

Гормональный статус и его регуляция на начальных этапах роста растений *Solanum tuberosum*, экспрессирующих Bt-ген

Пузина Т.*, Король В., Макеева И.

Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева, Орёл, Россия

* tipuzina@gmail.com

Ключевые слова: трансгенные растения с Bt-геном; фитогормоны; микроэлементы цинк и бор; *Solanum tuberosum*

Мотивация и цель: В фундаментальных исследованиях все чаще используют генно-инженерные технологии, которые способствуют выявлению молекулярно-генетических механизмов физиолого-биохимических процессов в растительном организме. Известно, что фитогормонам принадлежит ведущая роль в регуляции роста и развития растений. Вместе с тем изучению гормонального статуса трансгенных растений в отечественных и зарубежных исследованиях уделяется недостаточно внимания. Имеются данные о влиянии экзогенных гормонов на ростовые реакции трансгенных растений [1, 2]. Лишь в отдельных работах показано изменение содержания одной или двух групп фитогормонов у трансформантов [3, 4]. Однако проявление физиологического ответа зависит от той гормональной ситуации, а именно содержания и соотношения фитогормонов, которая складывается на определенном этапе онтогенеза. При этом с практической точки зрения важно наметить пути регуляции гормонального статуса трансгенных растений. В настоящее время широкое распространение получили растения, трансформированные Bt-геном из *Bacillus thuringiensis*, экспрессирующие белки-эндотоксины, губительно действующие на жесткокрылых, и в частности на колорадского жука [5]. При этом основное внимание авторы уделяют экологическим аспектам возделывания данных культур. Не найдено работ, в которых исследуется реакция гормональной системы растения на трансформацию Bt-геном, что не позволяет наметить пути ее регуляции. Целью работы было изучение содержания абсцизовой кислоты, зеатина, индолилуксусной кислоты у исходных и трансформированных Bt-геном растений картофеля на начальном этапе роста почек апикальных глазков клубней. Одновременно исследовали влияние незаменимых микроэлементов цинка и бора на содержание фитогормонов.

Методы и алгоритмы: Объектом исследования служили растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Супериор и полученные на их основе компанией Monsanto трансгенные растения с Bt-геном из почвенной бактерии *Bacillus thuringiensis*, продуцирующей дельта-эндотоксины. Клубни трансгенов были предоставлены лабораторией генетики ВНИЦ КХ им. А.Г. Лорха. Опыты проводили с клубнями через 72 часа после перенесения их из овощехранилища (+4 °C) в условия лаборатории (20 ± 2 °C). Клубни проращивали в кюветах с увлажненными опилками. Варианты опыта включали замачивание клубней исходных и трансгенных растений на 6 часов в растворах ZnSO₄ (3·10⁻³ М), Н₃ВО₃ (8·10⁻³ М), контрольных – в воде. Анализировали апикальные глазки клубней (почка-глазок с коровой паренхимой) через 72 часа от начала прорастания. Содержание

фитогормонов ауксинов, цитокининов и абсцизовой кислоты определяли методом твердофазного иммуоферментного анализа [6] с использованием реактивов фирмы «Уралинвест» (Уфа). В качестве стандартных растворов фитогормонов были взяты ИУК, зеатин, АБК (Serva, Германия). На рис. 1 и в табл. 1 представлены средние арифметические из пяти биологических и трех аналитических повторностей. Достоверность оценивали с помощью критерия Стьюдента, считая достоверными различия при уровне доверительной вероятности выше 0.95.

Результаты: Через трое суток проращивания клубней глазки трансгенов содержали в 1.9 раза больше абсцизовой кислоты (рис. 1, а). Обогащение клубней цинком уменьшило содержание данного гормона у глазков исходных и трансгенных растений в равной степени – в 1.7 раза. Однако микроэлемент бор не изменил количество АБК у трансгенов, но снизил у исходных растений в 1.6 раза. В отличие от АБК, трансгены содержали несколько меньше цитокининов (на 17 %) по сравнению с глазками клубней исходных растений (см. рис. 1, б). Обогащение цинком значительно повысило уровень зеатина – в 2.3 раза у исходных и в 3 раза у трансгенов. Обработка микроэлементом бором была менее эффективна по сравнению с цинком. Ауксины были более чувствительны, чем цитокинины, к трансформации растений *Bt*-геном: их содержание было ниже исходных в 2.5 раза (см. рис. 1, в). Микроэлементы повысили уровень ИУК, причем в большей степени у трансгенов (цинк – в 2.2, бор – в 2.5 раза), тогда как у нетрансформантов цинк – на 25 %, бор – на 76 %.

