

Создание микробно-растительных сообществ для фиторемедиации

Л. Р. Хакимова^{1*}, Д. К. Благова¹, А. М. Лавина¹, Э. Р. Сербаева²,
Л. Р. Садыкова¹, З. Р. Вершинина¹, Ал. Х. Баймиев¹

¹Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 71.

²Башкирский государственный университет

Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

*Email: lili-nigmatullina@bk.ru

Фиторемедиация – является экологичным и недорогим методом очистки загрязненных почв от тяжелых металлов (ТМ). При этом используются растения-гипераккумуляторы, способные накапливать ТМ. Использование синтетических псевдофитохелатиновых генов (*pph*) потенциально может повысить доступность ТМ для растений. В статье описано создание вектора pCambia1305.1-*pph6* для получения трансгенных модельных растений табака. В результате показано, что при концентрации кадмия в почве 100 мкМ трансформированные растения, экспрессирующие ген *pph6*, накапливали кадмий на 35% больше, чем контрольные растения.

Ключевые слова: фиторемедиация, тяжелые металлы, кадмий, ген *pph6*.

В настоящее время все более актуальной становится проблема загрязнения почв тяжелыми металлами (ТМ), в частности кадмием (Cd) и никелем (Ni), которые токсичны для всех живых организмов и вызывают тяжелые заболевания животных и человека. В связи с этим, несомненно, актуальным является разработка эффективных методов для очистки загрязненных территорий от ТМ. В связи с этим, для очистки и стабилизации загрязненных участков наиболее привлекательным выглядит применение растений, или «фиторемедиация» [1, 4]. В последнее время разрабатываются различные подходы, обеспечивающие повышение эффективности фиторемедиационных мероприятий путем, например, использования растений-гипераккумуляторов, способных накапливать без ущерба для своего развития значительные количества ТМ, и, таким образом, способствовать их выведению из почвы, что позволит осуществлять очистку загрязненных территорий [2].

Для повышения фиторемедиационной эффективности растений-гипераккумуляторов ТМ с одной стороны целесообразна трансформация растений фитохелатиновыми генами, кодирующими синтез металлсвязывающих пептидов. С другой стороны, трансформация симбиотических почвенных бактерий, обладающих полезными для растений свойствами, генами фитохелатинов потенциально может повысить доступность

ТМ для растений. Отметим, что большинство фитохелатинов характеризуются присутствием в молекуле гамма-пептидной связи, что усложняет их синтез в клетках. Поэтому для трансформации растений и симбиотических бактерий наиболее перспективным является использование синтетических псевдохелатиновых генов, обеспечивающих матричный синтез фитохелатинов без гамма-пептидной связи, что упрощает синтез данных белков, но, тем не менее, сохраняет способность связывать ТМ [3].

Цель исследования

Получение растений табака, трансформированных геном псевдофитохелатина *pph6*.

Материалы и методы

Ранее в нашей лаборатории были сконструированы псевдофитохелатины с общей формулой $\text{Met}(\alpha\text{-Глу-Цис})_4\text{Гли}$ [3]. В рамках данного исследования был выбран псевдофитохелатин со следующей последовательностью аминокислот – $\text{Met}(\alpha\text{-Глу-Цис})_6\text{Gly}$ и с учетом частот встречаемости тех или иных кодонов в растениях была воссоздана его нуклеотидная последовательность. Для конструирования и клонирования данного псевдофитохелатинового гена, названного *pph6*, были синтезированы соответствующие комплементарные друг другу олигонуклеотидные блоки (P6ph1 и P6ph2). Для детекции гена *pph6* использовали короткие праймеры P6F: 5'CATGGAATGCCGAATG3' и P6R: 5'CTTAGCCGCATTCGCA3'. Ген *pph6* был клонирован в векторную конструкцию pCambia1305.1. Полученной плазмидой pCambia1305.1-*pph6* были трансформированы клетки *Agrobacterium tumefaciens* AGL0, которые в дальнейшем были использованы для стандартной агробактериальной трансформации растений табака [5]. Наличие гена *pph6*, встроенного в геном растений, проверялось методом ПЦР. Полученные трансформанты были использованы в эксперименте по оценке устойчивости к ТМ растений табака. Для этого листовые пластинки опытных и контрольных растений в течение месяца культивировали на среде МС с добавлением 1 мг/л 6-БАП и 0.1 мг/л НУК, содержащей различные концентрации кадмия (100, 200, 300, 400 мкМ Cd^{2+}).

