

© А. Ю. Степанова,  
Е. В. Орлова, Д. В. Терешонок,  
Ю. И. Долгих

ФГБУН «Институт физиологии  
растений им. К. А. Тимирязева»

Исследована возможность использования трансгенных растений и их комплекса с микроорганизмами для очистки почвы от нефтезагрязнений. Подобраны условия агробактериальной трансформации и получены трансгенные растения люцерны с геном *rhlA*, ответственным за биосинтез биосурфактанта — рамнолипида. Выращивание в почве, содержащей 4 % нефти, контрольных и трансгенных растений люцерны показало преимущество растений, выделяющих рамнолипиды: утилизация нефти была на 20 % выше по сравнению с контролем. При совместном использовании трансгенных растений и микроорганизмов *Candida maltosa* степень утилизации нефти удалось повысить до 86 %. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения трансгенных растений и их комплекса с микроорганизмами для повышения эффективности биоремедиации.

✿ **Ключевые слова:** *Medicago sativa*; *Candida maltosa*; фиторемедиация; ризодеградация; рамнолипиды; трансгенные растения.

✿ **Список сокращений:** 6-БАП — 6-бензиламинопурин; НУК — 1-нафтилуксусная кислота, SH — среда Шенка и Хильдебрандта.

## ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ (*MEDICAGO SATIVA* L.) ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФИТОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из последствий антропогенного воздействия является загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами. Только по официальным данным, в России потери при добыче, транспортировке, хранении нефти и нефтепродуктов составляют от 5 до 9 млн тонн в год (Фомин, 1999; Stroud et al., 2007), а в мире теряется, загрязняя окружающую среду, в среднем 50 млн тонн нефти и нефтепродуктов ежегодно (Фомин, 1999). В настоящее время в России нуждаются в рекультивации около 1,2 млн гектар земель, имеющих разную степень нефтезагрязненности.

Для очистки нефтезагрязненных почв обычно используют механические, физические, химические, биотехнологические, фитомелиоративные технологии. Рекультивация загрязненных нефтью территорий с помощью перечисленных выше подходов требует значительных материальных вложений, не всегда целесообразных, особенно если уровень загрязнения нефтью не превышает 50 г/кг грунта, а его площадь велика (Другов, Родин, 2011). Одним из перспективных и наиболее дешевых способов очистки нефтезагрязненных территорий является фиторемедиация, где для очистки используют растения и ассоциированные с ними микроорганизмы (Frick et al., 1999; Susarla et al., 2002). Несмотря на то, что в последнее время интерес к фиторемедиации нефтезагрязненных территорий сильно возрос, и проблема изучается с различных точек зрения, биотехнологические подходы, включающие генетическую инженерию, редко применяются для этих целей (Бричкова с соавт., 2003). Между тем генетическая инженерия зарекомендовала себя как перспективный способ получения растений для очистки территорий от тяжелых металлов, пестицидов и гербицидов (Abhilash et al., 2009; Cherian et al., 2005; Van Aken et al., 2004). Редкая встречаемость работ по очистке почвы от нефти связана с необходимостью поиска генов, кодирующих белки, воздействующие на группу гидрофобных веществ, входящих в состав нефти. Поскольку основным способом фиторемедиации почвы, загрязненной нефтью, является ризодеградация, при которой корневые выделения растений создают благоприятные условия для развития микроорганизмов, участвующих в процессах трансформации углеводов, то целесообразно получение трансгенных форм, способных продуцировать вещества, разрушающие высокомолекулярные фракции нефти, тем самым улучшая их доступность для микроорганизмов. Генетическая конструкция с одним из таких генов — геном рамнозилтрансферазы, контролирующим синтез биосурфактантов — рамнолипидов, из *Pseudomonas aeruginosa* (*rhlA*), была создана в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси (Brychkova et al., 2004). Этими же авторами была показана принципиальная возможность получения трансгенных растений, способных к очистке почвы от нефти. Однако полученные растения являлись модельными объектами и не обладали свойствами, необходимыми для эффективной фиторемедиации.

Люцерна посевная (*Medicago sativa* L.) широко используется для фиторемедиации нефтезагрязненных территорий, поскольку она устойчива к нефти, обладает хорошо развитой корневой системой, в ее ризосфере создаются благоприятные условия для развития микроорганизмов-деструкторов

Поступила в редакцию 07.04.2015  
Принята к публикации 19.05.2015

нефти и нефтепродуктов (Киреева с соавт., 2004; Shaw, Burns, 2003). При выращивании люцерны посевной почва обогащается азотом, что является важным условием для восстановления почвы, поскольку при загрязнении нефтью наблюдается дефицит элементов минерального питания (Муратова с соавт., 2003).

Целью данной работы было создание биоремедиационного комплекса «растения-микроорганизмы» для очистки почвы от нефтезагрязнений, а также повышение эффективности данного комплекса путем введения в растения гена *rhlA*. Для этого необходимо было решить несколько задач: изучить фиторемедиационные свойства растений люцерны; оценить эффективность совместного использования растений люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) и микроорганизмов *Candida maltosa* штамм 569 для биоремедиации нефтезагрязненных почв; исследовать возможность повышения фиторемедиационной способности за счет введения гена *rhlA*, контролирующего синтез рамнозилтрансферазы; изучить целесообразность использования комплекса «трансгенные растения с геном *rhlA* — микроорганизмы» для фиторемедиации почвы, загрязненной нефтью.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Объекты исследований

В качестве объекта исследований использовали люцерну посевную (*Medicago sativa* L.) — многолетнее травянистое растение; семейства бобовые (Fabaceae). Это растение хорошо растет и развивается при 22–30 °С. В условиях достаточного увлажнения успешно переносит высокую температуру (37–42 °С). Обладает хорошей холодостойкостью (от –15 до –30 °С). В качестве микробной компоненты использовали нефтеокисляющие дрожжи *Candida maltosa*, которые широко распространены в воде и почве, загрязненных нефтепродуктами, и способны утилизировать широкий спектр углеводов нефти. При этом известно, что при добавлении сурфактантов биодоступность нефти для *Candida maltosa*, а, следовательно, и скорость ее биодеградации, увеличивается (Chrzanowski et al., 2006).

