

ЖАРАТЫЛЫСТАНУ ҒЫЛЫМДАР / ЕСТЕСТВЕННЫЕ НАУКИ /
NATURAL SCIENCES

DOI 10.54596/2958-0048-2023-2-8-18

ӘОЖ 633.81/85

ҒТАМА 06.01.09

ИЗОПРОТУРОНМЕН, ТРАНСГЕНДІ МАЙ БҰРШАҚТАРМЕН ЛАСТАНҒАН
БӨЛІКТЕРДІ ФИТОРЕМЕДИАЦИЯЛАУ

Аукенов Е.А.^{1*}, Тыныкулов М.К.¹

^{1*}Л.Н. Гумилев атындағы ЕҰУ, Астана, Қазақстан Республикасы

*E-mail: erdosaukenov@gmail.ru

Аңдатпа

Изопротуронды [IPU] кеңінен қолдану қоршаған ортаның қатты ластануына және экологиялық функцияларға қауіп төндіруі мүмкін. Бұл зерттеуде PDMAV IPU бактериялық N-деметилаза гені Май бұршақ хлоропластында тасымалданған және экспрессияланған [Glycine Max L. 'Zhonghuang13']. Трансгенді Май бұршақ бұршақтары PPU-ға айтарлықтай төзімділік көрсетті және PPU - ны in vivo фитотоксикалық 3-[4-изопропилфенил]-1-метилмочевина [MDIPU] метаболитіне дейін деметилдендірді. Трансгенді Май бұршақ бұршақтары жабайы типпен [WT] салыстырғанда өсімдік тіндерінде аз MPU жинай отырып, тиісінше 5 және 14 күн ішінде су мен топырақтан 98% және 84% MPU алып тастады. МПС стресс жағдайында трансгенді Май бұршақ симбиотикалық азотты бекітудің жоғары көрсеткіштерін көрсетті [түйіндердің жалпы биомассасы және нитрогеназа белсенділігі жоғары] және WT-ге қарағанда ризосфера бактерияларының тұрақты қауымдастығы. Дегенмен, улы гербицидтерді қарқынды қолдану және жинақтау бұршақ дақылдарының симбиозына теріс әсер етуі мүмкін. Отыз түрлі гербицидтер мен қоршаған ортаны ластаушы заттар өсімдіктер мен ризобиялар арасындағы сигнализацияға әсер етті, түйіндердің түзілуін кешіктірді және азоттың биологиялық фиксациясын in vitro төмендетті [Fox et al., 2007]. Дегенмен, N₂ симбиотикалық фиксациясына МПС ықтимал әсері туралы азырақ белгілі. Бұл зерттеу трансгенді [TS] Май бұршақны әзірледі, ол өсіп келе жатқан ортадан PPU-ны тиімді түрде алып тастауға және PPU стрессінде азотты бекітудің жоғары симбиотикалық қабілетін қалпына келтіруге қабілетті және гербицидтік стресс жағдайында ризосфералық микроорганизмдер мен бұршақ дақылдарының өзара әрекеттесуі туралы жаңа түсінік береді.

Кілттік сөздер: изопротурон, азот, ризосфера, хлоропласт, гербицид, ризосфера, май бұршақ, симбиотика.

ФИТОРЕМЕДИАЦИЯ ЧАСТЕЙ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ИЗОПРОТУРОНОМ,
ТРАНСГЕННЫМИ МАСЛЯНИСТЫМИ БОБАМИ

Аукенов Е.А.^{1*}, Тыныкулов М.К.¹

^{1*}ЕНУ имени Л.Н. Гумилева, Астана, Республика Казахстан

*E-mail: erdosaukenov@gmail.ru

Аннотация

Широкое использование изопротурона [IPU] может поставить под угрозу сильное загрязнение окружающей среды и экологические функции. В этом исследовании бактериальный ген N-деметилазы PDMAV IPU переносился и экспрессировался в Хлоропласте масляного гороха [Glycine Max L. 'Zhonghuang13']. Трансгенные жирные бобы показали значительную устойчивость к PPU и деметилировали PPU in vivo до метаболита фитотоксического 3 - [4-изопропилфенил]-1-метилмочевины [MDIPU]. Трансгенные жировые бобы удаляли 98% и 84% MPU из воды и почвы в течение 5 и 14 дней соответственно, накапливая меньше MPU в тканях растений по сравнению с диким типом [WT]. В стрессовых условиях МПС трансгенные жировые бобы показали более высокие показатели симбиотической азотфиксации [общая биомасса клубеньков и более высокая нитрогеназная активность] и

более стабильное сообщество ризосферных бактерий, чем WT. Однако интенсивное применение и накопление токсичных гербицидов может негативно сказаться на симбиозе бобовых. Тридцать различных гербицидов и загрязнителей окружающей среды влияли на передачу сигналов между растениями и ризобиями, задерживали образование клубеньков и снижали биологическую фиксацию азота *in vitro* [Fox et al., 2007]. Однако менее известно о возможном влиянии МПС на симбиотическую фиксацию N₂. В этом исследовании была разработана трансгенная [TS] масляная фасоль, которая способна эффективно удалять PPU из питательной среды и восстанавливать высокую симбиотическую способность фиксировать азот при стрессе PPU и дает новое понимание взаимодействия ризосферных микроорганизмов и бобовых в условиях гербицидного стресса.

Ключевые слова: изопротурон, азот, ризосфера, хлоропласт, гербицид, ризосфера, маслобояня, симбиотика.

PHYTOREMEDIATION OF PARTS CONTAMINATED WITH ISOPROTURONE, TRANSGENIC OILY BEANS

Aukenov E.A.^{1*}, Tynykulov M.K.¹

¹*FNC, L.N.Gumilyov ENU, Astana, Republic of Kazakhstan*

**E-mail: erdosaukenov@gmail.ru*

Abstract

The widespread use of isoproturon [IPU] can lead to severe environmental pollution and threats to environmental functions. In this study, the PDMAB IPU bacterial n-demethylase gene was transported and expressed in fat pea chloroplast [Glycine Max L. 'Zhonghuang13']. Transgenic fat bean pods showed significant resistance to PPU and demethylated PPU to the phytotoxic 3-[4 - isopropylphenyl]-1-methylurea [MDIPU] metabolite *in vivo*. Transgenic fat bean pods removed 98% and 84% MPU from water and soil in 5 and 14 days respectively, accumulating fewer MPU in plant tissues compared to wild type [WT]. MPs showed higher rates of symbiotic nitrogen fixation in transgenic fat peas under stress [total biomass of nodules and higher nitrogenase activity] and a more stable community of rhizosphere bacteria than WT. However, intensive use and accumulation of toxic herbicides can negatively affect the symbiosis of legumes. Thirty different herbicides and environmental pollutants have affected signaling between plants and rhizobias, delayed node formation, and reduced biological nitrogen fixation *in vitro* [Fox et al., 2007]. This study developed a transgenic [TS] oil bean that is capable of effectively removing PPU from the growing environment and restoring the high symbiotic ability to fix nitrogen under PPU stress, and provides new insight into the interaction between rhizospheric microorganisms and legumes under herbicidal stress.

