

## ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ NICOTIANA TABACUM, НЕСУЩИХ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ACDS-ГЕН, К ЗАГРЯЗНЕНИЮ ПОЧВЫ СОЛЯМИ НИКЕЛЯ

Д.А. Руткевич, Т.Е. Варфоломеева, В.В. Гордейко, Е.А. Храмова

Белорусский государственный университет  
Минск, Беларусь khramtsova@bsu.by

Отобранные на селективной среде трансгенные растения высаживались в грунт и подвергались абиотическому стрессу, вызванному загрязнением почвы солями никеля (7,26 мг соли  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  на 50 г почвы). Проведение реакции ОТ-ПЦР и РВ-ПЦР подтвердило транскрипционную активность бактериального *acdS*-гена в клетках трансгенных растений на уровне с референсным геном *Ef-1a*. Определение удельной активности АЦК-деаминазы, продукта экспрессии *acdS*-гена, подтвердило формирование активного фермента в тканях трансгенных растений табака. Было доказано положительное влияние *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* В-37 на трансгенные растения *N.tabacum* в условиях абиотического стресса.

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

## THE INVESTIGATION OF TRANSGENIC NICOTIANA TABACUM PLANTS, CARRING BACTERIAL ACDS-GENE, RESISTANCE TO NI-CAUSED SOIL POLLUTION

D.A. Rutkevich, T.E. Varfolomeeva, V.V. Gordeyko, E.A. Khramtsova

Belarusian State University  
Minsk, Belarus, khramtsova@bsu.by

Transgenic plants selected on a selective medium were planted in the soil and subjected to abiotic stress caused by soil contamination with heavy metal salts (7,26 mg  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  on 50 g of the soil). RT-PCR and PB-PCR reactions were conducted and confirmed the transcriptional activity of the bacterial *acdS*-gene in transgenic plant cells at a level with the reference gene *Ef-1a*. Determination of activity of ACC-deaminase, the product of expression of the *acdS*-gene, confirmed the formation of the active enzyme in the leaf tissues of transgenic tobacco plants. The beneficial effect of the *acdS*-gene of the bacteria *Pseudomonas putida* В-37 on transgenic *N.tabacum* plants under abiotic stress has been proven.

**Keywords:** ACC-deaminase; *Nicotiana tabacum*; ACDS-gene; *Pseudomonas putida*, abiotic stress.

Растения в течение своей жизни подвергаются различного рода биотическим и абиотическим стрессам (механические повреждения, засуха, засоленность почв и их затопление, загрязнение среды тяжелыми металлами и повреждения растений различного рода патогенами). При этом в растениях начинает активнее синтезироваться этилен, что приводит, в конечном итоге, к ускоренному старению и гибели. Этилен, осуществляет гормональную регуляцию процессов роста и развития растений, а также его старения, созревания плодов и цветов, опадения листьев. Содержание этилена регулируется многими факторами, в том числе содержанием  $\text{CO}_2$  в среде, где растет растение, степенью освещенности, а также некоторыми другими гормонами. В норме этилен в растениях содержится в очень маленьких дозах ( $<0,05$  мкл/л), уровень его повышается ( $\sim 100$  мкл/л) при созревании плодов и цветов, а так же при выращивании растений в условиях стресса. [1-3]

Тяжелые металлы являются одним из сильнейших абиотических стрессовых факторов, которые приводят к угнетению фотосинтеза роста и развития растений, а также их продуктивности. [4]. Кроме их собственной токсичности тяжелые металлы обладают кумулятивными свойствами, что впоследствии еще больше усугубляет их воздействие на живые системы. [4].

Среди тяжелых металлов в последние годы все большее внимание уделяется никелю, уровень загрязнения которым постоянно возрастает [5]. По токсичности для растений никель превосходит кадмий, ртуть и другие тяжелые металлы. Загрязнение никелем обусловлено его широким применением в промышленности при производстве нержавеющей стали, аккумуляторных батарей, электроники и др.

Развитие абиотического стресса сопровождается образованием избыточного количества этилена в растениях («стрессовый этилен»), что приводит к быстрому старению растений, пожелтению листьев и опадению плодов [2]. Снижение количества синтезируемого растением избыточного этилена могут осуществлять ризосферные бактерии, продуцирующие 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазу (АЦК-деаминазу). Данный фермент катализирует деаминирование непосредственного предшественника этилена 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата до аммиака и  $\alpha$ -кетобутирата, которые не оказывают на растения негативного влияния. [6].

