

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ АМАРАНТА – АККУМУЛЯТОРЫ КАДМИЯ

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

Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, Уфа, Россия

На сегодняшний день чрезвычайно актуален поиск методов и подходов для избавления окружающей среды от экопеллютантов. Фиторемедиация представляет собой устранение, обезвреживание или перевод в менее токсичную форму экопеллютантов 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 [1]. Факторами, которые в наибольшей степени ограничивают эффективность фиторемедиации, являются недостаточное накопление биомассы растениями и низкая доступность тяжелых металлов из почв. Эти проблемы можно решить с помощью бактерий, которые принимают непосредственное участие в биогеохимическом цикле тяжелых металлов и могут в значительной степени увеличить их доступность для растений [2]. При этом если данные бактерии будут обладать ростостимулирующими свойствами, это может повысить устойчивость растений к стрессам, вызванным тяжелыми металлами, и будет способствовать накоплению биомассы.

Известно, что 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 [3]. В рамках данного исследования геном псевдофитохелатина *pph6* с формулой Мет (α -Глу-Цис) 6Гли были трансформированы растения амаранта, а также штаммы клубеньковых бактерий (ризобий), обладающие ростостимулирующей активностью: *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ТНу1, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ТНу2. Кроме того в экспериментах были использованы ранее полученные растения амаранта и ризобии, трансформированные геном бактериального агглютинина *rapA1* [4–6].

Цель работы – оценка эффективности применения трансформированных генами *pph6* и *rapA1* растений амаранта в фиторемедиации почв, загрязненных кадмием, в том числе в рамках ассоциативного симбиоза с ризобиями, вырабатывающими псевдофитохелатин или адгезин *RapA1*, повышающий устойчивость симбиотических систем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты по воздействию кадмия и ризобий проводились на растениях, достигших 6-недельного возраста. Корни проростков выдерживались в течение 1 ч в суспензии ризобий (10^5 КОЕ/мл в среде УМ). Часть проростков оставляли необработанными в качестве контроля. После инокуляции растения переносили в емкости с 1 л почвы с добавлением $CdCl_2$ согласно схеме опыта. Концентрации вносимого в почву Cd^{2+} составили 0 (контроль), 5, 10 и 20 мг/кг; продолжительность эксперимента – 30 суток. По окончании экспериментов растения были разделены на 2 части – корни и побеги. Корни отмывали в 0,1 мМ растворе $CaCl_2$ и в дистиллированной воде для удаления кадмия, адсорбированного на их поверхности. 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. Для определения содержания кадмия в растениях подготовка проб для анализа проводилась методом сухого озоления: 200 мг сухого материала измельчали в фарфоровой ступке и сжигали при 500 °С в муфельной печи в течение 4 часов. Определение содержания кадмия проводилось методом инверсионной полярографии с использованием вольтамперометрического анализатора «Экотест-ВА» с программируемым роботизированным автосамплером АС-01/3Д и углеродным электродом «три в одном» (НПП «Эконикс-Эксперт», Россия) согласно инструкции по использованию прибора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инокуляция ризобиями положительно влияла на накопление сухой биомассы в экспериментах без добавления кадмия. Обработка Cd²⁺ снижала биомассу растений, но инокуляция ризобиями позволяла в разной мере преодолевать токсическое действие этого тяжелого металла. Наилучшие результаты были получены для бактерий, трансформированных геном *rapA1*, который положительно влияет на колонизацию бактериями корней растений (рис. 1).