### Постановка почвенных опытов

Для почвенных опытов семена люцерны проращивали на смоченной водой фильтровальной бумаге, 14-дневные проростки для доращивания переносили в специальные контейнеры с дренажем, куда заливали 1/2 раствор макро- и микросолей по Шенку и Хильдебрандту (SH) (Schenk, Hildebrandt, 1972) и выращивали в течение месяца при +23 °С и освещенности 10 000–15 000 лк, после чего их высаживали в почву. Эксперименты с нефтезагрязненным грунтом проводили в специальных емкостях-лотках, куда вносили 400 г. нестерильной почвы и нефть в количестве 4 % масс. Затем высаживали растения по 10 штук в лоток и помещали в термостати-

рованное помещение при температуре +26 °С. Продолжительность экспериментов составляла 56 суток. Опыты проводили в 3-х повторностях.

Использованная в работе нефть была получена от Московского нефтеперерабатывающего завода (МНПЗ) и имела следующие характеристики: удельный вес — 0,83 г/см<sup>3</sup>; суммарное содержание углеводов — 81,2 %, в том числе: п-алканов — 9,3 %; изоалканов — 7,9 %; нафтенов — 11,7 %; ароматических углеводов — 64 %; содержание смол — 3,1 %; содержание асфальтенов — 4,0 %. Деградацию нефти исследуемыми штаммами и растениями оценивали по снижению содержания нефти в грунте (почве) и выражали в % относительно начального количества. Определение проводили с помощью гравиметрического метода (Другов, Родин, 2011).

### Получение асептического материала

Для получения асептического материала семена люцерны помещали в 70 % этиловый спирт на 30 с, затем переносили в раствор коммерческого отбеливателя «Белизна» (7–9 % активного хлора) на 30 минут, после чего их 3 раза промывали стерильной дистиллированной водой. Стерильные семена проращивали на среде SH с половинной нормой макро- и микроэлементов и без сахарозы.

### Подбор питательных сред для получения растений-регенерантов люцерны

Растения-регенеранты люцерны получали с помощью прямой регенерации. В качестве эксплантов использовали семядоли семидневных проростков, которые высаживали на модифицированную среду SH с гормонами: 3 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК и 10 г/л сахарозы (Орлова, Степанова, 2012). Регенерировавшие побеги для укоренения пересаживали в стерильные сосуды объемом 100 мл на безгормональную среду SH с половинным содержанием макро- и микроэлементов и 5 г/л сахарозы. Полностью сформированные растения перед высадкой в почву адаптировали в воде в течение 10–14 дней. Частоту регенерации определяли как отношение числа регенерантов к общему числу эксплантов. Каждый опыт повторяли не менее трех раз, каждая повторность включала не менее 100 эксплантов.

### Генетическая конструкция

Для трансформации использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, содержащий бинарный вектор pBI121 с селективным геном *nptII*, который кодирует фермент неомизинфосфотрансферазу, обеспечивающую устойчивость к канамицину, под промотором NOS и целевым геном *rhlA* под промотором 35S вируса мозаики цветной капусты. Штамм LBA4404 выращивали на агаризованной питательной среде YM (Vincent, 1970) с антибиотиками 100 мг/л стрептомицина и 50 мг/л ка-

намицина. Перед трансформацией суспензионную культуру агробактерии наращивали в течение 24 часов при +23 °С на качалке с круговым вращением (амплитуда 5–10 см, скорость вращения 100 об/мин.) с антибиотиками в той же концентрации.

#### Трансформация люцерны

Для получения трансгенных растений люцерны использовали инкубацию эксплантов в суспензии и на газоне агробактерии (см. результаты и обсуждение). Канамицин-устойчивые растения с хорошо сформированными корнями рассматривали в качестве потенциальных трансформантов и отбирали для ПЦР-анализа на наличие вставки трансгена. Частоту трансформации оценивали как отношение числа канамицин-устойчивых растений-регенерантов к общему числу эксплантов, инокулированных агробактерией, и выражали в процентах.

#### Анализ канамицин-устойчивых растений люцерны методом ПЦР

Трансформанты, устойчивые к канамицину, проверяли на наличие последовательностей генов *rhlA* и *nptII* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). ДНК трансформированных растений выделяли из 50 мг молодых листьев (Moller et al., 1992). Для анализа трансформантов методом ПЦР применяли следующие пары праймеров: *rhlA*-Dir 5'-TGC-GGC-TCC-GGT-TGC-TTC-AG-3', *rhlA*-Rev 5'-CGC-GGG-TTG-ATC-ACC-AAG-GAC-3' (для гена *rhlA*); *nptII*-Dir 5'-GTG-GAG-AGG-CTA-TTC-GGC-TA-3', *nptII*-Rev 5'-CCA-CCA-TGA-TAT-TCG-GCA-AG-3' (для гена *nptII*). Праймеры были синтезированы НПФ «Литех» (Россия). Для амплификации использовали *Taq*-полимеразу и 10-кратный буфер с  $Mg^{2+}$  (700 ммоль/литр Трис-НСl, рН 8.6 при 25 °С, 166 ммоль/литр  $(NH_4)_2SO_4$ , 25 ммоль/литр  $MgCl_2$ ) и dNTP компании «Силекс». Амплификацию проводили в программируемом термоциклере Терцик (ЗАО «ДНК-Технология», Россия) при следующих условиях: первичная денатурация 2 мин при 94 °С; 5 циклов: денатурация 20 с при 94 °С, отжиг 10 с при 60–65 °С, элонгация 10 с при 72 °С; 35 циклов: денатурация 5 с при 94 °С, отжиг 5 с при 60–65 °С, элонгация 5 с при 72 °С; заключительная элонгация 2 мин при 72 °С. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 2%-ном агарозном геле с 0,01 % бромистым этидием в 1X буфере TBE. Для определения длины фрагментов использовали маркер M26 (100 bp + 2 Kb + 3 Kb ДНК Маркер) «СибЭнзим» (Россия). Для проверки чистоты реактивов в качестве отрицательного контроля (К-) в реакцию смесь вместо исследуемой ДНК добавляли 2 мкл воды.

