

ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA TABACUM*, НЕСУЩИХ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ *ACDS*-ГЕН, К АБИОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ

Е. С. Королева, Д. А. Руткевич, К. В. Приступа

Белорусский государственный университет, г. Минск;

katerina_koroleva96@mail.ru, rutkevichd@inbox.ru,

kristina.pristupa@mail.ru;

науч. рук. – Е. А. Храпцова, канд. биол. наук, доц.

Т. А. Кукулянская, канд. биол. наук, доц.

В свете возрастающего техногенного воздействия растения подвержены губительному влиянию абиотических стрессовых факторов, среди которых на данный момент наиболее опасными являются: засоление, засуха, патогены, тяжелые металлы. При воздействии на растения стресс-факторов образуется «стрессовый этилен», который приводит к ускорению процессов старения и гибели. Перспективным подходом является создание трансгенных растений, несущих бактериальный *acdS*-ген, кодирующий АЦК-дезаминазу АЦК-дезаминаза – фермент, участвующий в разрушении предшественника этилена и, таким образом, снижающий концентрацию «стрессового этилена».

Ключевые слова: трансгенные растения; АЦК-дезаминаза; этилен; *acdS*-ген; *Nicotiana tabacum*; *Pseudomonas putida*В-37.

ВВЕДЕНИЕ

Следствиями накопления «стрессового этилена» в растениях является не только ускорение старения, опадение листьев, но и снижение внешних морфологических характеристик, таких как длина стебля и корней. [1] В ряде научных исследований показано положительное влияние бактерий, содержащих в составе своего генома *acdS*-ген, на рост и развитие растений, произрастающих в стрессовых условиях [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Из ранее полученных трансгенных растений *N. tabacum* была выделена тотальная ДНК и клеточная РНК, которую очищали от геномной ДНК. Очищенную РНК использовали в качестве матрицы для построения кДНК. С полученной кДНК была проведена ПЦР со специфическими праймерами к целевому гену, а также РВ-ПЦР. Определялась удельная активность фермента АЦК-дезаминазы [3, 4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Трансгенные растения табака двух линий, выращенные на селективной канамицин-содержащей средепереносили в грунт и формировали следующие выборки: 1. Опыт – трансгенные растения табака, выращенные в условиях абиотического стресса, вызванного загрязнением почвы тяжелыми металлами (Cu^{2+} - 15 мг/кг; Cr^{6+} и Pb^{2+} - 30 мг/кг) и засолением почвы (200 мМ NaCl). 2. Контроль №1 – трансгенные растения табака, выращенные в условиях отсутствия стресса. 3. Контроль №2 – нетрансгенные растения табака, выращенные в условиях абиотического стресса, вызванного загрязнением почвы тяжелыми металлами (Cu^{2+} - 15 мг/кг; Cr^{6+} и Pb^{2+} - 30 мг/кг) и засолением почвы (200 мМ NaCl). 4. Контроль №3 – нетрансгенные растения табака, выращенные в условиях отсутствия стресса.

В ходе эксперимента выделялась клеточная РНК, которую далее использовали в качестве матрицы для ОТ-ПЦР. Синтезированная в результате ОТ-ПЦР кДНК в дальнейшей работе использовалась в качестве матрицы для ПЦР со специфическими праймерами к *acdS*-гену. По результатам анализа продуктов ПЦР методом гель-электрофореза было установлено наличие экспрессии целевого гена в трансгенных растениях табака во всех опытных выборках, подвергшимся условиям абиотического стресса. Следующим этапом было установление уровня транскрипционной активности *acdS*-гена. При постановке РВ-ПЦР в качестве референсного гена использовался ген домашнего хозяйства *Ef-1a*. Результаты РВ-ПЦР приведены на рисунке.