Результаты и обсуждения

В качестве модельного растения было выбрано растение табака, как удобное для трансформации лабораторное растение. В росте листовых пластинок контрольных и опытных растений табака на различных концентрациях Cd^{2+} были выявлены существенные различия. При концентрации 100 мкМ особых различий между развитиями опытной и контрольной групп не было. С концентрацией 200 мкМ были заметны явные различия между опытной и контрольной группами: рост контрольной группы подавлялся и шел медленно, тогда как в опытной группе наблюдались четкие признаки роста и дифференциации. В экспериментах с экстремальными концентрациями кад-

мия 300 и 400 мкМ практически все растения погибли в течение месяца и не было никаких признаков регенерации листовых пластинок. Ввиду этого, можно заключить, что на концентрациях металла примерно 200мкМ трансформированные растения развиваются лучше контрольных, что говорит об устойчивой работе псевдофитохелатинового гена, повышающего их устойчивость к стрессу из-за избытка ТМ.

Для оценки накопительных свойств растений табака, трансформированных геном *pph6*, их выращивали на почве, содержащей 100 мкМ кадмия. Результаты экспериментов показали, что в трансформированных растениях, экспрессирующих псевдофитохелатиновый ген, кадмия накапливается на 35% больше, чем в контрольных растениях. Данные показатели на 5% больше, чем в случае использования псевдофитохелатина с общей формулой $\text{Met}(\alpha\text{-Глу-Цис})_4\text{Гли}$, что возможно объясняется увеличением длины кадмий-связывающей цепи сконструированного нами псевдофитохелатина $\text{Met}(\alpha\text{-Глу-Цис})_6\text{Гли}$.

В дальнейшем предполагается создание рекомбинантных по гену псевдофитохелатина *pph6* почвенных бактерий и растений-гипераккумуляторов, трансформированных геном адгезина, способствующему прикреплению бактериальных клеток к корневым волоскам растений, например, геном *gapA1*, с целью создания новых устойчивых симбиотических систем для фиторемедиации.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов РФФИ-Инициативный - № 16-04-00902 А и РФФИ № 18-34-00033 мол.а.

Литература

1. Андреева И. В., Байбеков Р. Ф., Злобина М. В. Фиторемедиация почв, загрязненных тяжелыми металлами // Мелиорация и рекультивация, экология. 2009. № 5. С. 5–10.
2. Коротченко И. С., Львова В. А. Миграция кадмия и никеля в растениях-фиторемедиантах // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015. №11. С. 251–254.
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. 2012. Т. 59. №2. С. 303–308.
4. Сунгурцева И. Ю., Любунь А. Ю., Муратова А. Ю., Плешакова Е. В. Исследование динамики биоаккумуляции кадмия (II) ризобактерией *Baccillus sp.14* // Изв.Сарат.ун-та. Сер.Химия. Биология. Экология. 2015. Т. 15 (4). С. 74–77.
5. Horsh R. B., Fry J. E., Hoffmann N. L., Eichholtz D., Rogers S. C., Fraley R. T. A simple and general method for transferring genes into plants // Science. 1985. V. 227. P. 1229–1231.

Creation of microbial-plant communities for phytoremediation

L. R. Khakimova^{1*}, D. K. Blagova¹, A. M. Lavina¹, E. R. Serbaeva²,
L. R. Sadykova¹, Z. R. Vershinina¹, Al. Kh. Baimiev¹

¹*Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS*

71 Oktyabrya Avenue, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

²*Bashkir State University*

32 Zaki Validi Street, 450074 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

**Email: lili-nigmatullina@bk.ru*

Phytoremediation is an environmentally friendly and inexpensive method for cleaning soils contaminated by heavy metals (HM). For phytoremediation using superaccumulator plants capable of accumulating HM is promising. The using of synthetic pseudophytochelate genes (*pph*) can potentially increase the availability of HM for plants. The article describes the creation of the vector pCambia1305.1-*pph6* for obtaining of transgenic model tobacco plants. As a result, at 100 μM concentration of cadmium in the soil, transformed plants expressing the *pph6* gene accumulated cadmium 35% more than the control plants.

Keywords: phytoremediation, heavy metals, cadmium, *pph6* gene.