#### Анализ транскрипции генов методом ОТ-ПЦР

Транскрипцию целевого гена *rhlA* определяли с помощью метода обратнo-транскрипционной ПЦР (ОТ-ПЦР). Для этого проводили выделение тотальной

РНК фенольным методом (Karr et al., 1993) из 400 мг молодых листьев. Очистку полученной РНК от ДНК-примесей осуществляли с помощью набора EN0525 (Fermentas) по протоколу изготовителя. Синтез первой цепи кДНК осуществляли с помощью набора реагентов K1512 (Fermentas) по методике изготовителя. Амплификацию и разделение продуктов реакции проводили аналогично описанному выше ПЦР-анализу.

#### Определение содержания рамнозы

Для определения использовали фотоэлектроколориметрический метод с применением антронового реактива (Hodge, Hofreiter, 1962). Оптическую плотность раствора определяли на фотоэлектроколориметре с длиной волны 625 нм. Содержание рамнозы рассчитывали по заранее построенному калибровочному графику.

#### Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерной программы Microsoft® Excel. В тексте приведены средние арифметические величины параметров. Бары на диаграмме соответствуют максимальным величинам доверительных интервалов при 95 %-ном уровне вероятности по *t*-критерию Стьюдента. Все эксперименты проводили не менее чем в трехкратной повторности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Получение трансгенных растений люцерны

Первые работы по получению трансгенных растений люцерны с помощью *Agrobacterium tumefaciens* относятся к 80–90-м годам прошлого века (Deak et al., 1986; Shahin et al., 1986). Однако работы носили поисковый характер — частота трансформации была небольшой, генетические конструкции (вектора) содержали только селективные или репортерные гены. В настоящее время, несмотря на обилие публикаций по успешной агробактериальной трансформации люцерны (Rosellini et al., 2007; Zhang et al., 2010), все еще имеются трудности, связанные с необходимостью индивидуального подбора условий трансформации в зависимости от генотипа, типа экспланта, штамма агробактерии и вектора для трансформации (Nincovic et al., 2004; Ziauddin et al., 2004). В литературе описаны следующие основные подходы, применяемые при агробактериальной трансформации: инкубация эксплантов в суспензии агробактерии (Fragova et al., 2011; Liu et al., 2013; Zhang et al., 2010) в условиях вакуумной инфильтрации; культивирование на газоне агробактерии (Trinh et al., 1998); в редких случаях — трансформация *in planta* (Weeks et al., 2008). В качестве эксплантов обычно используют эмбрионды, каллусы, семядоли, гипокотили, листовые диски, а также проростки и семена (Nincovic et al., 2004; Ziauddin et al., 2004; Uzelac et al., 2007).

Таблица 1

## Результаты трансформации, проведенной путем инкубации эксплантов на газоне агробактерии

№ опыта	Число эксплантов		Экспланты с побегами на среде с цефотаксимом и канамицином		Растения-регенеранты		Канамицин-устойчивые растения-регенеранты	
	Каллусы	Семядоли	Число	%	Число	%	Число	%
1		211	25	11,8	10	4,7	5	2,4
2		136	20	14,7	9	6,6	5	3,7
3		200	36	18	8	4	4	2
4		353	80	23	35	9,9	12	3,4
5		450	112	24,8	75	16,7	10	2,2
6		649	168	25,9	153	23,6	25	3,8
<b>Всего</b>		<b>1999</b>	<b>441</b>	<b>22</b>	<b>290</b>	<b>14,5</b>	<b>61</b>	<b>3,0</b>
7	240		0	0	0	0	0	0
8	150		15	10	2	2,5	0	0
<b>Всего</b>	<b>390</b>		<b>15</b>	<b>3,8</b>	<b>2</b>	<b>0,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

В нашей работе были использованы две основные схемы агробактериальной трансформации. Для активации *vir*-области перед трансформацией в обоих случаях в суспензионную культуру агробактерии добавляли экстракт из листьев табака (Messens et al., 1990). Первый вариант предусматривал совместную инкубацию эксплантов (каллусов и семядолей) в суспензии агробактерии в условиях вакуумной инфльтрации (до  $-0,8$  атм.) в течение 40 минут. После вакуумной инфльтрации экспланты высаживали на твердую питательную среду SH без антибиотиков и выдерживали в течение 1–3 суток на сформировавшемся газоне агробактерии, затем пересаживали на ту же среду, но с добавлением антибиотика цефотаксима (500–700 мг/л) и канамицина 100 мг/л. По этой схеме было обработано 248 каллусов и 257 семядолей, но не было получено растений-регенерантов, поскольку экспланты теряли способность к морфогенезу в результате токсического действия бактерии.

Во втором варианте экспланты помещали на газон агробактерии на сутки, затем пересаживали на среду SH с 3 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК с 10 г/л сахарозы с цефотаксимом (500–700 мг/л). После появления побегов, их высаживали на ту же среду, но с добавлением и цефотаксима (300 мг/л), и канамицина (100 мг/л) и выдерживали в течение месяца. Зеленые побеги переносили на среду для укоренения с обоими антибиотиками. При использовании в качестве эксплантов семядолей было получено 290 растений-регенерантов, из которых 61 растение оказалось канамицин-устойчивым (табл. 1). Увеличение времени совместного культивирования семядолей на газоне агробактерии до 48–72 часов приводило к потере возможности регенерации, возможно, из-за токсического действия агробактерии на экспланты.

Из каллусов, как и в случае предыдущей трансформации, не удалось получить растений-регенерантов (табл. 1, опыты 7, 8), в результате сильного зарастания *Agrobacterium tumefaciens*.

Укоренившиеся регенеранты проверяли на наличие генов *nptII* и *rhlA* с помощью ПЦР (рис. 1). Было показано, что 58 % канамицин-устойчивых растений содержали ген *nptII* и только 32 % *nptII+rhlA* (рис. 1).

Транскрипцию целевого гена *rhlA* оценивали с помощью метода ОТ-ПЦР. Было показано, что интродуцированный ген *rhlA* транскрибируется у большинства ПЦР-положительных растений (рис. 2, 3).

