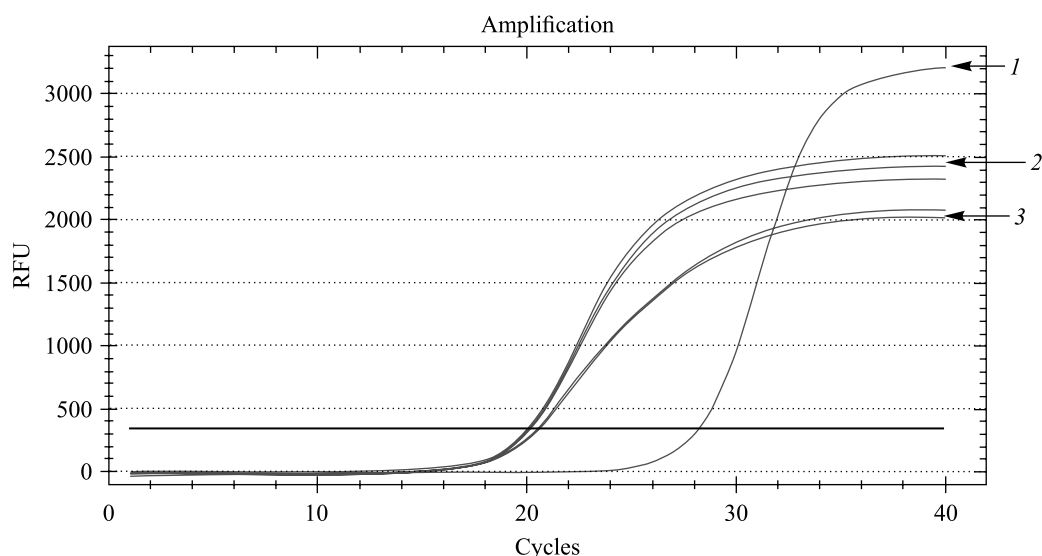


Рис. 5. Уровень экспрессии *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37 в трансгенном растении *N. tabacum*:
1 – отрицательный контроль (без матрицы); 2 – образцы, соответствующие исследуемому гену (*acdS*);
3 – образцы, соответствующие референс-гену (*Ef-1α*)

Fig. 5. The expression level of the *acdS*-gene of *P. putida* B-37 bacteria in the *N. tabacum* transgenic plant:
1 – negative control (no matrix); 2 – samples corresponding to the gene under study (*acdS*);
3 – samples corresponding to the reference gene (*Ef-1α*)

Заклучение

Осуществлен перенос рекомбинантной плазмиды pBI121*acdS* из клеток *E. coli* XI-1 Blue в бактерии *A. tumefaciens* AGL0. Методом листовых дисков произведена агробактериальная трансформация табака клетками *A. tumefaciens* AGL0, несущими рекомбинантную плазмиду, получены растения-регенеранты. С помощью ПЦР установлено, что в геноме растений-регенерантов *N. tabacum* из трансформированной каллусной культуры содержится *acdS*-ген бактерий *P. putida* B-37. С использованием ОТ-ПЦР, где в качестве матрицы применялась тотальная РНК, выделенная из растений-регенерантов, не только доказана успешная интеграция целевого гена АЦК-деаминазы в растительный геном, но и подтвержден факт экспрессии гетерологического гена в растениях *N. tabacum*.

Методом ПЦР-РВ установлено, что уровень экспрессии *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37 в одном из трансгенных растений *N. tabacum* был в 1,27 раза выше, чем у референс-гена.

Таким образом, были получены трансгенные растения *N. tabacum*, несущие *acdS*-ген бактерий *P. putida* B-37, и подтвержден факт его эффективной экспрессии в этих растениях.

Практическая значимость данного исследования связана с использованием трансгенных растений, экспрессирующих бактериальный ген АЦК-деаминазы (*acdS*) и обладающих повышенной устойчивостью к неблагоприятным воздействиям окружающей среды.