Key words: isoproturon, nitrogen, rhizosphere, chloroplast, herbicide, rhizosphere, oil peas, symbiotic.

Кіріспе

Гербицидтер ауыл шаруашылығында арамшөптермен күресу үшін кеңінен қолданылады. Алайда, дақылдардың өнімділігі үшін артықшылықтардан басқа, гербицидтерді ғылыми емес және шамадан тыс пайдалану қоршаған ортаның қатты ластануына әкелді [1]. Изопротурон [3-[4-изопропилфенил] - 1,1-диметилмочевина] [IPU] фенилмочевина гербицидтер [PHs] тұқымдасына жатады және пайда болғанға дейін және одан кейін біржылдық шөптер мен жалпақ жапырақты арамшөптермен күресу үшін кеңінен қолданылады [Феннер және басқалар., 2013]. Қоршаған ортаға төзімділігі және суда салыстырмалы түрде жоғары ерігіштігі [70 мг/л, 20°C] болғандықтан, МПС қалдықтары бүкіл әлемде әртүрлі ортада көбінесе рұқсат етілген шектерден [0,1 мкг / л] асатын концентрацияда табылды [Феннер және басқалар., 2013; Wang et al., 2021b]. Сонымен қатар, МПС қалдықтарын мәдени өсімдіктер оңай сіңіреді, бұл қоректік тізбектің ластануына әкеледі және адам денсаулығына тікелей қауіп төндіреді [EFSA, 2015; Spirhanzlova et al., 2019]. Есептер МПС адамның перифериялық лимфоциттеріне әсер ететінін және қалқанша безінің немесе қалқанша безінің

гормондық жүйелерінің бұзылуын тудыратынын көрсетті [Чаухан және т.б., 2007; EFSA, 2015]. МПС адам үшін өлімге әкелетін канцерогендер тізіміне енгізілгендіктен [2000 ж. директивасы] және Еуропалық Одақ 2016 жылы тыйым салған [2016/872 2016], ластанған экожүйелерден МПС алып тастау үлкен назар аударды [1].

Физикалық-химиялық өңдеу сияқты MPS ластануын жоюдың көптеген стратегиялары ұсынылды [Jehova Gonzalez et al., 2022] және бір штаммды немесе микробтық консорциумдарды қолданатын биоремедиация [Cheng et al., 2022; Li et al., 2017; Xu et al., 2019]. Фиторемедиация, автотрофты өсімдіктерді тазартқыш ретінде пайдалану соңғы жылдары көбірек назар аударып, танылуда. Бүгінгі күні МПС ластануын тазарту үшін бірнеше трансгенді [TS] өсімдіктер салынды. Мысалы, женьшеньден алынған CYP736A12 [ханом және басқалар, 2019] және CYP1A2 сүтқоректілері [Azab et al., 2020] MPS төзімділігін немесе фиторемедиациясын арттыру үшін *Arabidopsis thaliana*-да сәтті шамадан тыс экспрессияланды. Біздің алдыңғы зерттеуімізде *Sphingobium* sp-де көптеген фенилмочевина гербицидтерінің, соның ішінде IPU-ның бастапқы N-деметилденуіне жауап беретін гемдік емес темір оксигеназа PdmAB қаупі сипатталған. YBL2 штаммы [Gu et al., 2013; Yan et al., 2016]. Сонымен қатар, TS *Arabidopsis thaliana*, экспрессиялау, сонымен қатар ХЛОРОПЛАСТТАҒЫ PDMAB гендері сәтті дамыды, олар IPU-ны MDIPU [3-[4-изопропилфенил]-1 - метилмочевина] және ddipu [1-[4-изопропилфенил] мочевины] [Ян және басқалар, 2018]. Алайда, арабидопсисінің биомассасы өте аз, бұл оны нақты қолдануды шындыққа жанаспайды. Тиісті өсімдіктерді таңдау сәтті фиторемедиация үшін өте маңызды [Кавахигаші, 2009]. Май бұршақ [максимум глицин] экспрессияға ең жақсы үміткер өсімдік болуы мүмкін pdmab фиторемедиацияға арналған МПС, өйткені әртүрлі гербицидтерге төзімді генетикалық түрлендірілген Май бұршақ көптеген елдерде сәтті отырғызылды [1].

Май бұршақ [максимум глицин] жаһандық азот циклінде шешуші рөл атқарады, тамыр түйіндерінде N₂ бекітетін бактериялармен симбиоздар түзеді, 2018 жылы 25,0 Тг азотты бекітеді [Herridge et al., 2022].

Генетикалық түрлендірілген өсімдіктерді өсірудің топырақтың микробтық экожүйесіне әсері үлкен аландаушылық тудырады [Agraia et al., 2020]. Өсіп келе жатқан зерттеулер өсімдік пен микробиоманың өзара әрекеттесуі иесінің қызметі мен денсаулығының көптеген аспектілерінде, соның ішінде коректік заттардың сіңуінде шешуші рөл атқаратынын көрсетеді [Ванг және басқалар., 2021a], абиотикалық стресске төзімділік [Li et al., 2021; Zhong et al., 2022] және ауруларды басу [Денг және басқалар., 2022; Ванг және басқалар, 2022]. Зертханалық далалық эксперименттер кезінде МПС бактериялық әртүрліліктің немесе топырақ құрамының айтарлықтай өзгеруіне әкелмейтіні анықталғанымен [Storck et al., 2018], mps төзімді TS дақылдарының ризосфераның бактериялық қауымдастығына әсерін ескеру қажет, әсіресе MPS стресс жағдайында [2].

