

Г.Г. БРИЧКОВА, А.М. ШИШЛОВА,  
Т.В. МАНЕШИНА, Н.А. КАРТЕЛЬ

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск  
E-mail: n.kartel@igc.bas-net.by

## ТОЛЕРАНТНОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА К АЛЮМИНИЮ



*В результате введения в табак конструкций, содержащих гены рамнолипидов (rhIA и rhIB), получены генетически модифицированные растения, толерантные к высоким концентрациям алюминия. При концентрации алюминия 200 мМ в ионитной почве контрольные растения полностью погибли. В то же время трансгенные растения, хотя и были угнетены, продолжали расти и дали семена.*

© Г.Г. БРИЧКОВА, А.М. ШИШЛОВА, Т.В. МАНЕШИНА,  
Н.А. КАРТЕЛЬ, 2007

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2007. № 3

**Введение.** Среди биосурфактантов, продуцируемых микроорганизмами, большой практический интерес представляют рамнолипиды. Они относятся к гликолипидам — низкомолекулярным веществам, которые состоят из моно- и дисахаридной части, связанной с длинной цепью алифатических кислот или гидроалифатических жирных кислот. Благодаря своим сурфактантным, т.е. поверхностно-активным или эмульсифицирующим свойствам, они находят применение при производстве косметических изделий, медицинских препаратов, моющих средств, красок, продуктов питания, а также могут с успехом использоваться в сельском хозяйстве, целлюлозно-бумажной и деревообрабатывающей промышленности.

Особый интерес рамнолипиды представляют как биосурфактанты для биоремедиации загрязненных территорий — почв и водных поверхностей.

Известно много примеров успешного использования микроорганизмов, продуцирующих рамнолипиды для деградации нефти и углеводородов [1–4], биоремедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами, деградации других органических веществ в почве и воде [5, 6]. Показано также, что бактерия *Pseudomonas aeruginosa* продуцирует рамнолипиды, которые проявляют антимикробную и антибактериальную активность [7, 8].

В последние годы интенсивно развиваются исследования по фиторемедиации — использованию растений для ремедиации загрязненных ксенобиотиками территорий. Растения имеют ряд преимуществ перед микроорганизмами в отношении их использования в качестве биоремедиантов. К сожалению растения не способны к синтезу рамнолипидов. Однако с развитием генно-инженерных биотехнологий появилась возможность создавать модифицированные растения с введенными чужеродными генами, например, бактериальными. Так созданы трансгенные растения тополя, экспрессирующие бактериальную редуктазу ртути, которые способны расти в присутствии токсичной концентрации ионов ртути [9]. Известны эксперименты по введению в табак гена, кодирующего белок человека IA ( $\alpha$ -домен), что привело к повышению устойчивости растений к кадмию в 20 раз по сравнению с контролем [10]. Нами совместно с английскими коллегами (John Innes Centre, Norwich) получены