Известно, что в некоторых случаях присутствие сигнала о наличии генов при проведении ПЦР зависит не от встроения в геном растений Т-ДНК, а от присутствия *A. tumefaciens*

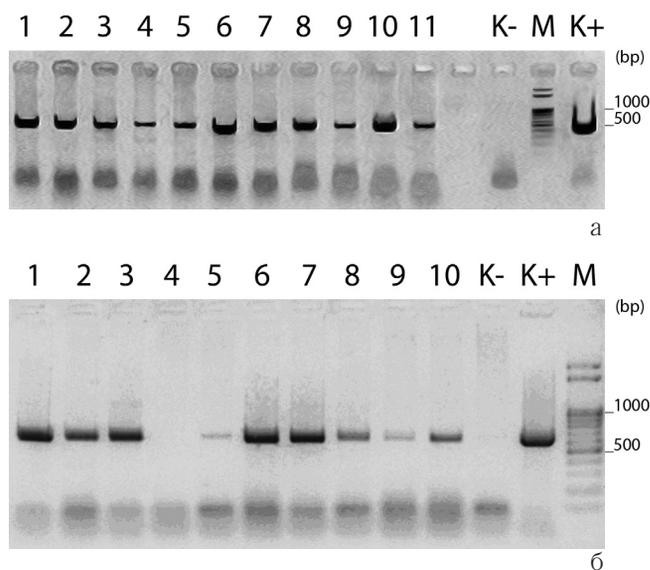
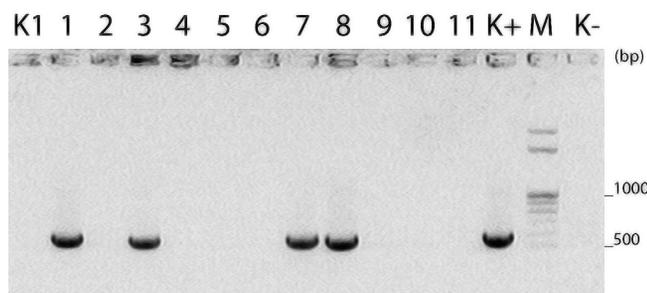
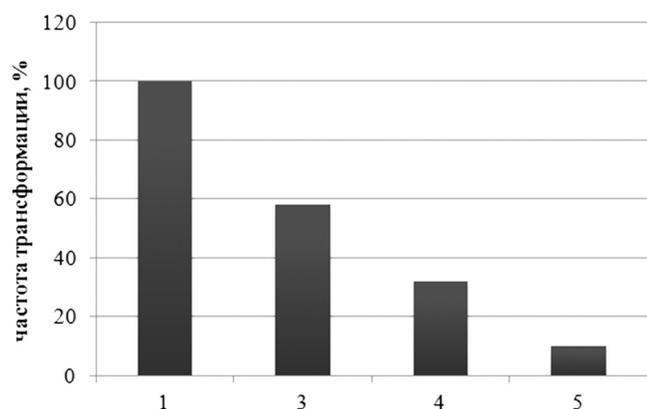


Рис. 1. Пример электрофореграммы продуктов ПЦР ДНК растений люцерны. а — со специфичными к гену *nptII* праймерами, б — со специфичными к гену *rhlA* праймерами: 1–11 — ДНК трансформированных растений, К– — отрицательный контроль (вода); М — маркер молекулярного веса (100–1000 бп + 2 Кб + 3 Кб); К+ — положительный контроль (вектор pBI121 с вставкой)



**Рис. 2.** Пример электрофореграммы продуктов амплификации кДНК растений люцерны со специфичными праймерами к гену *rhlA*. 1–10 — кДНК трансгенных растений; K1 — кДНК нетрансгенного растения; K– — отрицательный контроль (вода вместо ДНК-содержащей пробы); M — маркер молекулярного веса (100–1000 bp + 2 Kb + 3 Kb); K+ — положительный контроль (вектор pB121 с вставкой)



**Рис. 3.** Частота трансформации растений люцерны. 1 — количество канамин-устойчивых растений принятое за 100 %; 2 — количество ПЦР-положительных растений по гену *nptII*, в %; 3 — количество ПЦР-положительных растений по гену *rhlA*, в %; 4 — количество растений с экспрессией гена *rhlA*, в %

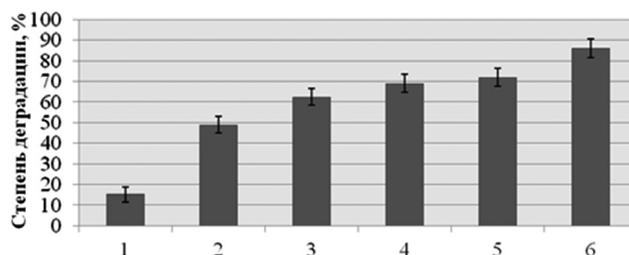
*faciens* в растительных тканях. Поэтому для оценки возможности присутствия *A. tumefaciens*, используемой для трансформации, в растениях люцерны после культивирования на среде с цефатоксимом проводили ПЦР-анализ полученных растений с праймерами к агробактериальному гену *VirD2*. Результаты данного анализа показали, что агробактерия отсутствует в тканях растений-трансформантов (данные не приведены). Таким образом, двухнедельное культивирование на среде с 500–700 мг/л цефатоксима приводило к полной элиминации агробактерий.

Поскольку ген *rhlA* кодирует фермент рамнозилтрансферазу, которая участвует в биосинтезе рамнолипидов, нами была проведена оценка их содержания по количеству выделяемой рамнозы. Надо отметить, что, по данным литературы, рамноза присутствует в экссудатах растений (Vanciga, 1964). Это было показано и в наших экспериментах: контрольные растения и растения с геном *rhlA* секретировали рамнозу. Тем не менее ее содержание в воде в случае выращивания трансгенных растений было

выше в 8,9 раз по сравнению с контролем. Среднее содержание рамнозы составляло 16,6 мг/мл и 147,5 мг/мл для контроля и растений с целевым геном, соответственно. Примерное содержание рамнолипидов с учетом поправочного коэффициента (2,25), предложенного Deziel et al. (Deziel et al., 2000) для липидной компоненты, составляет 37,3 и 332 мг/л для контроля и растений с *rhlA*. Для сравнения: количество рамнолипидов, выделяемых в среду микроорганизмами-деструкторами нефти *Pseudomonas* sp., может варьировать от 2 до 600 мг/л в зависимости от температуры и pH среды (Ochsner, Reiser, 1995; Wang et al., 2007) и достигать до 1500 мг/л в случае трансгенных бактерий с *rhlAB* (Wittgens et al., 2011), что вполне соответствует нашим данным, полученным на люцерне.