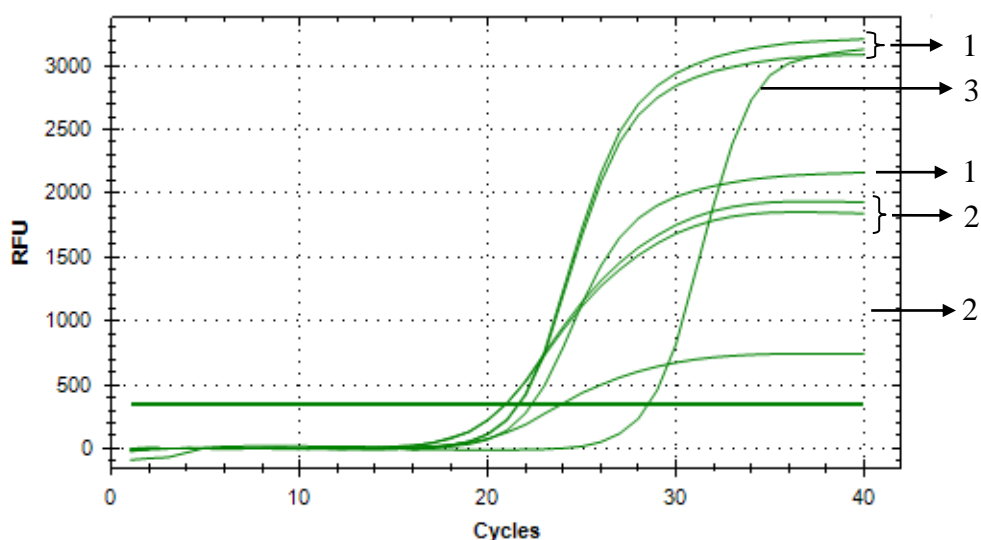


Рис. Уровень экспрессии бактериального *acdS*-гена:
1 – образцы, соответствующие исследуемому гену (*acdS*);
2 – образцы, соответствующие референс-гену (*Ef-1a*);
3 – отрицательный контроль (без матрицы)

Из представленного графика можно сделать вывод, что в клетках трансгенного растения табака идет эффективная экспрессия *acdS*-гена. Также стоит отметить, что оценку уровня экспрессии проводили с использованием метода прямого сравнения показателей Cq между *acdS*-геном и референс-геном (*Ef-1a*) по уравнению ниже.

$$2^{-(Cq(acdS)-Cq(Ef-1a))}$$

Сравнивая значения Cq для целевого и референс гена, было установлено, что *acdS*-ген экспрессируется эффективнее относительно *Ef-1a* в 1.1 раз.

Однако полученные данные не описывают активность фермента АЦК-деаминазы, кодируемого целевым геном. В результате ферментативного расщепления АЦК АЦК-деаминазой образуется два продукта: а-кетобутира и аммиак. Удельная активность АЦК-деаминазы определялась в тканях листьев растений по оптической плотности а-кетобутирата. Результаты, полученные в ходе исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1

Удельная активность АЦК-деаминазы в тканях листьев растений табака из опытной и контрольных выборок*

Серия	Активность АЦК-деаминазы в нетрансгенных растениях, нмоль/(мг белка×мин)	Активность АЦК-деаминазы в трансгенных растениях, нмоль/(мг белка×мин)	
		линия 4-12	линия 10-38
Без обработки почвы тяжелыми металлами и хлоридом натрия	0,017±0,006*	0,067 ±0,002*	0,072 ±0,003*
Обработка Cu ²⁺ в концентрации 5хПДК	0,020±0,005*	0,56 ±0,026*	0,60 ±0,027*
Обработка Cr ⁶⁺ в концентрации 5хПДК	0,022±0,007*	0,79 ±0,031*	0,82 ±0,034*
Обработка Pb ²⁺ в концентрации 5хПДК	0,021±0,006*	0,62 ±0,028*	0,69 ±0,032*
Обработка NaCl в концентрации 200 мМ	0,022±0,007*	0,74 ±0,030*	0,81 ±0,033*

* Различия достоверны при p<0,05.

Полученные результаты согласуются с литературными данными [5] и свидетельствуют о наличии в тканях растения функционально-активного продукта *acdS*-гена – АЦК-деаминазы – активность которого возрастает при наличии стрессовых условий.

Заключительным этапом работы стала оценка ростовых характеристик опытных и контрольных выборок табака. Значения ростовых характеристик растений приведены в графике 1.