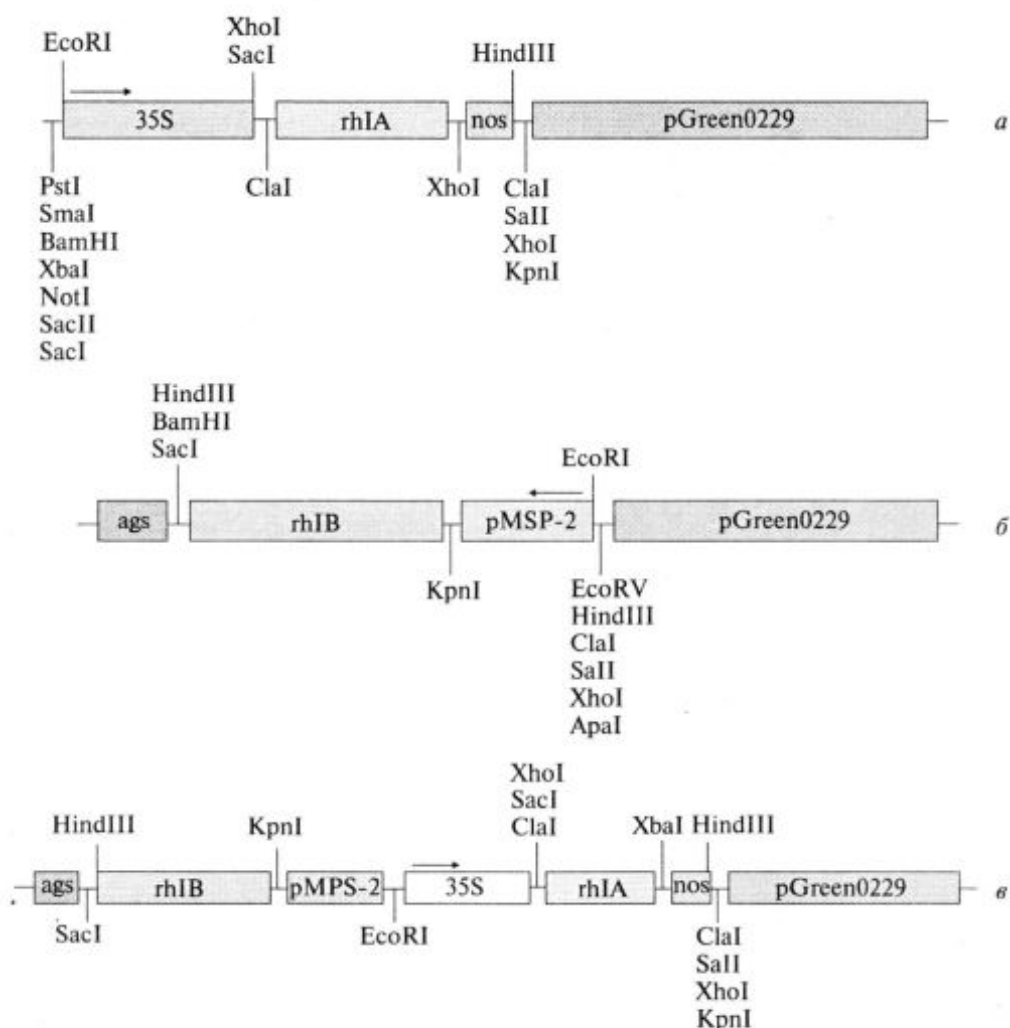


Рис. 1. Схема плазмид: а — pAS50, ген *rhIA* под 35S CaMV промотором и терминатором нопалин-синтетазы — nos; б — pAS51, ген *rhIB* под суперпромотором pMPS-2 и терминатором агропин-синтетазы — ags; в — pAS52 содержит гены *rhIA* + *rhIB* под теми же контролирующими последовательностями

трансгенные растения табака и арабидопсиса с генами рамнолипидов, демонстрирующие толерантность к тяжелым металлам и нефтепродуктам [11, 12].

В настоящем сообщении приводятся результаты экспериментов по изучению устойчивости созданных трансгенных растений табака к легкому металлу алюминию.

**Материалы и методы.** Использовалась линия табака *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1. В качестве целевых генов были взяты *rhIA* и *rhIB*, кодирующие синтез рамнозилтрансферазы 1. Гены клонированы из *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Плаزمиды pU058-19 с генами

*rhIA* и *rhIB* получена от доктора U. Ochsner (Швейцария). Для трансформации растений были созданы три конструкции на основе бинарного вектора pGreen0229 (рис. 1). Конструкция pAS50 содержит ген *rhIA* под 35S промотором и nos терминатором. Конструкция pAS51 включает ген *rhIB*, суперпромотор маннопин-синтетазы (PmasPmasPmas) и терминатор агропин-синтетазы (ags).

Конструкция pAS52 включает оба гена с упомянутыми регуляторными элементами. В качестве селективного маркера использовали ген *bar*, встроенный в плазмиду pGreen0229 [13]. Введение конструкций в геном растений