Бұл зерттеуде біз [i] PPU-мен ластанған аймақтарды фиторемедиациялау үшін бактериялық N-деметилазаны Май бұршаққа ауыстыруды мақсаттанды; [ii] PPU генінің және стресстің түйін түзу қабілетіне және Май бұршақ нитрогеназа белсенділігіне әсерін бағалау және [iii] Май бұршақтың әсерін зерттеу TS сорғы және MPS стресс жағдайында ризосфералық бактериялар қауымдастығының әртүрлілігі.

Материалдар мен әдістер

Материалдар

Изопротурон [IPU], 3 - [4-изопропилфенил]-1-метилмочевина [MDIPU], 1 - [4-изопропилфенил] мочеви́на [DDIPU] және глюфосинат [барлық 99% тазалық] J&K Scientific Co-дан сатып алынды., Ltd. [Шанхай, Қытай].

Жер үсті топырағы [0-20 см] Қытайдың Нанкин ауылшаруашылық университетінің Эксперименттік станциясындағы ластанбаған өрістен жиналды [N 32°1 '23", E 118°51 '5"], 2 мм-ге дейін електен өткізіліп, 4°C температурада сақталды. АҚШ-тың текстуралық жіктеу үшбұрышына сәйкес % лай және 31,30% саз]. Оның құрамында 5,4 г / кг органикалық заттар, 12,90 мг / кг қол жетімді азот, 20,51 мг / кг қол жетімді Р және 95,00 мг / кг қол жетімді К. топырақтың рН мәні 7,39 болды.

Бактериялық pdmab білдіретін трансгенді Май бұршақ бұршақтарын жобалау

Май бұршақ тұқымдары [глицин макс L. Zhonghuang13] Beijing DaBeiNong Biotechnology Co., Ltd. [Пекин, Қытай]. Май бұршақ тұқымдары алдымен 1 минут ішінде 75% [в/в] этанолмен және 15 минут ішінде 10% H₂O₂ ерітіндісімен беткі зарарсыздандырылды, 7-8 рет жуылды және 4°C температурада стерильді суға түні бойы малынған. Содан кейін олар фотопериодты жарықтандырылған инкубаторда 5 күн бойы жартылай күшті MS ортасында өніп шықты күн/түн 14 сағ/10 сағ [жарық қарқындылығы 250 мкмоль/м²/с] және тәулік/түн температура режимі 28°C / 25°C.

Май бұршаққа енгізілген Кассета [Glycine Max L. Zhonghuang13] біздің алдыңғы зерттеулерімізге сәйкес жасалған [Ян және басқалар., 2018] шамалы өзгерістермен. Pdma және pdmB гендерімен шырқан Май бұршақ кодонына сәйкес химиялық синтезделді. Хлоропласт транзиттік пептидті [AtCTP] кодтайтын аймақ [Dellaciorra және басқалар., 1986], олардың хлоропластарда тиімді экспрессиясын қамтамасыз ету үшін pdmA және pdmB алдында қосылды [хлоропластардағы ферредоксиндер pdmab электрондарын тасымалдай алады]. Содан кейін AtCTP-pdmA және etctp-pdmB экспрессиялық кассеталары pdbnbc-03 векторының сәйкес учаскелерімен байланысты болды [psambia2301; камбий] pDBN10939 қалыптастыру. Pdbn10939 плазмидасы сұйық азот әдісін қолдана отырып, Agrobacterium tumefaciens LBA4404 [Invitrogen, Чикаго, Иллинойс, АҚШ] тасымалданды [Zambryski et al., 1982]. Май бұршақ агробактериялар арқылы трансформация арқылы трансфекцияланды [Paz et al., 2006]. TS Май бұршақ каллусының тіндері B5 ортасында скринингтен өтті [Гамбург және басқалар., 1968] құрамында 6 мг/л глюфосинат бар және t0 төзімді көшеттер жылыжайда өсірілді. Ақырында, TS Май бұршақ гомозиготалы генотиптері өздігінен ұрықтандырудың екі раундынан кейін алынды.

RT-ПТР сандық талдаулары

Май бұршақ тіндерінің жалпы РНҚ-сы [тамырлар, сабақтар мен жапырақтар] өндірушінің нұсқауларына сәйкес RNase Plus [TaKaRa, Далиан, Қытай] көмегімен алынды және gDNA жою үшін геномдық ДНҚ [Gdna] Eraser [TaKaRa] бар RT primescript реагенттер жиынтығымен өңделді. кднқ 20 мкл реакциялық көлемде кері транскрипция жүйесі [TaKaRa] арқылы үлгі ретінде 5 мкг жалпы РНҚ көмегімен синтезделді. 190 pdma генінің фрагменті праймерлерді қолдану арқылы күшейтілді: 5'-TCAGAGATGAGCGGGTGTTC-3' және 5' - cgatgcctgcagtgttcaa -3' және 111 BP фрагменті. pdmA гені. PdmB гені праймерлермен күшейтілді: 5' -ggttggtgggggttcggttatg-3' және 5' - ggacatctccttgccgata-3'.

RT-qPCR реакциясы quantstudio™6 Flex RT-PCR жүйесінде [Applied Biosystems, Уолтэм, Массачусетс, АҚШ] экспозиция кезеңінің шарттарымен жүргізілді: 2 минут

ішінде 50°C, 10 минут ішінде 95°C; ПТР сатысы: екі кезең бойынша 40 цикл [94°F15 с және 34 с үшін 60°C]; және балқу қисығының сатысы: 15 с үшін 95 ° C, 1 мин үшін 60°C, 15C үшін 95°C. әрбір реакция қоспасы [20 мкл] 10 мкл SYBR ex Taq [TaKaRa] премиксінен, 0,5 мкл әр праймерден тұрды [20 мкм], 0,5 мкл ДНҚ үлгісі және 8,5 мкл стерильді ddh2o. Стандартты қисықтар pdmA pdmB игендері бар сызықты плазмидті ДНҚ-ның 10 есе сұйылту сериясы арқылы орнатылды. Стандартты қисықтарды күшейту тиімділігі сәйкесінше pdmA және pdmB үшін R2 0,9856 және 0,9996 мәндерінде 100,08% және 98,32% құрады. Барлық талдаулар үш данада жасалды және шаблонсыз бақылау қолданылды.

