

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ АЦК-ДЕЗАМИНАЗЫ НА ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ К ЗАГРЯЗНЕНИЮ СРЕДЫ ВЫСОКИМИ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ НИКЕЛЯ

Н. Ю. Бирюкова, Д. В. Стельмашенко

rusaknatalie12@gmail.com, darastelmashenko@gmail.com;

Научный руководитель – Е. А. Храмцова, кандидат биологических наук, доцент

В данной статье рассматривается влияние бактериальной АЦК-дезаминазы на повышение устойчивости трансгенных растений *Nicotiana tabacum* линии 10.46 к абиотическому стрессу, вызванному загрязнением среды высокими концентрациями никеля.

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

ВВЕДЕНИЕ

Этилен – важный фитогормон, который стимулирует рост и развитие растений. Однако при выращивании растений в условиях стресса его концентрация резко повышается, что пагубно влияет на процессы жизнедеятельности всего растительного организма. Такое избыточное количество фитогормона получило название «стрессовый этилен».

Фермент АЦК-дезаминаза, встречающийся в некоторых почвенных и ризосферных бактериях, способен расщеплять предшественник этилена – АЦК, в результате чего концентрация этилена резко снижается. Данный фермент не встречается в высших растениях.

Ранее были получены трансгенные растения *Nicotiana tabacum*, несущие *acdS*-ген бактерий *Pseudomonas putida* В-37, который кодирует фермент АЦК-дезаминазу.

Экспрессия *acdS*-гена, кодирующего АЦК-дезаминазу, в трансгенных растениях является альтернативным подходом к преодолению этилен-индуцированного стресса.

Токсическое действие избытка тяжелых металлов – один из важнейших стресс-факторов для растений. Среди тяжелых металлов все большее внимание уделяется никелю, уровень загрязнения которым все время возрастает. Никель в небольших количествах необходим для нормального функционирования растений, однако высокие концентрации никеля оказывают на большинство растений сильное токсическое действие.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Из ранее полученных трансгенных растений *N.tabacum* линии 10.46, 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 [1,2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Первым этапом работы был подбор концентрации никеля, в ходе которого было выяснено, что при содержании никеля в среде $1 \cdot 10^{-3}$ М трансгенные растения погибали, а при концентрациях $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-4}$ М растения выживали. В связи с этим, дальнейшие исследования проводили при максимальной концентрации никеля при которой растения выживали – $5 \cdot 10^{-4}$ М.

Для отбора трансгенных растений семена высевали на селективную среду, несущую канамицин в концентрации 50 мкг/мл.

Проростки, выросшие на MS-среде с канамицином переносили на среду, содержащей никель. Одновременно с трансгенными растениями высевались и нетрансгенные.

Проростки выращивали при температуре $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течении 16-часового светового дня.

Для доказательства наличия *acdS*-гена в геноме выращенных растений была выделена из них ДНК и проведена ПЦР со специфическими праймерами к *acdS*-гену.

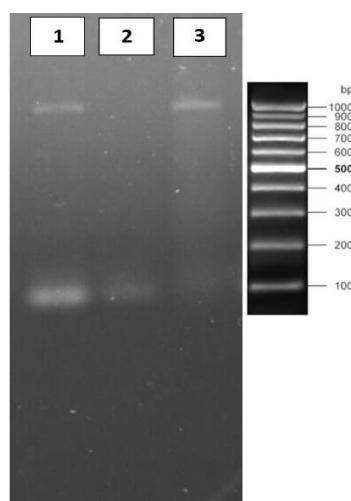


Рис. 1. Фрагмент целевого гена *acdS*, полученный при помощи ПЦР:
1 – фрагмент *acdS*-гена из трансгенного растения *N. tabacum* линии 10.46; 2 – нетрансгенный *N. tabacum*; 3 – фрагмент *acdS*-гена из плазмиды pBI121

В ходе ПЦР были получены фрагменты ДНК размером 1000 п.н., которые соответствуют размеру целевого гена. Таким образом, доказано

наличие *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* В-37 в геноме трансгенных растений *Nicotiana tabacum* линии 10.46 (рис. 1).

Чтобы узнать насколько эффективно происходит экспрессия *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* В-37 в растениях *Nicotiana tabacum* линии 10.46, провели ПЦР в реальном времени. Для этого необходимым этапом работы являлось выделение РНК.