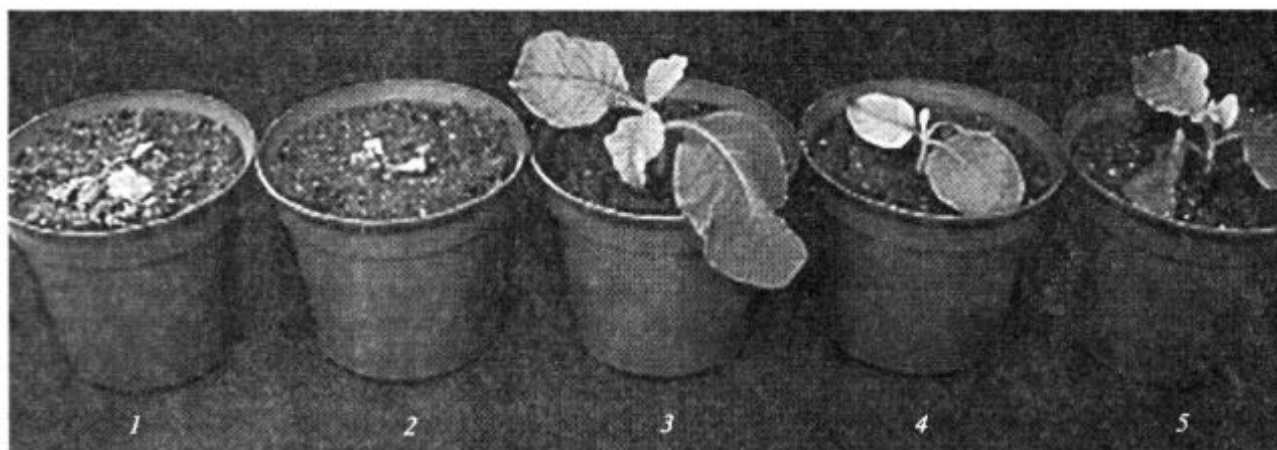


Рис. 2. Растения, которые выращивали на ионитных смолах, загрязненных 6600 мг (200 мМ) алюминия на 1 кг сухого субстрата, через 2 нед после начала эксперимента: 1 — дикий тип, 2 — с вектором pGreen0229, 3 — с геном *rhlA*, 4 — с геном *rhlB*, 5 — с генами *rhlA* и *rhlB*

Сравнительный морфологический анализ растений табака, выращенных на загрязненной алюминием почве

Растения	Линия	Длина стеблей, см			Длина корней, см			Фертильность		
		НЗП	100М	200М	НЗП	100М	200М	НЗП	100М	200М
Дикого типа	SR1	45,8±3,5	23,4 ± 1,8	Гибель	14,7 ± 0,9	6,3 ± 1,0	Гибель	+	—	—
С вектором	111-1-1-2	48,2 ± 3,3	24,6 ± 1,3	Гибель	15,9 ± 0,8	5,8 ± 1,2	Гибель	+	—	—
pGreen0229	111-1-2-1	43,6 ± 2,9	26,7 ± 2,0	Гибель	14,3 ± 0,7	6,8 ± 1,4	Гибель	+	—	—
С геном <i>rhlA</i>	112-4-1-1	47,9 ± 1,8	52,2 ± 2,5*	44,8 ± 2,2*	14,4 ± 1,4	15,9 ± 1,5*	13,1 ± 1,3*	+	+	+
	112-7-1-1	46,4 ± 2,5	47,1 ± 2,1*	46,9 ± 1,3*	13,2 ± 0,6	14,7 ± 2,1*	13,8 ± 0,8*	+	+	+
С геном <i>rhlB</i>	110-4-2-1	50,6 ± 1,8	49,2 ± 2,2*	31,1 ± 3,2*	15,1 ± 0,9	12,1 ± 1,1*	10,0 ± 0,5*	+	+	2+/4—
	111-5-2-1	51,9 ± 2,0	47,9 ± 1,7*	28,9 ± 1,7*	14,9 ± 1,2	11,4 ± 1,7*	9,4 ± 0,7*	+	+	1+/5—
С генами <i>rhlA</i> + <i>rhlB</i>	110-8-1-1	47,6 ± 1,2	47,6 ± 1,5*	41,1 ± 4,2*	16,4 ± 1,3	15,6 ± 1,3*	12,9 ± 1,1*	+	+	+
	111-8-1-1	49,3±2,1	52,0±1,2*	44,9±2,1*	15,0±0,5	14,9±0,8*	11,3±1,7*	+	+	+

Примечание. Анализировали по 6 растений в каждом варианте. НЗП — незагрязненная почва. 100М — загрязненная почва, содержащая 100 мМ алюминия; 200М — загрязненная почва, содержащая 200 мМ алюминия. \* Уровень значимости  $p < 0,05$ , значения отличались от контроля достоверно.

табака осуществляли методом прямой кокультивации протопластов с линеализованными плазмидами [14]. Отбор предположительных трансформантов проводили на среде A-med с добавлением 20 мкг/мл фосфинотрицина.

Колонии клеток, отобранные на селективной среде, выращивали на морфогенной среде MS-morpho для образования каллуса и регенерации побегов.

Растения поколения T0 и их семена (T1) анализировали на устойчивость к фосфинотрицину. Отобранные на селективной среде ли-

нии были проанализированы методом ПЦР [15] и блот-гибридизации по Саузерну [16]. Уровень экспрессии трансгенов протестирован при помощи методов РТ-ПЦР-реакции и Нозерн-гибридизации [17]. Наличие рамнолипидов определяли методом тонкослойной хроматографии [18] и масс-спектрометрии [19].