*Оценка фиторемедиационных свойств трансгенной люцерны*

В следующей части работы необходимо было оценить биоремедиационный потенциал трансгенных и нетрансгенных растений люцерны, а также комплекса с микроорганизмами *Candida maltosa* в качестве тест-культуры. Известно, что эффективные деструкторы нефти встречаются как среди бактерий, так и среди грибов, но большинство исследований сконцентрировано на бактериях. Среди бактерий часто встречаемыми являются: *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Alcaligenes* sp., *Acinetobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Micrococcus roseus* (Das, Chandran, 2011); среди грибов: *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia* (Chaillan et al., 2004). Хотя, согласно некоторым авторам, перспективнее использовать грибы, поскольку они утилизируют больший круг углеводов (Chrzanowski et al., 2006). В качестве контроля служила почва с нефтью, но без растений. Было показано, что даже без применения специальных мер, за счет деятельности аборигенной микрофлоры наблюдалось снижение содержания в почве нефтепродуктов на 15 % к 56 суткам, что свидетельствует о высокой способности к деструкции нефти микроорганизмами почвы (рис. 4).



**Рис. 4.** Эффективность дегградации нефти в почве за 56 суток: 1 — контроль (почва); 2 — нетрансгенные растения люцерны; 3 — *Candida maltosa*; 4 — нетрансгенные растения + *Candida maltosa*; 5 — трансгенные растения люцерны с геном *rhlA*; 6 — трансгенные растения + *Candida maltosa*. Бары на диаграмме соответствуют максимальным величинам доверительных интервалов при 95%-ном уровне вероятности по t-критерию Стьюдента

При выращивании нетрансгенных растений люцерны в загрязненном грунте наблюдалось более отчетливое снижение содержания нефти, после 56 суток в почве оставалось 50,5 % нефти по сравнению с первоначальным уровнем. Полученные результаты подтверждают высокий фиторемедиационный потенциал люцерны. Однако применение только *Candida maltosa* позволило повысить утилизацию нефти до 62 %, что выше, чем при использовании растений. При совместном выращивании люцерны и микроорганизмов деградация нефти была еще больше и составила 69 %, что свидетельствует о благоприятном влиянии растений на утилизацию нефти грибами *Candida maltosa*.

Интересно, что при выращивании только трансгенных растений люцерны утилизация нефти составляла 71 %, что сопоставимо с результатами, полученными на микроорганизмах, и выше, чем при использовании нетрансгенных растений. Следовательно, наши предположения о том, что выделение биосурфактантов должно способствовать утилизации нефти, за счет повышения ее биодоступности, оказалось верным. Это подтверждается и прямыми экспериментами, когда добавление к трансгенным растениям *Candida maltosa* позволило увеличить деградацию нефти до 86 %.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе предложен подход для повышения эффективности фиторемедиации нефтезагрязненных территорий. В основу этого подхода легло представление о том, что основным механизмом фиторемедиации почвы, загрязненной нефтью, является ризодеградация. Следовательно, улучшение взаимодействия между растениями и микроорганизмами могло способствовать ускорению деградации углеводородов нефти. Для этого были получены трансгенные растения люцерны с геном *rhlA*, ответственным за синтез биосурфактантов — рамнолипидов. Предполагалось, что выделяемые трансгенными растениями биосурфактанты солюбилизируют углеводороды нефти, облегчая их доступность для микроорганизмов-деструкторов нефти. Действительно, трансгенные растения улучшали фиторемедиацию, а в комплексе с микроорганизмами-деструкторами нефти *Candida maltosa* значительно повышали утилизацию нефти в почве (до 86 %), что свидетельствует о перспективности использования комплекса «трансгенные растения — микроорганизмы» для биоремедиации. Таким образом, повышение эффективности взаимодействия между растениями и микроорганизмами посредством получения трансгенных растений является перспективным для фиторемедиационных технологий и представляет интерес для теоретических исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бричкова Г. Г., Сорокин А. П., Манешина Т. В., Курман П. В., Красовская Л. И., Джонс Дж. Дж., Кар-

тель Н. А. (2003) Создание трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* для эффективной ремедиации территорий, загрязненных углеводородами нефти. Доклады НАН Беларуси. Т. 47 (5): С. 72–75.

2. Другов Ю. С., Родин А. А. (2011) Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов. М: Изд-во Бином. Лаборатория знаний.
3. Киреева Н. А., Тарасенко Е. М., Бакаева М. Д. (2004) Детоксикация нефтезагрязненных почв под посевами люцерны (*Medicago sativa* L.). Агрохимия. Т. (10): С. 68–72.
4. Муратова А. Ю., Турковская О. В., Хюбнер Т., Кушк П. (2003) Использование люцерны и тростника для фиторемедиации загрязненного углеводородами грунта. Прикладная биохимия и микробиология. Т. 39 (6): С. 681–688.
5. Орлова Е. В., Степанова А. Ю. (2012) Оптимизация условий культивирования *in vitro* люцерны посевной (*Medicago sativa* L.). Ученые записки Орловского государственного университета. Серия: естественные, технические, медицинские науки. Т. (3): С. 128–131.
6. Фомин Г. С. (1999) Коррозия и защита от коррозии: Энциклопедия международных стандартов. М: Изд-во стандартов.
7. Abhilash P. C., Jamil S., Singh N. (2009) Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. Biotechnology advances. V. 27: P. 474–488.
8. Brychkova G. G., Sorokin A. P., Kartel N. A. (2004) Bioremediation with ecologically safe plants. NATO science series. Series 1: Life and behavioural science IOS press. V. 359: P. 147–158.
9. Chaillan F., Le Fleche A., Bury E., Phantavong Y. H., Grimont P., Saliot A., Oudot J. (2004) Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. Research in microbiology. V. 155 (7): P. 587–595.
10. Cherian S., Oliveira M. M. (2005) Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. Environmental science and technology. V. 39: P. 9377–9390.
11. Chrzanowski L., Kaczorek E., Olszanowski A. (2006) The ability of candida maltosa for hydrocarbon and emulsified hydrocarbon degradation. Polish journal of environmental studies. V. 15 (1): P. 47–51.
12. Das N., Chandran P. (2011) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants. An Overview. Biotechnology research international. DOI: 10.4061/2011/941810.
13. Deak M., Kiss G. B., Koncz C., Dudits D. (1986) Transformation of Medicago by Agrobacterium mediated gene transfer. Plant cell reports. V. 5 (2): P. 97–100.
14. Deziel E., Lepine F., Milot S., Villemur R. (2000) Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa*