Библиографические ссылки

1. Полевой ВВ. *Физиология растений*. Москва: Высшая школа; 1989. 351 с.
2. Glick BR. *Beneficial plant-bacterial interactions*. Heidelberg: Springer; 2015. 243 p.
3. Bakker PAHM, Raaijmakers JM, Bloemberg G, Hoftte M, Lemanceau P, Cooke BM, editors. New perspectives and approaches in plant growth-promoting *Rhizobacteria* research. *European Journal of Plant Pathology*. 2007;119(3):334–358.
4. Jin Z, Di Rienzi SC, Janson A, Werner JJ, Angenent LT, Dangl JL, editors. Novel rhizosphere soil alleles for the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase queried for function with an *in vivo* competition assay. *Applies and Environmental Microbiology*. 2016;82(4):1050–1059. DOI: 10.1128/AEM.03074-15.
5. Saravanakumar D. Rhizobacterial ACC deaminase in plant growth and stress amelioration. In: Maheshwari DK, editor. *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2012. p. 187–204. DOI: 10.1007/978-3-642-23465-1.
6. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 1979;7(6):1513–1523. PMID: 388356.
7. Singh RP, Shelke GM, Kumar A, Jha PN. Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to «stress ethylene» produced in plants. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:937. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00937.
8. Grichko VP, Filby B, Glick BR. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *Journal of Biotechnology*. 2000;81(1):45–53. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00270-4.
9. Farwell AJ, Vesely S, Nero V, Rodriguez H, Shah S, Dixon DG, et al. The use of transgenic canola (*Brassica napus*) and plant growth-promoting bacteria to enhance plant biomass at a nickel-contaminated field site. *Plant Soil*. 2006;288(1):309–318. DOI: 10.1007/s11104-006-9119-y.
10. Sergeeva E, Shan S, Glick BR. Growth of transgenic canola (*Brassica napus* cv. Westar) expressing a bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene on high concentrations of salt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006;22(3):277–282. DOI: 10.1007/s11274-005-9032-1.
11. Farwell AJ, Vesely S, Nero V, Rodriguez H, McCormack K, Shah S, et al. Tolerance of transgenic canola plants (*Brassica napus*) amended with plant growth-promoting bacteria to flooding stress at a metal-contaminated field site. *Environmental Pollution*. 2007;147(3):540–545. DOI: 10.1016/j.envpol.2006.10.014.
12. Jalili F, Khavazi K, Pazira E, Nejati A, Rahmani HA, Sadaghiani HR, et al. Isolation and characterization of ACC deaminase-producing fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. *Journal of Plant Physiology*. 2009;166(6):667–674. DOI: 10.1016/j.jplph.2008.08.004.
13. Мельникова АА, Волкова ДС, Храмова ЕА. Характеристика *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* B-37 и создание генетической конструкции для определения транзиторной экспрессии данного гена в растительных клетках *Nicotiana benthamiana*. *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. 2017;3:61–68.
14. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction producer for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 1979;7(6):1513–1523. DOI: 10.1093/nar/7.6.1513.
15. Маниатис Т, Фрич Э, Сэмбрук Дж. *Молекулярное клонирование*. Баява АА, Скрыбина КГ, редакторы. Москва: Мир; 1984. 479 с.
16. Семак ИВ, Зырянова ТН, Губич ОИ. *Биохимия белков*. Минск: БГУ; 2007. 49 с.
17. Matzke MA, Mette MF, Matzke AJ. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Molecular Biology*. 2000;43(2–3):401–415. DOI: 10.1023/A:1006484806925.
18. Дейнеко ЕВ, Загорская АА, Филипенко ЕА, Кочетов АВ, Шумный ВК, Филипенко МЛ и др. Нестабильность экспрессии гена *nr1II* у трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) при инбридинге. *Генетика*. 1998;34(9):1212–1219.
19. Saunders NA, Lee MA, editors. *Real-Time PCR: Advanced Technologies and Applications*. Poole: Caister Academic Press; 2013. 302 p.
20. Gontia-Mishra I, Sasidharan S, Tiwari S. Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress. *Biotechnology Letters*. 2014;36(5):889–898. DOI: 10.1007/s10529-014-1458-9.