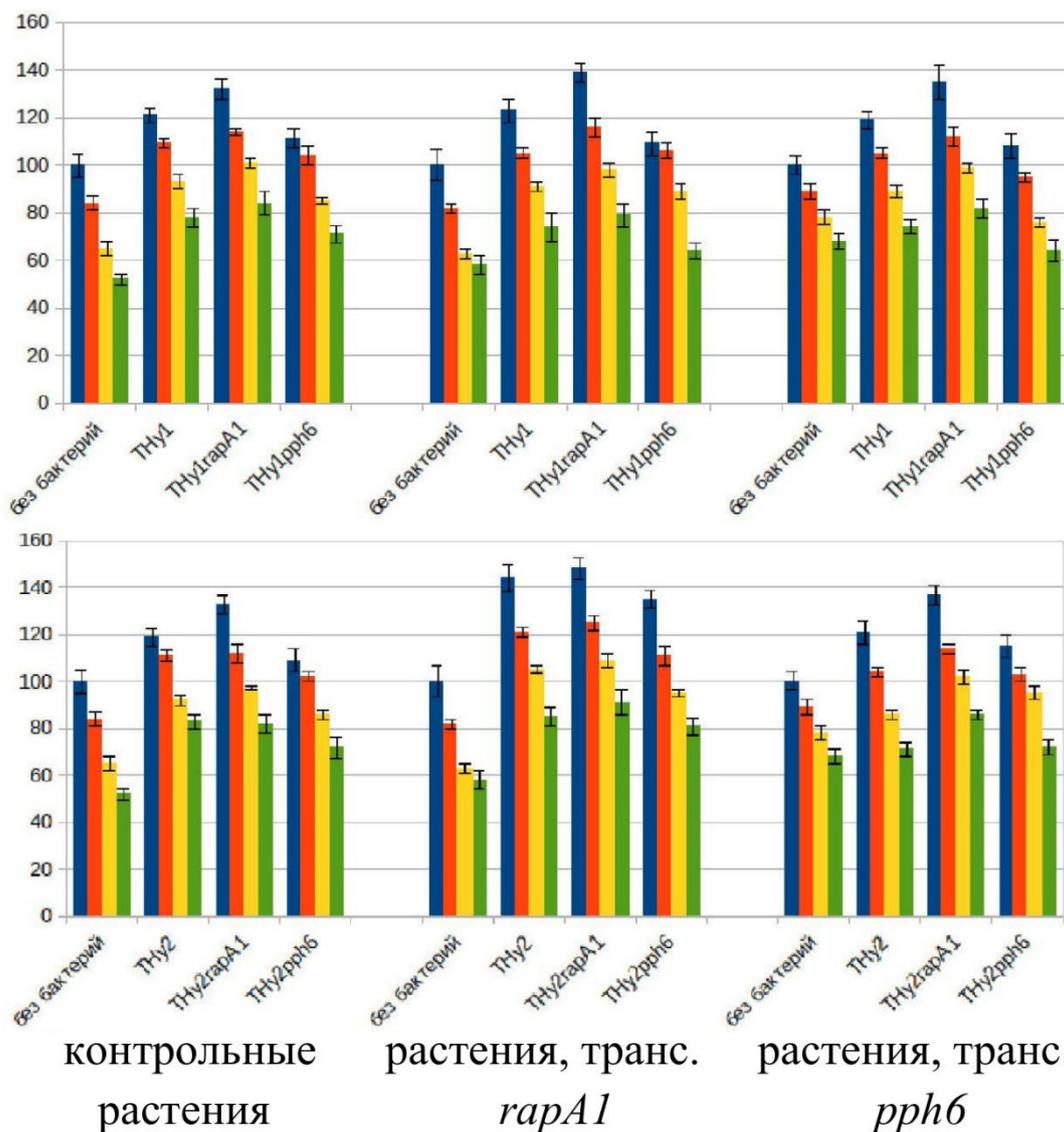


Рис. 1. Сухая биомасса растений амаранта в зависимости от концентрации кадмия и выбранного микросимбионта (по оси ординат – биомасса растений амаранта в %)

Штаммы, трансформированные *pph6*, увеличивали содержание кадмия в корнях растений, но при этом накопление в побеге уменьшалось до 50 %. Растения, трансформированные *pph6*, накапливали больше кадмия в побегах, однако совместное использование и растений и бактерий, трансформированных *pph6*, нивелировало данный положительный эффект (рис. 2).