- strain 57RP. *Biochimica et biophysica acta*. V. 1485: P. 145–152.
15. Faragova N., Gottwaldova K., Farago J. (2011) Effect of transgenic alfalfa plants with introduced gene for Alfalfa Mosaic Virus coat protein on rhizosphere microbial community composition and physiological profile. *Biologia*. Section botany. V. 66 (5): P. 768–777.
16. Frick C., Farrell R., Germida J. (1999) Assessment of phytoremediation as an in situ Technique for Cleaning Oil-Contaminated Sites. Calgary: Petroleum technology alliance of Canada. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3561093/>.
17. Hodge J.E., Hofreiter B. T. (1962) *Methods in carbohydrate chemistry*. New York: Academic press. URL: <http://www.ijabpt.com/pdf/70034-V.%20K.%20PARTHIBAN1.pdf>.
18. Krapp A., Hofmann B., Schafer C. et al. (1993) Regulation of the expression of rbc S and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink' regulation of photosynthesis? *The plant journal*. V. 3 (6): P. 817–828.
19. Liu W., Liang Z., Shan Ch., Marsolais F. et al. (2013) Genetic transformation and full recovery of alfalfa plants via secondary somatic embryogenesis. *In vitro cellular and developmental biology — plant*. V. 49: P. 17–23.
20. Messens E., Dekeyser R., Stachel S.E. (1990) A non-transformable *Triticum monococcum* monocotyledonous culture produces the potent *Agrobacterium* vir-inducing compound ethyl ferulate. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. V. 87: P. 4368–4372.
21. Moller E.M., Bahnurg G., Sandermann H., Jeiger H.H. (1992) A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic acids research*. V. 20 (22): P. 6115–6116.
22. Ninovic S., Miljus-Dukic J., Vinterhalter B. et al. (2004) Improved transformation of alfalfa somatic embryos using superbinary vector. *Acta biologica cracoviensia. Series botanica*. V. 46: P. 139–143.
23. Ochsner U.A., Reiser J. (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the national academy of sciences, USA*. V. 92: P. 6424–6428.
24. Rosellini D., Capomaccio S., Ferradini N. et al. (2007) Non-antibiotic, efficient selection for alfalfa genetic engineering. *Plant cell reports*. V. 26: P. 1035–1044.
25. Schenk R.U., Hildebrandt A.C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian journal of botany*. V. 50 (1): P. 199–204.
26. Shahin E.A., Spielmann A., Sukhapinda K. et al. (1986) Transformation of cultivated alfalfa using disarmed *Agrobacterium tumefaciens*. *Crop science*. V. 26: P. 1235–1239.
27. Shaw L.J., Burns R.G. (2003) Biodegradation of organic Pollutants in the Rhizosphere. *Advances in applied microbiology*. V. 53: P. 1–47.
28. Stroud J., Paton G., Semple K. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation (2007) *Journal of applied microbiology*. V. 102: P. 1239–1253.
29. Susarla S., Medina V.F., McCutcheon S.C. (2002) Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination *Ecological engineering*. V. 18: P. 647–658.
30. Trinh T.H., Ratet P., Kondorosi E. et al. (1998) Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp. *falcata* lines improved in somatic embryogenesis. *Plant cell reports*. V. 17: P. 345–355.
31. Uzelac B., Ninkovic S., Smigocki A. et al. (2007) Origin and development of secondary somatic embryos in transformed embryogenic cultures of *Medicago sativa*. *Biologia plantarum*. V. 51: P. 1–6.
32. Van Aken B., Yoon J.M., Schnoor J.L. (2004) Biodegradation of nitro-substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic methylobacterium sp. associated with poplar tissues (*Populus deltoides* × *nigra* DN34). *Applied and environmental microbiology*. V. 70: P. 508–517.
33. Vancura V. (1964) Root exudates of plants. I. Analysis of root exudates of barley and wheat in their initial phases of growth. *Plant and soil* XXI. V. 2: P. 231–248.
34. Vincent J.M. (1970) *A manual for the practical study of root nodule bacteria* IBP Handbook. Oxford: Blackwell Scientific. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.1972.tb04828.x/pdf>.
35. Wang Q.H., Fang X.D., Bai B.J. et al. (2007) Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnology and bioengineering*. V. 98: P. 842–853.
36. Weeks J.T., Jingsong Y., Rommens C.M. (2008) Development of an *in planta* method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic research*. V. 17: P. 587–597.
37. Wittgens A., Tiso T., Arndt T.T. et al. (2011) Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial cell factories*. V.10: P. 1–18.
38. Zhang H., Huang Q., Su J. (2010) Development of alfalfa (*Medicago sativa* L.) regeneration system and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Agricultural sciences in China*. V. 9 (2): P. 170–178.
39. Ziauddin A., Lee R.W.H., Lo R.Y.C., Shewen P.E., Strommer J.N. (2004) Transformation of alfalfa with a bacterial fusion gene, *Mannheimia haemolytica* A1 *leukotoxin50-gfp*: response with *Agrobacterium tumefaciens* strains LBA4404 and C58. *Plant cell, tissue and organ culture*. V. 79: P. 271–278.