Иммуноблот талдаулары

Ақуыздың экспрессиясын талдау үшін жолаққа Май бұршақ жапырағынан алынған 20 мкг шикі ақуыз жүктелді. Pdma протеині мен PdmB протеиніне антиденелер қояннан [GenScript, Нанкин, Қытай] өсірілді және ешкі мен қоянның сілтілі фосфатаза конъюгаты екінші антидене ретінде пайдаланылды. Әрбір ақуыз үшін үш қайталанатын блот жасалды және жолақтардың қарқындылығы ImageJ бағдарламалық құралын пайдалана отырып, Батыс блоттинг кескіндерінің пикселдеріндегі өлшеулер негізінде сандық түрде анықталды.

N-деметилаза белсенділігін талдау

PdmAB N-деметилаза белсенділігі MDIPU және/немесе MPS-тен DDIPU шығару қабілетімен анықталды. Шикі ақуыз 5 г Май бұршақ жапырағынан алынды, олар дереу мұзға ұсақталып, 20 мЛ 50 мкм трис–HCL буферіне [PH 7,0] суспензияланды. 5 мг/л IPU және 2 мл 50 мкм трис–HCL буфері [PH 7.0] бар реакция қоспасына шамамен 3 мг шикі ақуыз қосылды. 28°C температурада бір сағаттық инкубациядан кейін реакция буфері дихлорметанмен [1:1, в/в] үш рет алынып, сорғышта кептірілді. Кептірілген қалдықтар 200 мкл ацетонитрилде ерітіліп, біздің алдыңғы зерттеулерімізге сәйкес жоғары тиімді сұйық хроматография [HPLC; ultimate 3000 RSLC; Thermo] арқылы анықталды [Yan et al., 2018] келесі параметрлерде: бөлу фазасы, төңкерілген баған C 18 [Thermo, 250 мм×4,6 мм.d.]; жылжымалы фаза, ацетонитрил: су [50:50, көлем / көлем], ағын жылдамдығы 1,0 мл/ мин және толқын ұзындығы 250 нм ультракүлгін [УК] анықтау.

Өсімдіктердің төзімділігін талдау

ИПУ тудырған стресс жағдайында Май бұршақ бұршақтарының өсуін бақылау үшін өнген Май бұршақ тұқымдары 100 мл MS ортасы бар 250 мл колбаға және 5 мг/л ИПУ бар немесе онсыз 15 г/л агарға ауыстырылды. 2 аптадан кейін жаңа тамырдың массасы, ауа бөлігінің массасы, тамырдың ұзындығы және Май бұршақ өсімдіктерінің сабағының ұзындығы өлшенді.

Хлорофилл құрамы мен флуоресценция параметрлерін анықтау үшін шымтезек-вермикулит [1:3, v/v] қоспасында өсірілген 30 күндік WT және TS Май бұршақ бұршақтарының көшеттері IPU [10 мЛ, 5 мг/л] шашыратылды. Бір аптадан кейін сол бөліктің Май бұршақ жапырақтары хлорофилл құрамы мен флуоресценция параметрлерін анықтау үшін таңдалды. Хлорофиллдің құрамы Лихтенталер әдісімен анықталды [Lichtenthaler, 1987]. Флуоресценция параметрлері Handy PEA [Hansatech Instruments Ltd.] көмегімен анықталды., Норфолк, Ұлыбритания] 30 минуттан кейін қараңғыда [Sun et al., 2021].

Судан және топырақтан МПС жою

Беткі зарарсыздандырудан және өнуден кейін Май бұршақ көшеттері зарарсыздандырылған коректік ерітіндіге [1/4 концентрациясы бар модификацияланған Хогланд ерітіндісі] ауыстырылды [Чжан және басқалар., 2016]. 2 апта өсіруден кейін үш

біртекті көшет 120 мл стерильді қоректік ерітінді мен 5 мг/л ИПУ бар 240 мл бөтелкеге ауыстырылды. IPU фотолизін болдырмау үшін қара шыныаяққа оралған бөтелкелер жарықтандырылған инкубаторға орналастырылды. Транспирация шығындарын өтеу және сынама алу үшін күніне шамамен 20 мл стерильді қоректік ерітінді қосылды. Сонымен бірге бақылаулар құрылды [МПС-пен, бірақ көшеттерсіз]. Ерітінді үлгілері [3 мл] аралықпен алынды 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 трансплантациядан кейін 120 сағаттан кейін. Үлгілер дихлорметанмен 1:1 қатынасында [көлем/көлем] үш рет алынды. Май бұршақ тіндерінің үлгілері [жапырақтар, сабақтар және тамырлар] біздің алдыңғы зерттеулерімізге сәйкес 120 сағаттан кейін таңдалды [Ян және басқалар., 2018]. Май бұршақ ерітінділері мен тіндеріндегі IPU және оның mdpu метаболитінің концентрациясы HPLC әдісімен талданды.

TS Май бұршақ бұршақтары арқылы топырақтан МПС жойылуын бағалау үшін біртекті Май бұршақ көшеттері өсіру үшін шымтезек-вермикулит [1:3, в / в] қоспасына ауыстырылды. 21 күннен кейін 18 Май бұршақ өсімдігінің әрқайсысы 50 мг/кг ИПУ араласқан 30 г топырақтан тұратын 50 мл центрифуга түтігіне ауыстырылды. Ылғалдың 30% сақталуын қамтамасыз ету үшін зарарсыздандырылған су қосылды. ИПУ фотолизін болдырмау үшін түтіктің бір бөлігі күміс қағазға оралған. 0, 7 және 14 күннен кейін барлық топырақ пен өсімдік тіндері пробиркада жиналды. Топырақ пен өсімдік тіндері сәйкесінше үш рет 5:1 [в/в] қатынасында 1% сірке қышқылы бар ацетонитрилді пайдаланып алынды.