Создание трансгенных растений, экспрессирующих бактериальный ген АЦК-деаминазы, является перспективным подходом к решению задачи по снижению уровня «стрессового» этилена, что, в свою очередь, должно приводить к повышению урожайности рекомбинантных посевных культур.

Таким образом, целью данной работы являлось изучение устойчивости трансгенных растений *Nicotiana tabacum* несущих *asdS*-ген бактерий *Pseudomonas putida* В-37 к загрязнению почвы солями никеля.

*Объекты исследования.* В качестве основных объектов исследований использовались трансгенные растения *N. tabacum* двух линий (10.38 и 4.12), полученных ранее. [7]

*Культивирование растений N. tabacum.* Проростки табака переносили на среду для корнеобразования и выращивали при 16-часовом световом дне при температуре  $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Сформированные растения высаживали в грунт.

*Создание условий абиотического стресса.* Растения разбивались на выборки. Обработка почвы солью никеля производилась однократно в концентрации 20 мг/кг. Для постановки эксперимента в каждую выборку брали 8 растений, имеющие одинаковые ростовые характеристики.

*Аmplификацию гена *acdS** производили с использованием следующих праймеров:

Forward: (Fatg) 5'-tccggatccatgaacctgaatcggtttraacgttatc-3'

Reverse: (Rtga) 5'-tccggatcctcagccgttgccgraacargaag-3'

Параметры циклов амплификаций: 5 мин при  $94^\circ\text{C}$  – 1 цикл;  $94^\circ\text{C}$ , 30 с;  $54^\circ\text{C}$ , 30 с;  $72^\circ\text{C}$ , 1 мин 30 с – 35 циклов;  $72^\circ\text{C}$ , 30 с – 1 цикл.

*Выделение растительной РНК*

Растительный материал растирали тонким металлическим шпателем. Добавляли 500 мкл буфера для экстракции, центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин. Отбирали водную фазу, добавляли к ней равный объем 4 молярного LiCl. Центрифугировали 30 мин при 10000 об/мин, к осадку добавляли 250 мкл  $\text{H}_2\text{O}$ , 25 мкл 3 М AcNa, pH 5,2 и 550 мкл 96 % этанола. Пробы центрифугировали 30 мин при 12000 об/мин. Осадок промывали 1 мл 70 % этанола. Образцы

центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин. Удаляли супернатант, подсушивали осадок и растворяли его в 40 мкл H<sub>2</sub>O.

#### *Синтез кДНК*

В стерильный эппендорф на льду добавляли в следующем порядке реактивы: мРНК – 0,1-5 нг, праймеры – 0,5 мкг, деионизированную воду – до 12,5 мкл. Затем добавляли 4 мкл 5X буфера для реакции, ингибитор РНКазы – 0,5 мкл, смесь нуклеотидов – 2 мкл, обратную транскриптазу – 1 мкл. Инкубировали 10 мин при 25 °С, 60 мин при 42 °С. Ингибировали реакцию нагреванием до 70 °С в течение 10 мин.

Для синтеза кДНК использовали обратную транскриптазу RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase, произведенную фирмой “Fermentas”.

#### *Количественная ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ)*

Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 25 мкл составляли следующим образом: 2×ПЦР-буфер Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (“ThermoScientific”, 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: 50 °С – 2 мин – 1 цикл; 95 °С – 10 мин – 1 цикл; 95 °С – 15 с; 55 °С – 30 с; 60 °С – 60 с - 40 циклов

Использованные праймеры:

RT-ATG-For1 - 5' – ATGAACCTGAATCGTTTTGAACGTTATC-3'

RT-ATG-Rev1 - 5' – CACTGTTGCAGTCTTCACGTTTG-3'

*Определение содержания белка в растительных гомогенатах проводили биуретовым методом*[13].

*Активность АЦК-деаминазы* оценивали по количеству α-кетобутирата, образующегося за 1 мин на 1 мг белка в растительном гомогенате при деаминаровании 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата. Количество α-кетобутирата определяли спектрофотометрически при 540 нм.

Концентрацию белка определяли по стандартному методу, [8]

**Результаты и обсуждение.** Первый этап работы был направлен на подбор минимальной концентрации соли NiCl<sub>2</sub>, которая оказывает негативное влияние на рост и развитие растений *N.tabacum*. Проростки трансгенных растений табака выращивали в стаканчиках, почва в которых была загрязнена солью никеля в различных концентрациях (3×10<sup>-3</sup> М, 3×10<sup>-4</sup> М, 1×10<sup>-4</sup> М, 3×10<sup>-5</sup> М, 1×10<sup>-5</sup> М). Было установлено, что минимальная концентрация соли NiCl<sub>2</sub> при которой росли растения *N.tabacum* составила 1×10<sup>-4</sup> М. Эта концентрация соли никеля в грунте была использована в дальнейших экспериментах по изучению устойчивости трансгенных растений *N.tabacum*, несущих бактериальный *acdS*-ген, к загрязнению почвы солями никеля.