**Результаты исследований и их обсуждение.** В последние годы пристальное внимание уделяется изучению толерантности растений к легкому металлу алюминию [20, 21]. В норме этот металл не токсичен для растений — его присут-



Рис. 3. Растения, которые выращивали на ионитных смолах, загрязненных 6600 мг (200 мМ) алюминия на 1 кг сухого субстрата, через 4 нед после начала эксперимента: контроль — контрольные растения дикого типа, *rhIA* — растения с геном *rhIA*

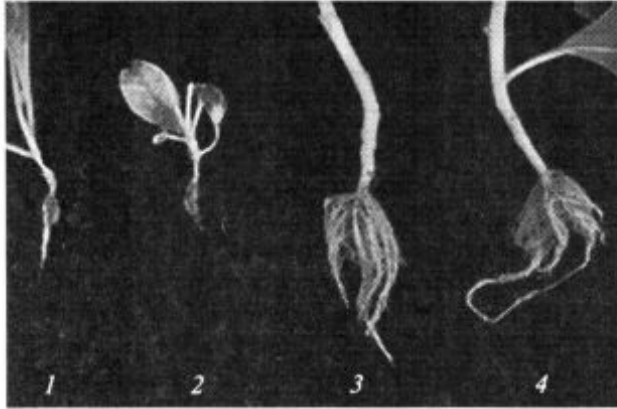


Рис. 4. Корни растений на ионитных смолах, загрязненных алюминием: 1 — контрольное растение дикого типа (3300 мг/кг), 2 — контрольное растение дикого типа (6600 мг/кг), 3 — растение с геном *rhIA* (3300 мг/кг), 4 — растение с геном *rhIA* (6600 мг/кг)

ствие необходимо для нормального развития корневой системы, а также для роста растений [22]. Однако присутствие любого металла в высокой концентрации оказывается токсичным. На территории Беларуси, Украины и России проблема избыточных концентраций

алюминия особенно актуальна из-за большого количества глинистых и суглинистых почв. Уже небольшое увеличение концентрации алюминия на таких территориях приводит к замедлению роста растений, ингибированию развития корневой системы, что в конечном счете сказывается на урожайности [23—25].

Устойчивость к алюминию обеспечивается благодаря образованию нетоксичных хелатов алюминия с лигандами, которые секретируются корневым апексом [22]. Поскольку рамнолипиды легко образуют комплексы с алюминием ( $\text{Log}K = 10,30$ ) [26], было решено проверить толерантность трансгенных растений к этому металлу.

В связи с тем, что при приготовлении искусственной почвенной смеси состав почв может варьировать по количеству глины, песка, органических веществ и т.д., растения выращивали на заряженных ионитных смолах, что позволило избежать влияния состава почвы на проводимый эксперимент. Сначала была построена кривая выживаемости контрольных растений на различных концентрациях алюминия (от 20 до 140 мМ).

Для дальнейших исследований были взяты две концентрации алюминия — 100 и 200 мМ. Алюминий в концентрации 100 мМ подавлял рост контрольных растений, но не приводил к их гибели.

Концентрация алюминия 200 мМ позволяла оценить границы толерантности трансгенных растений.

На ионитных смолах, содержащих 100 мМ алюминия, контрольные растения демонстрировали симптомы хлороза и заметно отставали в росте по сравнению с контрольными растениями на незагрязненной почве. На почве, содержащей 100 мМ алюминия, все трансгенные растения (*rhIA*, *rhIB*, *rhIA+rhIB*) развивались, как обычные растения на чистой почве (таблица).

На смолах, загрязненных 200 мМ алюминия, контрольные растения погибали через 5 дней с момента переноса растений на загрязненную почву. Растения с геном *rhIB* (линии 110-4-2-1 и 111-5-2-1) на такой концентрации алюминия были угнетены, а на их листьях наблюдался хлороз. Однако эти растения не погибли (рис. 2) и дали семена (таблица).

В отличие от них трансгенные растения с геном *rhlA* и генами *rhlA+rhlB*, выращиваемые на указанном субстрате, характеризовались абсолютно нормальным фенотипом, не отличаясь по росту от растений на незагрязненной почве (рис. 3).

Как показано в работах [22, 27], избыточные концентрации алюминия препятствуют развитию боковых корней, что нарушает питание растений и приводит к гибели последних. Морфологический анализ корней контрольных и трансгенных растений, которые выращены на почве, загрязненной алюминием, выявил, что корневая система контрольных растений действительно подавлена. У контрольных растений наблюдается уменьшение количества боковых корней вплоть до их полного отсутствия. У трансгенных растений с генами *rhlA* и/или *rhlB* на почвах, содержащих 100 и 200 мМ алюминия, не наблюдалось изменений в корневой системе (рис. 4).