Түйіндерді талдау және нитрогеназа белсенділігін анықтау

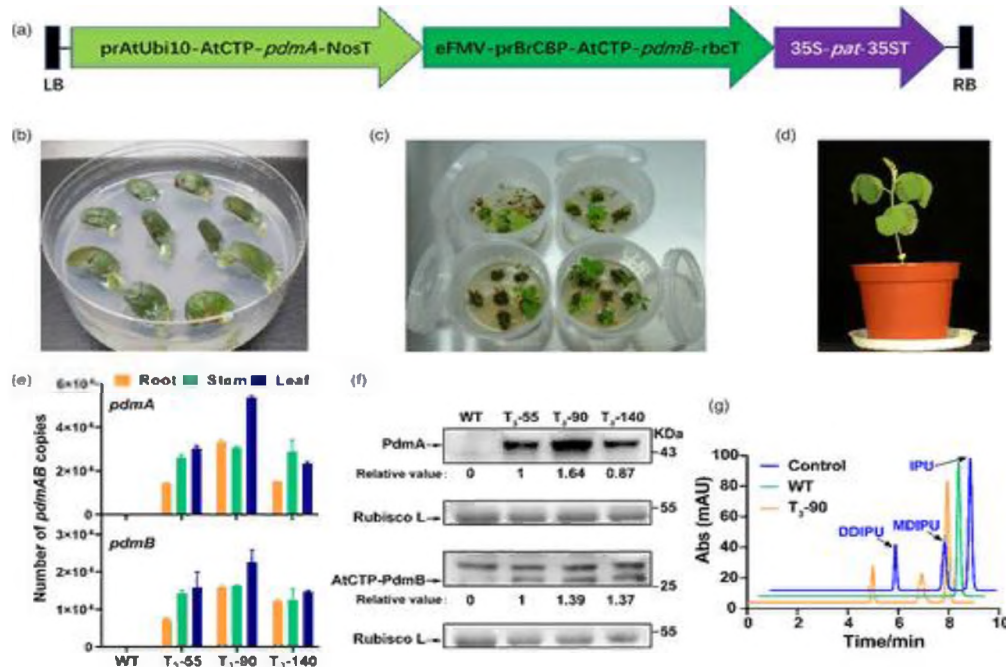
Беткі зарарсыздандырылған Май бұршақ тұқымдары 0 немесе 2 мг/кг МПС бар стерильденген вермикулитпен [30×200 мм] пробиркаларда өсірілді. *Bradyrhizobium japonicum* [біздің зертханамен Май бұршақтың тамыр түйіндерінен оқшауланған] триптон ашытқысы [ТУ] ортасында 28°C температурада 4 күн бойы өсірілді және od600 0,8 [шамамен 10 7 жасуша] дейін сұйылтылды. Әрбір Май бұршақ тұқымы 1 мл сұйылтылған *B. japonicum* дақылымен егіліп, 4 апта бойы жарықтандырылған инкубаторда өсірілді, ол апта сайын зарарсыздандырылған азотсыз *fahraeus* қоректік ерітіндісімен қамтамасыз етілді [Fahraeus, 1957]. Тамыр түйіндері егілгеннен кейін 28 күннен кейін құрғақ салмақты санау және өлшеу үшін жиналды. Теріс БАҚЫЛАУДА [*B. japonicum* егусіз] Май бұршақ өсімдіктерінде түйіндер байқалмады.

Нәтижелері

Май бұршақ экспрессиялайтын трансгенді бактериялық N-деметилазаның құрылысы.

Өсімдік хлоропласттары PdmAB оксигеназа компоненті үшін тотықсыздану қабілетін [мысалы, NADPH] қамтамасыз ете алатындықтан, Май бұршақ кодонының орын ауыстыруына негізделген синтезделген pdmA және pdmB гендерінің 5'ұштарына хлоропласт транзиттік пептидін [AtCTP] кодтайтын реттілік қосылды [Glycine Max L. Zhonghuang13]. Оңтайландырудан кейін pdmA гендер тізбегіндегі G + C мазмұны [1380 а.к.] 55%-дан 52%-ға дейін, ал pdmB гендер тізбегінде [531 а. к.] 57%-дан 52%-ға дейін төмендеді. PdmAB экспрессиялық кассеталары *agrobacterium tumefaciens* lba4404 [pDBN10939] Май бұршақ геномына ауыстырылды. Глюфосинатқа төзімді Калла лалагүлдері регенерация үшін 6 мг/л глюфосинаты бар B5 ортасына ауыстырылды, одан әрі скрининг және өскіндердің дамуы үшін олар кейінірек топыраққа ауыстырылды. ПТР талдауы арқылы глюфосинатқа төзімді он бес сызық алынды және олардың құрамында pdmAB гендері бар екендігі расталды. Өзін-өзі тозандандырудың екі раундынан кейін TS

Май бұршақының үш сызығы [Т 3-55, Т 3-90, Т 3-140] гомозиготалы және әрі қарай зерттеу үшін тандалғаны расталды [3].



Сурет 1.

Нақты уақыттағы RT-qPCR талдауы *pdmab* бактериялық N-деметилазасының TS [Т 3-55, Т 3-90 және Т 3-140] Май бұршақ сызықтарында экспрессияланғанын көрсетті, ал TS емес Май бұршақ бұршақтарында байқалмайды (1-сурет). Май бұршақ жапырақтарында сабақтар мен тамырларға қарағанда *pdmA* және *pdmB* гендерінің транскрипциясының салыстырмалы түрде жоғары деңгейлері табылды. TS t 3-90 Май бұршақ желісі Т 3-140 және Т 3-55-ке қарағанда *pdmA* және *pdmB* гендерінің транскрипциясының жоғары деңгейін көрсетті.

1F-суретте көрсетілген TS Май бұршақ сызықтарының Батыс блотинг талдауы *pdmA* протеинінің өлшеміне сәйкес келетін *pdmA* антиденесін пайдаланып иммуноблоттаудан кейін ұзындығы 51 кДа болатын жалғыз жолақтың бар екенін анықтады. Сонымен қатар, *PdmB* антиденесін қолданатын иммуноблотты талдау арқылы *AtCTP-pdmB* протеиніне сәйкес келетін Ұзындығы 28 кДа болатын жалғыз жолақ табылды. Жолақтар антиденелер көмегімен зерттелген жабайы типтегі Май бұршақ жапырағы ақуызының [WT] дақтарында табылған жоқ. Western blot талдауының нәтижелері [1F-сурет] сандық RT-ПТР нәтижелеріне сенімді түрде сәйкес келді [транскрипт пен ақуыздың экспрессия деңгейлерінде екі есе ғана айырмашылық бар], бұл t 3-90 желісі *pdmA* және *pdmB* ақуыздарының ең жоғары деңгейін шығаратынын көрсетеді [5].