Очищенную РНК использовали в качестве матрицы для обратной транскрипции. На первом этапе к РНК, растворенной в деионизированной воде, добавляли ДНКазу для очистки пробы от ДНК.

Для проведения ПЦР в реальном времени мы использовали набор реактивов (ArtMix-RT), который не требует отдельного синтеза кДНК, так как данный процесс происходит непосредственно в амплификаторе.

В качестве отрицательного контроля использовали пробу, которая в своем составе содержит все составляющие реакционной смеси кроме матрицы. В качестве положительного контроля использовали ген домашнего хозяйства *Ef-1α*. Это ген альфа субъединицы фактора элонгации трансляции.

Исходя из полученных результатов (рис. 2) можно сделать вывод, что экспрессия целевого гена трансгенной линии табака 10.46 происходит на уровне сопоставимом с референсным геном домашнего хозяйства. Что свидетельствует об эффективной экспрессии *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* В-37 в геноме растений *Nicotiana tabacum*.

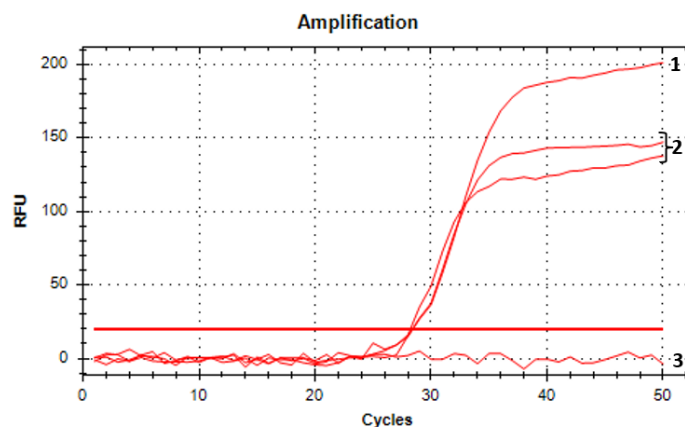


Рис. 2. Определение эффективности экспрессии *acdS*-гена с помощью ПЦР в реальном времени:

1-положительный контроль; 2 – образец, соответствующий целевому гену; 3 – отрицательный контроль

Для доказательства образования функционально-активного белкового продукта данного гена необходимо измерение активности фермента АЦК-деаминазы, кодируемой *acdS*-геном [3].

Активность фермента была измерена как в опытных растениях трансгенного табака, выращенных в условиях абиотического стресса и в

условиях отсутствия стресса, так и в нетрансгенном табаке, выращенном в аналогичных условиях.

Согласно полученным данным, активность АЦК-деаминазы в листьях и корнях трансгенного табака повышается в условиях стресса в 6,8 и 8,8 раз соответственно, что объясняется активацией фермента в следствие появления для него необходимого субстрата в избыточном количестве.

Таким образом, показано, что в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum* образуется функционально-активный фермент АЦК-деаминаза.

Исходя из того, что бактериальный *acdS*-ген эффективно экспрессируется в геноме трансгенных растений, а также синтезируется функционально активный фермент, можно сделать предположение, что бактериальная АЦК-деаминаза за счет снижения уровня этилена в растениях будет повышать их устойчивость к стрессу и их ростовые показатели будут превышать таковые у контрольных растений, выращенных в среде, загрязненной высокими концентрациями никеля.

Следующим этапом работы явилось изучение ростовых характеристик опытных и контрольных растений, выращенных при высоких концентрациях никеля в среде. Проростки выращивали в течении 8 недель.

Были получены следующие результаты: длина корня, стебля и биомасса трансгенных растений, выросших в почве, содержащей Ni^{2+} превышает таковые у нетрансгенных в 2.7, 1.2, и 2.8 раз соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, экспрессия *acdS*-гена *Pseudomonas putida* B-37 в геноме *Nicotiana tabacum* приводит к повышению их устойчивости к абиотическому стрессу, вызванному высокими концентрациями никеля в среде.

Библиографические ссылки

1. 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.
2. Honma M., Shimomura T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid // Agric. Biol. Chem. 1978. Vol. 42, № 10. P. 1825–1831.
3. Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress / I. Gontia-Mishra [et al.] // Biotechnol Lett. 2014. Vol. 36. P. 889–898.