Таким образом, экспрессия генов *rhlA* и/или *rhlB* позволяет растениям выдерживать токсичные концентрации алюминия, которые приводят к гибели контрольных растений. Количество металлов, к которому могут быть толерантны растения с генами биосинтеза рамнолипидов, зависит от способности рамнолипидов образовывать комплексы с этими металлами.

**SUMMARY.** Introduction of the vector constructions with rhamnolipid genes (*rhlA* and *rhlB*) into tobacco plants has resulted in development of genetically modified plants which were tolerant to high concentrations of aluminium. While under aluminium concentration of 200 mM in a soil (ionit resin) all control plants perished, transgenic tobacco plants continued to grow and were fertile.

**РЕЗЮМЕ.** В результаті введення в табак конструцій, що містять в собі гени рамноліпідів (*rhlA* і *rhlB*), одержано генетично модифіковані рослини, толерантні до високих концентрацій алюмінію. При концентрації алюмінію 200 мМ в іонітному ґрунті контрольні рослини повністю загинули. В той же час трансгенні рослини, хоч і були пригноблені, продовжували рости і дали насіння.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bragg J.R., Prince R.C., Harner E.J., Atlas R.M. Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill // *Nature*. — 1994. — 368. — P. 413–418.
2. Dyke M.I., Gulley S.L., Lee H., Trevors J.T. Evaluation of microbial surfactants for recovery of hydrophobic pollutants from soil // *J. Ind. Microbiol.* — 1993. — 11. — P. 163–170.
3. Scheibenbogen K., Zytner R.G., Lee H., Trevors J.T. Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants // *J. Chem. Technol. and Biotechnol.* — 1994. — 59. — P. 53–59.
4. Dave H., Ramakrishna C., Bhatt B.D., Dasai J.D. Biodegradation of slop oil from a petrochemical industry and bioreclamation of slop oil contaminated soil // *World J. Microbiol. Biotechnol.* — 1994. — 10. — P. 653–656.
5. Miller R.M. Biosurfactant — facilitated remediation of metal contaminated spills // *Environ. Health Persp.* — 1995. — 103. — P. 59–62.
6. Herman D.C., Artiola J.F., Miller R.M. Removal of cadmium, lead, and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant // *Environm. Sci. and Technol.* — 1995. — 29. — P. 2280–2285.
7. Kim B.S., Lee J.Y., Hwang B.K. In vivo control and in vitro antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare* // *Pest Manag. Sci.* — 2000. — 56, № 12. — P. 1029–1035.
8. Lang S., Wullbrandt D. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1999. — 51. — P. 22–32.
9. Rugh C.L., Senecoff J.F., Meagher R.B., Merkle S.A. Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation // *Nat. Biotechnol.* — 1998. — 16. — P. 925–928.
10. Mejare M., Bulow L. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals // *Trends Biotechnol.* — 2001. — 19. — P. 67–73.
11. Бричкова Г.Г., Сорокин А.П., Манешина Т.В., Курман П.В., Красовская Л.И., Джонс Дж. Дж., Картель Н.А. Создание трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* для эффективной ремедиации территорий, загрязненных углеводородами нефти // Докл. НАН Беларуси. — 2003. — 47, № 5. — С. 72–75.
12. Brychkova G.G., Sorokin A.P., Kartel N.A. Bioremediation with Ecologically Safe Plants // *NATO Scient Series. Series 1: Life and Behavioural Science IOS Press*. — 2004. — 359. — P. 147–158.
13. Бричкова Г.Г. Создание трансгенных растений с генами биосинтеза рамнолипидов, обладающих повышенной устойчивостью к высоким концентрациям металлов и усиливающих деградацию нефтепродуктов : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Минск, 2003. — 21 с.
14. Potrycus I., Schillito R.D. Protoplast: isolation, culture, plant regeneration // *Plant Mol. Biol.* — 1986. — 118. — P. 549–578.

15. De Neef V., Caeneghem W.V., Marichal M. et al. A polymerase chain reaction-based screening method for transgenic *Arabidopsis* // Genet. Anal.: Biomol. Engineer. — 1999. — **15**. — P. 1–4.
16. Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // J. Mol. Biol. — 1975. — **98**. — P. 503–517.
17. Goda S.K., Minton N.P. A simple procedure for gel-electrophoresis and Northern blotting of RNA // Nucl. Acids Res. — 1995. — **23**. — P. 3357–3358.
18. Wild M., Caro A.D., Hernandez A.L. et al. Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant // FEMS Microbiol. Lett. — 1997. — **153**. — P. 279–285.
19. Mata-Sandoval J.C., Karns J., Torrents A. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil // J. Chromatogr. A. — 1999. — **864**. — P. 211–220.

Поступила 10.10.06