TS сызықтарынан алынған шикі ақуыздар IPU-ны MDIPU және тіпті DDIPU-ға айналдыруда айтарлықтай ферментативті белсенділікті көрсетті (1-сурет). TS Май бұршақының 3 жолының ішінде TS t 3-90 желісі ең жоғары ферментативті белсенділікті көрсетті және сағатына миллиграмм шикі ақуызға [жапырақтардан алынған] 1,13 мкг MDIPU және 1,05 мкг ddipu өндірді. Керісінше, WT өсімдіктерінде MDIPU да, DDIPU да табылған жоқ. Бұл нәтижелер *pdmab* бактериялық N-деметилазасының өсімдік

жапырақтарында дұрыс жиналғанын және IPU-ға қатысты айтарлықтай ферментативті белсенділік көрсеткенін көрсетті. TS ТЛиния 3-90 N-деметилазаның ең жоғары белсенділігіне ие болғандықтан, ол фиторемедиацияны одан әрі зерттеу үшін таңдалды.

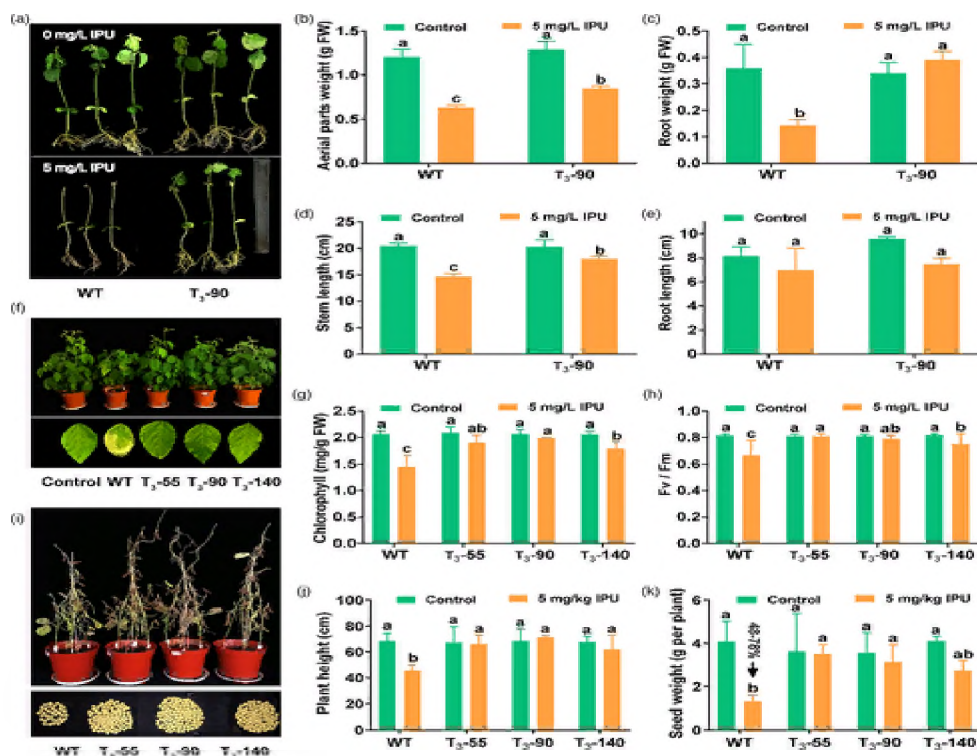
Трансгенді Май бұршақ бұршақтарының IPA ға төзімділігі

МПС болмаған кезде TS және WT Май бұршақ бұршақтарының өсуі арасында айтарлықтай айырмашылықтар байқалмады. Дегенмен, TS Май бұршақ бұршақтары WT Май бұршақ бұршақтарына қарағанда 5 мг/л IPU-ға төзімділікті көрсетті. Тамырдың ұзындығы айтарлықтай ерекшеленбесе де, антенналық бөліктің массасы, жаңа тамырлардың массасы және TS сызықтарының сабағының ұзындығы Май бұршақның массасынан сәйкесінше 1,4, 2,8 және 1,3 есе көп болды, 5 мг/л мпс әсерінен кейін 14 күн ішінде. Сонымен қатар, TS желілері WT Май бұршақ бұршақтарына қарағанда хлорофиллдің деградациясына және IPU стресс жағдайында Фотосинтездің инактивациясына төзімді болды. WT Май бұршақ бұршақтарындағы хлорофиллдің орташа мөлшері IPU әсер еткенде шамамен 29%-ға төмендеді, ал TS желілерінде тек 3-13%-ға төмендеді. TS [0,75–0,81] өсімдіктеріндегі айнымалы флуоресценцияның максималды хлорофилл флуоресценциясына [Fv/Fm] қатынасы да WT [0,68] Май бұршақ бұршақтарына қарағанда айтарлықтай жоғары болды. 5 мг/л ИПУ 90 күн бойы шашыратқаннан кейін, өсімдіктің биіктігі және тұқымның салмағы бір өсімдікке Май бұршақның салмағы TS өсімдіктеріне қарағанда айтарлықтай төмен болды. Осы нәтижелердің барлығы хлоропласттағы rdmaB бактериялық N-деметилаза экспрессиясы Май бұршақ МПС төзімділігін айтарлықтай жақсартқанын көрсетті [5].

Трансгенді соя бұршақтарының IPA ға төзімділігі

МПС болмаған кезде TS және WT соя бұршақтарының өсуі арасында айтарлықтай айырмашылықтар байқалмады. Дегенмен, TS соя бұршақтары WT соя бұршақтарына қарағанда 5 мг/л IPU-ға төзімділікті көрсетті (2-сурет). Тамырдың ұзындығы айтарлықтай ерекшеленбесе де (2-сурет), антенналық бөліктің массасы, жаңа тамырлардың массасы және TS сызықтарының сабағының ұзындығы сояға қарағанда сәйкесінше 1,4, 2,8 және 1,3 есе жоғары болды (2a-d-сурет), 5 мг/л әсер еткеннен кейін IPU 14 күн ішінде.

