

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТОМАТОВ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ *pRh6*, В БИОРЕМЕДИАЦИИ

З.Р. Вершинина, Л.Р. Хакимова, О.В. Чубукова

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

Фиторемедиация представляет собой устранение, обезвреживание или перевод в менее токсичную форму экополютантов с помощью растений. Данный метод достаточно часто применяют в случаях загрязнения почв тяжелыми металлами (ТМ), используя растения-гипераккумуляторы тяжелых металлов для восстановления биологической продуктивности экосистем. Фактором, который в наибольшей степени ограничивает эффективность фиторемедиации, является низкая доступность тяжелых металлов из почв. Эту проблему можно решить с помощью трансформации растений генами, которые могут способствовать накоплению тяжелых металлов в тканях, в частности это гены синтеза фитохелатинов, глутатиона и металлотионеинов. Известно, что γ -глутамилцистеинсинтетаза, глутатионсинтетаза, цистатионинсинтаза, АТФ-сульфилаза, серин-ацетилтрансфераза, глутатионредуктаза, фитохелатинсинтаза и глиоксалаза являются потенциальными кандидатами для обеспечения резистентности к тяжелым металлам. Сверхэкспрессия генов, кодирующих эти ферменты, способствовала повышению устойчивости разных растений и накоплению в них тяжелых металлов [1].

При воздействии тяжелых металлов на растения начинают синтезироваться особые небольшого размера пептиды, которые выполняют строго определенные функции, связывая ионы металлов и транспортируя их к месту назначения. Одними из таких металлсвязывающих пептидов являются фитохелатины. Первичная структура фитохелатинов представляет собой небольшой, богатый цистеином пептид, способный связывать ионы тяжелых металлов через SH-группы. Кроме того фитохелатины характеризуются наличием γ -пептидной связи, что усложняет их биосинтез в клетках. Ранее уже проводились эксперименты с химически синтезированными генами, кодирующими аналоги природных фитохелатинов с α -пептидной связью (псевдофитохелатины), что позволяло им синтезироваться с участием рибосомного аппарата клетки. Детальные эксперименты показали, что эти пептиды связывают различные металлы так же, как и природные фитохелатины и нарабатываются в клетках в большем количестве [2]. Ранее в нашей лаборатории был сконструирован вектор для трансформации растений с геном псевдофитохелатина *pRh6* с формулой $\text{Met}(\alpha\text{-Глу-Цис})_6\text{Гли}$ [3].

Томат (*Solanum lycopersicum* L.) является одной из важнейших овощных культур в сельском хозяйстве многих стран. В связи с распространением загрязнения почв ТМ, в последние годы стали популярны исследования, посвященные накоплению ТМ в растениях томата, а также потенциальному использованию томатов к фиторемедиации, в том числе совместно с бактериями или грибами – микросимбионтами. Интересно, что практически все популярные сельскохозяйственные культуры семейства Solanaceae оказались небезопасными для потребления в пищу из-за их способности к фитоэкстракции ТМ при выращивании на загрязненных почвах [4].

Целью работы было получение трансгенных по гену *pRh6* растений томата сорта Грунтовый Грибовский 1180 методом агробактериальной трансформации и анализ устойчивости полученных линий к воздействию кадмия.

Материалы и методы. Агробактериальную трансформацию томата осуществляли согласно статье [5]. В качестве эксплантов для трансформации были использованы семядоли недельных проростков.

Семена контрольных (нетрансгенных) и полученных гомозиготных по гену *pRh6* трансгенных линий для дальнейших экспериментов стерилизовали и проращивали в контейнерах с прокаленным вермикулитом при температуре 25 °C и 16-часовом световом дне в климатической камере KBW 240 (Binder). Проростки поливали раствором MS с 0,3 % сахарозы (масс.). В возрасте двух недель растения пересаживали в водную культуру в сосуды объемом 5 л (по 5 растений на сосуд), заполненные MS без сахарозы. Величину pH растворов поддерживали на уровне 5,7–5,8. Культивирование проводили в течение при температуре 25 °C и 16-часовом световом дне в климатической камере KBW 240 (Binder).

Эксперименты по воздействию Cd и проводили на растениях, достигших 3-недельного возраста. Проростки переносили на MS без сахарозы (сосуды объемом 5 л по 5 растений на сосуд, pH 5,7–5,8 при постоянной аэрации) с добавлением CdCl₂ согласно схеме опыта. Концентрации вносимого в растворы Cd²⁺ составили 0 (контроль), 5, 10, 15 и 20 мкМ, продолжительность эксперимента – 7 суток. По окончании эксперимента проводили сьем опыта. Растения разделяли на части – корни и побеги. Далее растительный материал фиксировали при 105 °С в течение 1 часа, высушивали при 70 °С в течение 24 часов до абсолютно сухого веса и взвешивали.

Результаты и их обсуждение. Эффективность использованного метода трансформации томата сорта Грунтовый Грибовский 1180 составила 2,5 %, было получено 5 независимых гомозиготных по гену *rph6* линий растений, экспрессирующих целевой псевдофитохетатин.

Для оценки эффективности использования *rph6* в качестве трансгена для фиторемедиации был проведен анализ биомассы контрольных и трансгенных линий растений при воздействии кадмия. Было показано, что биомасса всех изучаемых линий, в том числе и контрольных, в условиях отсутствия кадмия в почве не отличается. Похожий результат был получен и в экспериментах, где концентрация кадмия составляла 5 мкМ. При воздействии 10–20 мкМ кадмия трансгенные растения нарабатывали в среднем на 15 % большую биомассу надземной части, чем контрольные растения. При этом биомасса корней у растений, несущих *rph6*, была больше на 22 %, чем у нетрансформированных томатов. Внешне трансгенные растения выглядели более здоровыми – их листья были меньше признаков хлороза. Наилучшие результаты по устойчивости проростков к воздействию кадмия наблюдались для линий 1 и 3.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что линии трансгенных томатов 1 и 3 целесообразно использовать в дальнейших экспериментах по изучению накопления кадмия в растениях с целью повышения эффективности фиторемедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами.

Работа была выполнена в рамках госзадания (№ гос. регистрации AAAA-A21-121011990120-7).

Литература

1. Wawrzyński A., Kopera E., Wawrzyńska A., Kamińska J., Bal W., Sirko A. Effects of simultaneous expression of heterologous genes involved in phytochelatin biosynthesis on thiol content and cadmium accumulation in tobacco plants // Journal of experimental botany. 2006. V. 57(10). P. 2173–2182.
2. Постригань Б.Н., Князев А.В., Кулуев Б.Р., Яхин О.И., Чемерис А.В. Клонирование и активность синтетического псевдофитохелатинового гена в модельных растениях табака // Физиология растений. Т. 59 (2). 2012. С. 303–308.
3. Вершинина З.Р., Хакимова Л.Р., Чубукова О.В. Трансгенные растения амаранта – аккумуляторы кадмия // Актуальная биотехнология. 2020. № 3 (34). С. 412–415.
4. Вершинина З.Р., Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Каримова Л.Р., Федяев В.В., Баймиев Ан. Х., Баймиев Ал. Х. Взаимодействие томатов (*Solanum lycopersicum* L.), трансформированных RapA1, с бактериями *Pseudomonas* sp. 102, устойчивыми к высоким концентрациям кадмия, как основа эффективной симбиотической системы для фиторемедиации // Биотехнология. 2019. Т. 35. № 2. С. 38–48.
5. Хакимова Л.Р., Чубукова О.В., Вершинина З.Р. Получение трансформированных геном *rapA1* растений томатов // Biomix. 2021. Т.13(2). С. 153–158.