Растения *N.tabacum* двух линий выращивали на селективной среде MS. После завершения формирования корневой системы растения высаживали в грунт для укоренения и постановки эксперимента. Укоренившиеся растения разбивались на несколько выборок: опытная выборка - трансгенные растения *N.tabacum* линии 10.38 и 4.12, выращенные в условиях загрязнения почвы солями никеля; контроль №1 - трансгенные растения *N.tabacum* линии 10.38 и 4.12, выращенные в условиях отсутствия загрязнения почвы солями никеля, контроль №2 - нетрансгенные растения *N.tabacum*, выращиваемые в условиях загрязнения почвы солями никеля и контроль №3 - нетрансгенные растения *N.tabacum*, выращиваемые в условиях отсутствия загрязнения почвы солями никеля.

Для доказательства наличия экспрессии бактериального *acdS*-гена в геноме трансгенных растений табака линий 10.38 и 4.12 из их листьев была выделена тотальная РНК, которая была использована для синтеза кДНК. Полученная кДНК двух трансгенных линий табака, выращенных в условиях абиотического стресса, была использована для постановки РВ-ПЦР. В качестве отрицательно контроля использовались пробы, не содержащие ревертазы. В качестве референсного гена использовался ген домашнего хозяйства *Ef-1a*. Полученные продукты РВ-ПЦР соответствовали ожидаемому размеру для *acdS*-гена, что свидетельствует об эффективной экспрессии *acdS*-гена в трансгенных линиях *N.tabacum*.

Для доказательства образования функционально-активного белкового продукта данного гена необходимо измерение активности фермента АЦК-деаминазы, кодируемой *acdS*-геном. Активность фермента была измерена как в опытных растениях трансгенного табака, выращенных в условиях абиотического стресса и условиях отсутствия стресса, так и в нетрансгенном табаке, выращенном в аналогичных условиях. Результаты представлены в таблице.

Таблица – Активность фермента АЦК-деаминазы в тканях листьев трансгенного табака и нетрансгенного табака

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 Ni <sup>2+</sup> в концентрации 5хПДК	0,020±0,005*	0,65 ± 0,029	0,67 ± 0,030*

Данные достоверны при уровне значимости  $p < 0,05$

Полученные данные свидетельствуют о возрастании активности АЦК-деаминазы в 9-10 раз в условиях абиотического стресса, вызванного загрязнением почвы солью никеля.

У растений всех выборок, выращенных в условиях загрязнения почвы солями никеля и при его отсутствии, провели измерение ростовых параметров растений: биомасса, длина корня и стебля. Эксперимент проходил в течении двух месяцев.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что все ростовые показатели у растений, выросших на среде, загрязненной никелем ниже таковых у растений, выросших при отсутствии стресса. Однако, ростовые характеристики у трансгенных растений, выросших в условиях повышенной концентрации никеля, превышают таковые у нетрансгенных растений. Показано, что длина корня, стебля и общая биомасса у них превышает таковые у нетрансгенных растений в 1,2, 1,19 и 1,34 раза, соответственно.

Таким образом можно заключить, что наличие в геноме бактериального *acdS*-гена действительно повышает устойчивость трансгенных линиях *N.tabacum* к абиотическому стрессу, вызванному загрязнением почвы тяжелыми металлами.

### Библиографические ссылки

1. Полевой В. В. Физиология растений. М.: Высшая школа, 1989. 464с.
2. Yang Sh., Hoffman N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants // Annual Reviews Inc., 1984. 155. 180p.
3. Glick B.R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase // FEMS Microbiology Letters. 2005. Vol. 251 P. 1–7.
4. Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М., Лайдинен Г.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам [отв. ред. Н.Н. Немова]; Институт биологии КарНЦ РАН. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. 172 с.
5. Состояние природной среды Беларуси: бюл. 2013 г. / Под. ред. В.Ф. Логинова. Минск, 2014. 364 с.
6. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria / B.R. Glick [et al.] // Eur J Plant Pathol. 2007. Vol. 119. 329–339.
7. Анализ экспрессии *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida*B-37 в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*. / Мельникова А. [и др.] // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2019. № 1. С. 45–53
8. 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.