Трансгенді сояның изопротуронға (IPU) төзімділігі (T3-55, T3-90, T3-140). (a) 14 күн ішінде 0 және 5 мг/л IPU әсеріне ұшыраған трансгенді және жабайы соя бұршақтарының өсу жағдайы (салмағы бойынша). Жер үсті бөлігінің массасы (b), тамыр массасы (c), сабақ ұзындығы (d) және T3-90 трансгенді сызығының тамыр ұзындығы (e) және 14 күн ішінде 0 (бақылау) және 5 мг/л ИПУ әсер еткен тұқымдардың массасы. (f) 0 (бақылау) және 5 мг/л МПС енгізгеннен кейін 7 күннен кейін 30 күндік трансгенді және жабайы сояның өсу жағдайы. Хлорофиллдің орташа мөлшері (g) және флуоресценция параметрі (h) 30 күндік трансгенді және жабайы соя 0 (бақылау) және 5 мг/л МПУ енгізгеннен кейін. (i) 90 күн ішінде 5 мг/л IPU Шашыратылған трансгенді және МАС сояның тиімділігі. Өсімдіктің биіктігі (j) және тұқым массасы (k) 0 (бақылау) немесе 5 мг/л IPU бүркүден кейін трансгенді және жабайы соя өсімдігіне. Деректер үш тәуелсіз эксперименттің нәтижесі болып табылады, ал қате бағандары стандартты қателер болып табылады. Бағандардың үстіндегі кіші әріптер айтарлықтай айырмашылықтарды көрсетеді ($p < 0,05$, Туки тесті). FW, жаңа салмақ [5].



Сурет 2.

Сонымен қатар, TS желілері WT соя бұршақтарына қарағанда хлорофиллдің деградациясына және IPU стресс жағдайында Фотосинтездің инактивациясына төзімді болды (2f-сурет). WT соя бұршақтарындағы хлорофиллдің орташа мөлшері IPU әсер еткенде шамамен 29%-ға төмендеді, ал TS желілерінде тек 3-13%-ға төмендеді (2-сурет). TS (0,75–0,81) өсімдіктеріндегі айнымалы флуоресценцияның максималды хлорофилл флуоресценциясына (F_v/F_m) қатынасы да WT (0,68) соя бұршақтарына қарағанда айтарлықтай жоғары болды (2-сурет). 90 күн ішінде 5 мг/л ИПУ шашыратқаннан кейін өсімдіктің биіктігі және тұқымның салмағы (2 мың мас-сурет. соя өсімдігінің %-ы TS өсімдіктеріне қарағанда айтарлықтай төмен болды. Осы нәтижелердің барлығы хлоропласттағы *rdmab* бактериялық N-деметилаза экспрессиясы сояның IPU төзімділігін айтарлықтай жақсартқанын көрсетті [5].

Талқылау

Ауылшаруашылық және ауылшаруашылық емес аудандарда MPS-тің кең таралуы экологиялық проблемаларды тудырады, бұл таза және тұрақты өндіріске сәйкес келмейді. Дәстүрлі қалпына келтіру стратегияларымен салыстырғанда фиторемедиация минималды деструктивті, техникалық қызмет көрсетуді қажет етпейді және үнемді [Cayg et al., 2021]. Бұл мақалада біз IPU-ны Май бұршаққа N-деметилдеу үшін *rdmab* бактериялық гендерін сәтті енгіздік [Glycine Max L. Zhonghuang13]. RT-qPCR және Western blot талдауларының деректері TS Май бұршақ бұршақтары *rdmAB* гендерін тиімді экспрессиялайтынын көрсетті. In vitro сынағы сонымен қатар TS Май бұршақ жапырағының шикі ақуыздары IPU-ның N-деметилденуін катализдейтінін көрсетті. Біз бактериялық N-деметилазаны Май бұршаққа тасымалдау Май бұршақ бұршақтарының IPU-ны тасымалдау және ыдырату қабілетін арттыратынын көрсеттік, бұл PPU-мен ластанған топырақты фиторемедиациялау үшін әлеуетті өсімдік биотехнологиясын қамтамасыз етеді.

Біздің бұрын салынған TS Arabidopsis сызықтарымен салыстырғанда [Ян және басқалар, 2018], TS Май бұршақсының кейбір артықшылықтары бар. Май бұршақ бұршақтарында үлкен биомасса бар, оның ішінде қуатты тамырлар бар, бұл оларға ластанған ортадан көбірек ИПУ сіңіруге және сіңіруге мүмкіндік береді. Шын мәнінде, әрбір 14 күндік TS Май бұршақсы күн сайын шамамен 66,67 мкг IPU-ны алып тастай алады, ал 25 күндік TS Arabidopsis Май бұршақсы бірдей су жағдайында шамамен 7,50 мкг IPU-ны ғана алып тастады [Ян және басқалар., 2018]. Сонымен қатар, Май бұршақ, экономикалық дақыл, синтетикалық тыңайтқыштарға деген қажеттілікті азайту үшін симбиоз арқылы азотты бекіте алады. MPS мақсатты емес өсімдіктер үшін уыттылықты көрсете алады, мысалы, тамырлар мен жапырақтардың өсуіне жол бермеу, хлорофиллді азайту және Фотосинтездің тиімділігін тежеу [Yin et al., 2008; Zhai et al., 2022]. Біздің зерттеуімізде pdmab бактериялық N-деметилазаны білдіретін TS Май бұршақ бұршақтары TS емес Май бұршақ бұршақтарына қарағанда MPS төзімділігінің жақсарғанын көрсетті. Олар көбірек биомасса өндірді және құрамында хлорофилл мен Fv / Fm көп болды. Бұл өсімдік тіндерінде жиналатын IPU төмен концентрациясының нәтижесі болуы мүмкін, өйткені PdmAB IPU-ны аз уытты mdipu метаболитіне дейін деметилдей алады. IPU-ның мақсатты орны-хлоропласттардың D1 ақуызы [Baho et al., 2021], ал біз қосқан хлоропласт транзиттік пептид pdmab IPU-ны тиімдірек детоксикациялай алатын хлоропластарға pdmab тасымалдауға көмектеседі. Жарық энергиясын химиялық энергияға айналдыратын және өзіндік экспрессия жүйесі бар мамандандырылған органеллалар болып табылатын хлоропласттар фиторемедиация саласында TS дамыту үшін оңтайлы платформаны қамтамасыз етеді [Chu et al., 2020; Daniell et al., 2021; Ruiz et al., 2011].