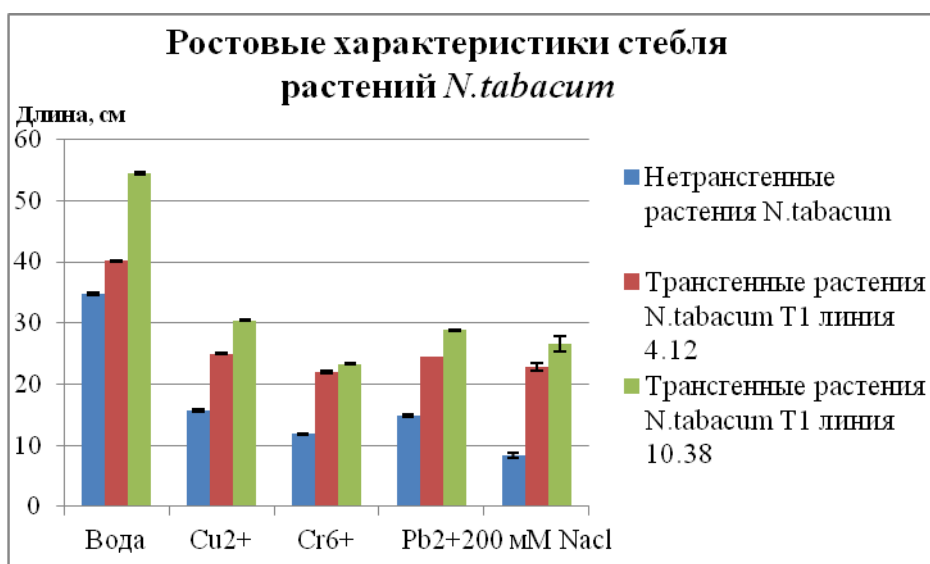


График 1.1. Ростовые характеристики растений *N. tabacum* опытных и контрольных выборок

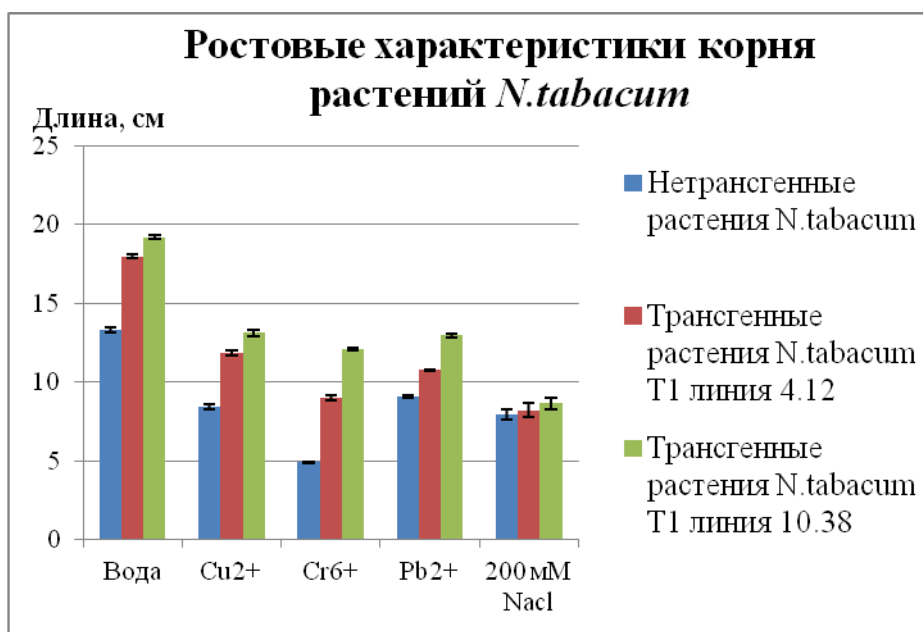


График 1.2. Ростовые характеристики растений *N. tabacum* опытных и контрольных выборок

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате анализа представленных результатов был сделан вывод о положительном влиянии бактериального *acdS*-гена на растения, испытывающие абиотический стресс. Также в ходе работы был отмечен более

ранний переход к цветению у трансгенных растений *N.tabacum*, выращенных в условиях отсутствия стресса, относительно нетрансгенных растений табака в аналогичных условиях.

Библиографические ссылки

1. *Glick B. R.* Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase // *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2007. Vol. 26. P. 227–242.
2. 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase from *Pseudomonas stutzeri* A1501 Facilitates the Growth of Rice in the Presence of Salt or Heavy Metals / Y. Han [et al.] // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015. Vol. 25 (7). P. 1119–1128.
3. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
4. *Honma M., Shimomura T.* Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid // *Agric. Biol. Chem.* 1978. Vol. 42, № 10. P. 1825–1831.
5. Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress / I. Gontia-Mishra [et al.] // *Bio-technol Lett.* 2014. Vol. 36. P. 889–898.