## OBTAINING OF TRANSGENIC ALFALFA FOR IMPROVED PHYTOREMEDIATION THE PETROLEUM CONTAMINATED SOILS

Stepanova A. Yu., Orlova E. V., Teteshonok D. V., Dolgikh Yu. I.

✿ **SUMMARY:** *Background.* The possibility of using transgenic plants and their complexes with microorganisms to clean up soil from oil pollution is a topical area of researches. In our work the transgenic alfalfa plants with a gene *rhlA*, responsible for the biosynthesis of biosurfactant — rhamnolipid, were obtained. Rhamnolipids help to reduce the surface tension of the hydrocarbon oil and its desorption from soil particles, thereby facilitating its recycling by microorganism. *Material and methods.* The protocol for agrobacterium-mediated transformation was optimized, transgenic alfalfa plants with a gene *rhlA* were obtained and their status was confirmed by molecular analysis. *Results.* Cultivation of the control and the transgenic alfalfa plants in soil polluted with 4 % oil showed the advantage of plants emitting rhamnolipids: recycle oil was 71 % for 56 days and it was 20 % higher compared with the control plants. When used together, the transgenic plants and microorganism *Candida maltosa* increased the degree of degradation of the oil to 86 %. *Conclusion.* The results suggest promising application of transgenic plants and the complex “transgenic plants — microorganisms” to increase the efficiency of bioremediation.

✿ **KEY WORDS:** *Medicago sativa*; *Candida maltosa*; phytoremediation; rhizodegradation; rhamnolipids; transgenic plants.

✿ **ABBREVIATIONS BAP:** 6 — Benzylaminopurine; NAA — 1-naphthaleneacetic acid; SH — Schenk and Hildebrandt medium.

### ✿ REFERENCES (TRANSLITERATED)

1. Brichkova G. G., Sorokin A. P., Maneshina T. V., Kurman P. V., Krasovskaja L. I., Dzhons Dzh. Dzh., Kartel' N. A. (2003) Sozdanie transgennyh rastenij Arabidopsis thaliana dlja jeffektivnoj remediatsii territorij, zagrjaznennyh uglevodorodami nefi. [Growth of transgenic Arabidopsis thaliana plants for effective remediation of sites contaminated with oil hydrocarbons]. Doklady NAN Belarusi. V. 47 (5): P. 72–75.
2. Drugov Ju. S., Rodin A. A. (2007) Jekologicheskie analizy pri razlivah nefi i nefteproduktov. [Ecological analyzes for oil spills and oil products]. M: Izd-vo Binom. Laboratorija znanij [BKL Publishers Binom].
3. Kireeva N. A., Tarasenko E. M., Bakaeva M. D. (2004) Detoksikacija neftezagrjaznennyh pochv pod posevami ljucerny (*Medicago sativa* L.) [Detoxification of oil contaminated soils under alfalfa (*Medicago Sativa* L.) plantations]. Agrokhimija. (10): 68–72.
4. Muratova A. Yu., Turkovskaya O. V., Hübner T., Kuschik P. (2003) Studies of the efficacy of alfalfa and reed in the phytoremediation of hydrocarbon-polluted soil. Applied biochemistry and microbiology. V. 39 (6): P. 599–605.
5. Orlova E. V., Stepanova A. Ju. (2012) Optimizatsija uslovij kul'tivirovanija in vitro ljucerny posevnoj (*Medicago sativa* L.). [The optimization of cultivation condition in vitro of alfalfa (*Medicago sativa* L.)]. Uchenye zapiski Orlovskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: estestvennyye, tehnicheckie, medicinskie nauki. V. 3: P. 128–131.
6. Fomin G. S. (1999) Korrozija i zashhita ot korrozii: Jenciklopedija mezhdunarodnyh standartov M: Izd-vo standartov.
7. Abhilash P. C., Jamil S., Singh N. (2009) Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. Biotechnology Ad. V. 27: P. 474–488.
8. Brychkova G. G., Sorokin A. P., Kartel N. A. (2004) Bioremediation with ecologically safe plants. NATO science series. Series 1: Life and behavioural science IOS press. V. 359: P. 147–158.
9. Chaillan F., Le Fleche A., Bury E., Phantavong Y. H., Grimont P., Saliot A., Oudot J. (2004) Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. Research in microbiology. V. 155 (7): P. 587–595.
10. Cherian S., Oliveira M. M. (2005) Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. Environmental science and tech. V. 39: P. 9377–9390.
11. Chrzanowski L., Kaczorek E., Olszanowski A. (2006) The ability of candida maltosa for hydrocarbon and emulsified hydrocarbon degradation. Polish journal of environmental studies. V. 15 (1): P. 47–51.
12. Das N., Chandran P. (2011) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants. An Overview. Biotechnology research inter. DOI: 10.4061/2011/941810.
13. Deak M., Kiss G. B., Konec C., Dudits D. (1986) Transformation of *Medicago* by Agrobacterium mediated gene transfer. Plant cell reports. V. 5 (2): P. 97–100.
14. Deziel E., Lepine F., Milot S., Villemur R. (2000) Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. Biochimica et biophysica acta. V. 1485: P. 145–152.
15. Faragova N., Gottwaldova K., Farago J. (2011) Effect of transgenic alfalfa plants with introduced gene for Alfalfa Mosaic Virus coat protein on rhizosphere microbial community composition and physiological profile. Biologia. Section botany. V. 66 (5): P. 768–777.
16. Frick C., Farrell R., Germida J. (1999) Assessment of phytoremediation as an in situ Technique for Cleaning Oil-Contaminated Sites. Calgary: Petroleum technology alliance of Canada. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3561093/>.
17. Hodge J. E., Hofreiter B. T. (1962) Methods in carbohydrate chemistry. New York: Academic press. URL: <http://www.ijabpt.com/pdf/70034-V.%20K.%20PARTHIBAN1.pdf>.
18. Krapp A., Hofmann B., Schafer C. et al. (1993) Regulation of the expression of rbc S and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the ‘sink’ regulation of photosynthesis? The plant J. V. 3 (6): P. 817–828.
19. Liu W., Liang Z., Shan Ch., Marsolais F. et al. (2013) Genetic transformation and full recovery of alfalfa plants via secondary somatic embryogenesis. In vitro cellular and developmental biology — plant. V. 49: P. 17–23.