Біздің TS Май бұршақ бұршақтары MPS стрессінде N2-бекітудің симбиотикалық функцияларын қалпына келтірді. Түйіндер құрғақшылық деңгейі, топырақ рН және гербицидтердің улы қалдықтары сияқты қоршаған ортаның өзгеруіне өте сезімтал [Goyal et al., 2021]. Біздің зерттеуімізде МПС қалдықтары Май бұршақ бұршақтарындағы түйіндердің санын айтарлықтай азайтты. Бір ықтимал түсініктеме-ризосфералық бактериялардың Май бұршақ тамырларына тартылуы IPU-мен тежелген немесе кешіктірілген [Fox et al., 2007]. Сонымен қатар, МПС қалдықтары TS жоқ Май бұршақ түйіндерінің құрғақ биомассасын TS бар Май бұршаққа қарағанда едәуір азайтты. MPS стресстік жағдайында TS Май бұршақ бұршақтарында фотосинтез жылдамдығы жоғары болды және түйіндердің энергетикалық қажеттіліктерін қанағаттандыру үшін фотосинтез өнімдері көбірек болды. Өзара пайда-бұл экожүйелердің ең негізгі қажеттілігі [Daubech et al., 2017]. Өз кезегінде, түйіндер бір өсімдікке нитрогеназаның жалпы белсенділігі жоғары Май бұршақ өсуін тамақтандыру үшін азотты көбірек бекітеді, бұл түйіндер санының төмендеуін өтей алады.

Біздің деректер PDMAB-ты Май бұршаққа тасымалдау IPU болмаған кезде ризосфераның бактериялық құрамына айтарлықтай әсер етпейтінін көрсетті, бұл ersps / GAT Dual TS глифосатқа төзімді Май бұршақ бұршақтарына ұқсас, өйткені тасымалданған ген ризосфераның микробтық қауымдастығының құрамына әсер етпейді [Янг және басқалар., 2021]. Сонымен қатар, MPS стресі ризосфералық бактериялар қауымдастығының альфа әртүрлілігіне айтарлықтай әсер еткен жоқ. Пестицидтермен емдеу Май бұршақ ризосферасының бактериялық байлығына айтарлықтай әсер етпегені туралы хабарланды [Nettles et al., 2016]. Алайда, алдыңғы зерттеулерден айырмашылығы, WT және TS Май бұршақ ризосферасының бактериялық құрамы IPU стрессіне ұшыраған кезде айтарлықтай өзгерді. TS Май бұршақ бұршақтарының

ризосфералық бактериялық қауымдастығы стресске төзімді IPU болғанымен және оның ризосфералық бактериялық қауымдастығының құрылымы WT Май бұршақ бұршақтарына қарағанда тезірек қалпына келтірілуі мүмкін. Себебі TS Май бұршақсы RPU-ны детоксикациялаған болуы мүмкін, сондықтан олар өте жақсы өсіп, ризосфералық бактерияларды өзгерту үшін көбірек тамыр экссудатын берді. Нәтижесінде Май бұршақның TS ризосфералық бактерияларының бірлескен желісі тұрақты болды, барлық үш кезеңде теріс жиектер мен модульділіктің жоғары үлесі болды [Hernandez et al., 2021]. Дегенмен, TS Май бұршақ бұршақтары MPS стресс жағдайында ризосфералық бактериялар қауымдастығын қалай реттейтіні әлі зерттелмеген.

Қорытынды

Осы зерттеу бактериялық N-деметилазаның Май бұршаққа ауысуы өсімдіктердің IPA-ны тасымалдау және ыдырату қабілетін жақсарту алатынын көрсетті. Біз TS Май бұршақ бұршақтарында MPS болмаған кезде WT Май бұршақ бұршақтарымен айтарлықтай айырмашылықтар жоқ екенін көрсеттік. Алайда, mps стресс жағдайында TS Май бұршақ бұршақтары симбиотикалық азотты бекітудің жоғары көрсеткіштерін көрсетті [түйіндердің жалпы биомассасы 3,4 есе және нитрогеназа белсенділігі 3,6 есе] және WT Май бұршақсына қарағанда ризосфералық бактериялар қауымдастығының тұрақтылығын сақтау қабілетіне ие болды [теріс қырлары мен модульділігі жоғары]. Бұл нәтижелер MPS ластанған жерлерді фиторемедиациялау үшін әлеуетті биоқауіпсіз өсімдік биотехнологиясын қамтамасыз етеді.

Әдебиет:

1. Dellacioppa, G., Bauer, S.C., Klein, B.K., Shah, D.M., Fraley, R.T. and Kishore, G.M. [1986] Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 83, 6873–6877. Aktar, M.W., Sengupta, D. and Chowdhury, A. [2009] Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.* 2, 1–12.
2. Arpaia, S., Christiaens, O., Giddings, K., Jones, H., Mezzetti, B., Moronta-Barrios, F., Perry, J.N. et al [2020] Biosafety of GM crop plants expressing dsRNA: data requirements and EU regulatory considerations. *Front. Plant Sci.* 11, 13.
3. Chu, C.W., Liu, B., Liu, J.W., He, J., Lv, L.J., Wang, H.M., Xie, X.T. et al. [2020] Phytoremediation of acetochlor residue by transgenic *Arabidopsis* expressing the acetochlor N-dealkylase from *Sphingomonas wittichii* DC-6. *Sci. Total Environ.* 728, 138687. Baho, D.L., Rizzuto, S., Nizzetto, L., Hessen, D.O., Norberg, J., Skjelbred, B., Jones, K.C. et al. [2021] Ecological memory of historical contamination influences the response of phytoplankton communities. *Ecosystems*, 24, 1591–1607.
4. Cary, T.J., Rylott, E.L., Zhang, L., Routsong, R.M., Palazzo, A.J., Strand, S.E. and Bruce, N.C. [2021] Field trial demonstrating phytoremediation of the military explosive RDX by XplA/XplB-expressing switchgrass. *Nat. Biotechnol.* 39, 1216–1219.
5. Chauhan, L.K., Kumar, M., Paul, B.N., Goel, S.K. and Gupta, S.K. [2007] Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or isoprothuron on human peripheral lymphocytes and mouse bone marrow cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 48, 636–643.
6. Daubech, B., Remigi, P., de Moura, G.D., Marchetti, M., Pouzet, C., Auriac, M.C., Gokhale, C.S. et al. [2017] Spatio-temporal control of mutualism in legumes helps spread symbiotic nitrogen fixation. *Elife*, 6, e28683.