References

1. Polevoj VV. *Fiziologiya rastenii* [Plant physiology]. Moscow: Vysshaya shkola; 1989. 351 p. Russian.
2. Glick BR. *Beneficial plant-bacterial interactions*. Heidelberg: Springer; 2015. 243 p.
3. Bakker PAHM, Raaijmakers JM, Bloemberg G, Hofte M, Lemanceau P, Cooke BM, editors. New perspectives and approaches in plant growth-promoting *Rhizobacteria* research. *European Journal of Plant Pathology*. 2007;119(3):334–358.
4. Jin Z, Di Rienzi SC, Janzon A, Werner JJ, Angenent LT, Dangel JL, editors. Novel rhizosphere soil alleles for the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase queried for function with an *in vivo* competition assay. *Applies and Environmental Microbiology*. 2016;82(4):1050–1059. DOI: 10.1128/AEM.03074-15.
5. Saravanakumar D. Rhizobacterial ACC deaminase in plant growth and stress amelioration. In: Maheshwari DK, editor. *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2012. p. 187–204. DOI: 10.1007/978-3-642-23465-1.
6. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 1979;7(6):1513–1523. PMID: 388356.
7. Singh RP, Shelke GM, Kumar A, Jha PN. Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to «stress ethylene» produced in plants. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:937. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00937.
8. Grichko VP, Filby B, Glick BR. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *Journal of Biotechnology*. 2000;81(1):45–53. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00270-4.
9. Farwell AJ, Vesely S, Nero V, Rodriguez H, Shah S, Dixon DG, et al. The use of transgenic canola (*Brassica napus*) and plant growth-promoting bacteria to enhance plant biomass at a nickel-contaminated field site. *Plant Soil*. 2006;288(1):309–318. DOI: 10.1007/s11104-006-9119-y.
10. Sergeeva E, Shan S, Glick BR. Growth of transgenic canola (*Brassica napus* cv. Westar) expressing a bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene on high concentrations of salt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006;22(3):277–282. DOI: 10.1007/s11274-005-9032-1.
11. Farwell AJ, Vesely S, Nero V, Rodriguez H, McCormack K, Shah S, et al. Tolerance of transgenic canola plants (*Brassica napus*) amended with plant growth-promoting bacteria to flooding stress at a metal-contaminated field site. *Environmental Pollution*. 2007;147(3):540–545. DOI: 10.1016/j.envpol.2006.10.014.
12. Jalili F, Khavazi K, Pazira E, Nejati A, Rahmani HA, Sadaghiani HR, et al. Isolation and characterization of ACC deaminase-producing fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. *Journal of Plant Physiology*. 2009;166(6):667–674. DOI: 10.1016/j.jplph.2008.08.004.
13. Melnikava AA, Volkava DS, Khramtsova EA. Characteristics of bacterial *acdS*-gene from the strain *Pseudomonas putida* B-37 and the creation of a genetic construct for determining its transient expression in the plant cells *Nicotiana benthamiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*. 2017;3:61–68. Russian.
14. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction producer for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 1979;7(6):1513–1523. DOI: 10.1093/nar/7.6.1513.
15. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982. 545 p.
16. Russian edition: Maniatis T, Frich E, Sembruk Dzh. *Molekulyarnoe klonirovanie*. Baeva AA, Skryabina KG, editors. Moscow: Mir; 1984. 479 p.
17. Semak IV, Zyryanova TN, Gubich OI. *Biokhimiya belkov* [Biochemistry of proteins]. Minsk: Belarusian State University; 2007. 49 p. Russian.
18. Matzke MA, Mette MF, Matzke AJ. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Molecular Biology*. 2000;43(2–3):401–415. DOI: 10.1023/A:1006484806925.
19. Deineko EV, Zagorskaya AA, Filipenko EA, Kochetov AV, Shumnyi VK, Filipenko ML, et al. Instability of the gene *nptII* expression in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants during inbreeding. *Genetika*. 1998;34(9):1212–1219. Russian.
20. Saunders NA, Lee MA, editors. *Real-Time PCR: Advanced Technologies and Applications*. Poole: Caister Academic Press; 2013. 302 p.
21. Gontia-Mishra I, Sasidharan S, Tiwari S. Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress. *Biotechnology Letters*. 2014;36(5):889–898. DOI: 10.1007/s10529-014-1458-9.

Статья поступила в редколлегию 08.01.2019.
Received by editorial board 08.01.2019.