20. Messens E., Dekeyser R., Stachel S.E. (1990) A non-transformable *Triticum monococcum* monocotyledonous culture produces the potent *Agrobacterium* vir-inducing compound ethyl ferulate. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. V. 87: P. 4368–4372.
21. Moller E.M., Bahnurg G., Sandermann H., Jeiger H.H. (1992) A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic acids research*. V. 20 (22): P. 6115–6116.
22. Nincovic S., Miljus-Dukic J., Vinterhalter B. et al. (2004) Improved transformation of alfalfa somatic embryos using superbinary vector. *Acta biologica cracoviensia. Series botanica*. V. 46: P. 139–143.
23. Ochsner U.A., Reiser J. (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the national academy of sciences, USA*. V. 92: P. 6424–6428.
24. Rosellini D., Capomaccio S., Ferradini N. et al. (2007) Non-antibiotic, efficient selection for alfalfa genetic engineering. *Plant cell reports*. V. 26: P. 1035–1044.
25. Schenk R.U., Hildebrandt A.C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian journal of botany*. V. 50 (1): P. 199–204.
26. Shahin E.A., Spielmann A., Sukhapinda K. et al. (1986) Transformation of cultivated alfalfa using disarmed *Agrobacterium tumefaciens*. *Crop science*. V. 26: P. 1235–1239.
27. Shaw L.J., Burns R.G. (2003) Biodegradation of organic Pollutants in the Rhizosphere. *Advances in applied microbiology*. V. 53: P. 1–47.
28. Stroud J., Paton G., Semple K. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation (2007) *Journal of applied microbiology*. V. 102: P. 1239–1253.
29. Susarla S, Medina V.F., McCutcheon S.C. (2002) Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination *Ecological engineering*. V. 18: P. 647–658.
30. Trinh T.H., Ratet P., Kondoros E. et al. (1998) Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp. *falcata* lines improved in somatic embryogenesis. *Plant cell reports*. V. 17: P. 345–355.
31. Uzelac B., Ninkovic S., Smigocki A. et al. (2007) Origin and development of secondary somatic embryos in transformed embryogenic cultures of *Medicago sativa*. *Biologia plantarum*. V. 51: P. 1–6.
32. Van Aken B., Yoon J.M., Schnoor J.L. (2004) Biodegradation of nitro-substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic methylobacterium sp. associated with poplar tissues (*Populus deltoides* × *nigra* DN34). *Applied and environmental microbiology*. V. 70: P. 508–517.
33. Vancura V. (1964) Root exudates of plants. I. Analysis of root exudates of barley and wheat in their initial phases of growth. *Plant and soil* XXI. V. 2: P. 231–248.
34. Vincent J.M. (1970) A manual for the practical study of root nodule bacteria IBP Handbook. Oxford: Blackwell Scientific. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.1972.tb04828.x/pdf>.
35. Wang Q.H., Fang X.D., Bai B.J. et al. (2007) Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnology and bioengineering*. V. 98: P. 842–853.
36. Weeks J. T., Jingsong Y., Rommens C.M. (2008) Development of an *in planta* method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic research*. V. 17: P. 587–597.
37. Wittgens A., Tiso T., Arndt T. T. et al. (2011) Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial cell factories*. V. 10: P. 1–18.
38. Zhang H., Huang Q., Su J. (2010) Development of alfalfa (*Medicago sativa* L.) regeneration system and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Agricultural sciences in China*. V. 9 (2): P. 170–178.
39. Ziauddin A., Lee R.W.H., Lo R.Y.C., Shewen P.E., Strommer J.N. (2004) Transformation of alfalfa with a bacterial fusion gene, *Mannheimia haemolytica* A1 *leukotoxin50-gfp*: response with *Agrobacterium tumefaciens* strains LBA4404 and C58. *Plant cell, tissue and organ culture*. V. 79: P. 271–278.

✪ Информация об авторах

**Степанова Анна Юрьевна** — с. н. с., к. б. н., группа специализированного метаболизма корней. ИФР РАН. 127276, Москва, ул. Ботаническая, д. 35. E-mail: step\_ann@mail.ru.

**Орлова Екатерина Владимировна** — н. с., группа специализированного метаболизма корней. ИФР РАН. 127276, Москва, ул. Ботаническая, д. 35. E-mail: ekatia@inbox.ru.

**Терешонок Дмитрий Викторович** — н. с., к. б. н., лаборатория генетики культивируемых клеток. ИФР РАН. 127276, Москва, ул. Ботаническая, д. 35. E-mail: diman\_ter\_vi@mail.ru.

**Долгих Юлия Ивановна** — д. б. н., зав. лаб, профессор, лаборатория генетики культивируемых клеток. ИФР РАН. 127276, Москва, ул. Ботаническая, д. 35. E-mail: ivan-d1@yandex.ru.

**Stepanova Anna Yurievna** — senior researcher, PhD, group of specialized metabolism of roots. Timiryazev institute of plant physiology, RAS. 127276, Moscow, Botanical St., 35, Russia. E-mail: step\_ann@mail.ru.

**Orlova Ekaterina Vladimirovna** — researcher, group of specialized metabolism of roots. Timiryazev institute of plant physiology, RAS. 127276, Moscow, Botanical St., 35, Russia. E-mail: ekatia@inbox.ru.

**Tereshonok Dmitriy Viktorovich** — researcher, PhD, laboratory of genetics of cell cultures. Timiryazev institute of plant physiology, RAS. 127276, Moscow, Botanical St., 35, Russia. E-mail: diman\_ter\_vi@mail.ru.

**Dolgikh Yulia Ivanovna** — head of the lab, prof., MD, group of specialized metabolism of roots. Timiryazev institute of plant physiology, RAS. 127276, Moscow, Botanical St., 35, Russia. E-mail: ivan-d1@yandex.ru.