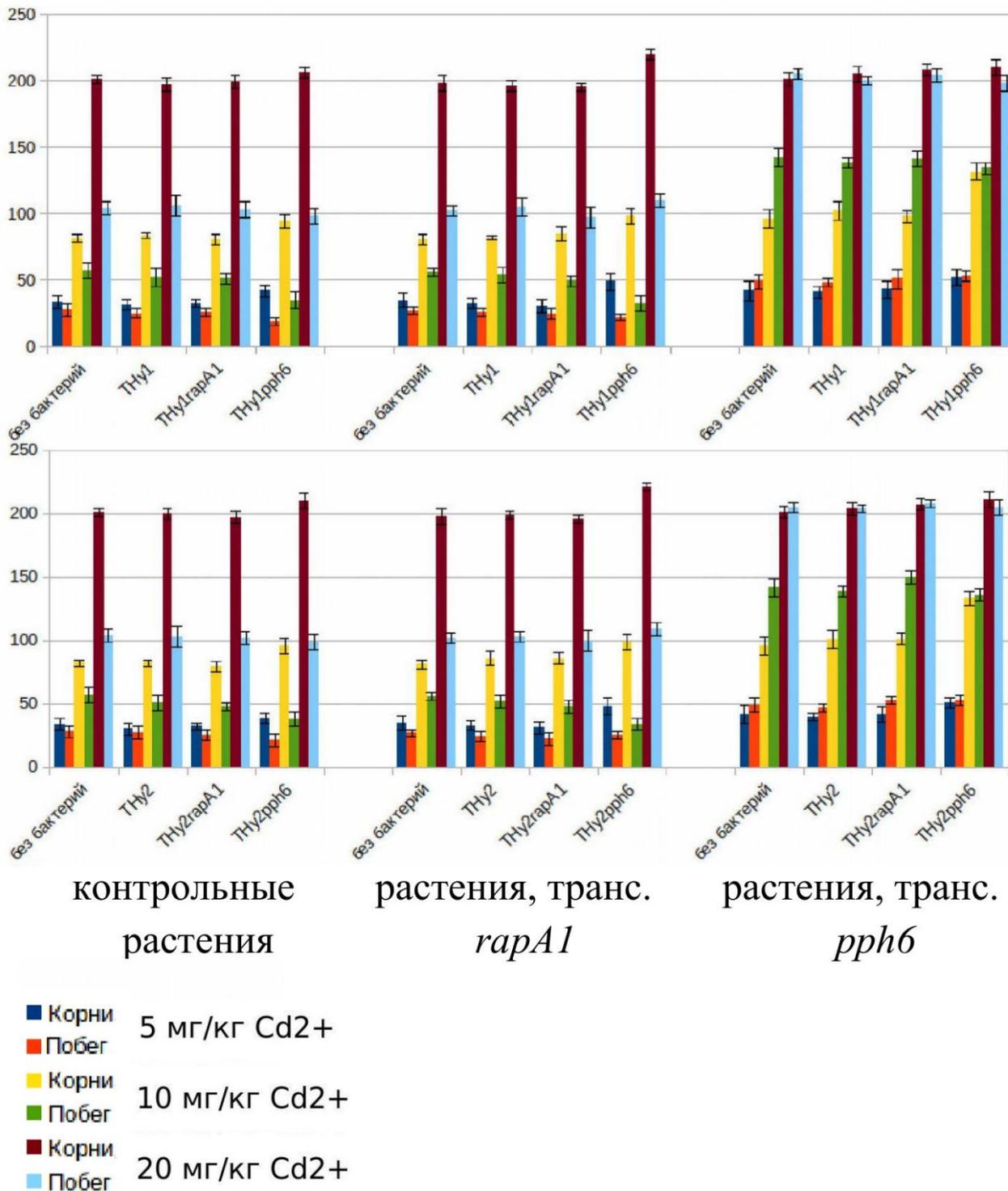


Рис. 2. Анализ содержания кадмия в растениях амаранта методом инверсионной полярографии (по оси ординат – содержание кадмия, мг/кг сухой массы растений амаранта)

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что для фиторемедиации почвы целесообразно использовать растения, трансформированные *pphb*, совместно с бактериями, трансформированными *rapA1*. Использование бактерий, трансформированных *pphb*, применимо в тех случаях, когда необходимо накопление тяжелых металлов в корнях или в когда требуется уменьшить содержание тяжелых металлов в надземной части растений.

Работа была выполнена в рамках госзадания (тема № АААА-А16-116020350028-4) при финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований № 18-34-00033 мол_а, № 18-34-20004 мол_а_вед.

ЛИТЕРАТУРА

1. Li C., Ji X., Luo X. Phytoremediation of Heavy Metal Pollution: A Bibliometric and Scientometric Analysis from 1989 to 2018 // International Journal of Environmental Research and Public Health. 2019. V. 16(23). P. 4755. doi:10.3390/ijerph16234755
2. Manoj S.R., Karthik C., Kadirvelu K., Arulselvi P.I., Shanmugasundaram T., Bruno B., Rajkumar M. (2020). Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. Journal of environmental management. 2020. V. 254. P. 109779. doi:10.1016/j.jenvman.2019.109779
3. 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.
4. Вершинина З.Р., Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Каримова Л.Р., Федяев В.В., Баймиев А.Х., Баймиев А.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. doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-2-38-48
5. Вершинина З.Р., Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Каримова Л.Р., Сербяева Э.Р., Сафронова В.И., Шапошников А.И., Баймиев Ан. Х., Баймиев Ал. Х. Влияние конститутивной экспрессии гена *rapA1* на образование бактериальных биопленок и ростостимулирующую активность ризобий // Микробиология. 2019. № 1 (88). С. 62–71. doi: 10.1134/S0026365619010105
6. Vershinina Z., Khakimova L., Lavina A., Baymiev A. *Raphanus sativus* and *Amarantus sanguineus* transgenic plants transformed with *psl* gene // FEBS OPEN BIO. 2019. V. 9. P. 282–283. doi:10.1002/2211-5463.12675