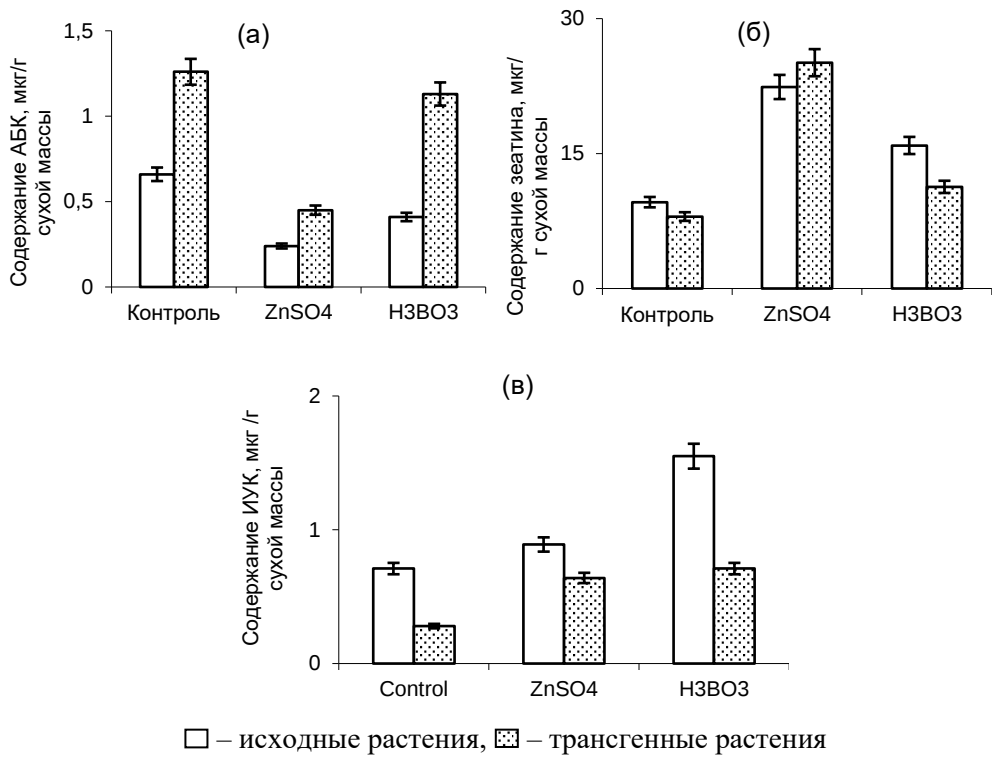


Рис. 1. Влияние микроэлементов на содержание фитогормонов в глазках клубней исходных и трансгенных растений: а – АБК; б – зеатин, в – ИУК

Анализ соотношения содержания фитогормонов стимуляторов (акусины+ цитокинины) к АБК свидетельствует о значительно меньшем соотношении у трансформантов за счет преобладания абсцизовой кислоты (см. табл. 1). Обогащение микроэлементами увеличило данное соотношение вне зависимости от трансформации. Более эффективным был микроэлемент цинк.

Таблица 1. Влияние микроэлементов на соотношение фитогормонов в глазках клубней исходных и трансгенных растений

Вариант	Зеатин + ИУК/АБК	
	Исходные растения	Трансгенные растения
Контроль	17.2	6.6
ZnSO ₄	9.70	57.2
H ₃ BO ₃	41.8	9.7

Выводы: Таким образом, проведенное исследование свидетельствует, что гормональная система *Solanum tuberosum* чувствительна к трансформации *Bt*-геном. Глазки клубней трансформантов в первые трое суток прорастания характеризуются повышенным содержанием АБК, но меньшим – зеатина и ИУК. Обработка клубней сернокислым цинком и борной кислотой снижает количество АБК, но повышает цитокинины и ауксины вне зависимости от трансформации. Наибольший положительный эффект на соотношение гормонов-стимуляторов к АБК оказал микроэлемент цинк как за счет значительного уменьшения АБК, так и за счет повышения уровня зеатина.

Hormonal status and its regulation at the initial stages of growth of *Solanum tuberosum* plants expressing the *Bt* gene

Puzina T.*, Korol V., Makeeva I.

Orel State University named after I.S. Turgenyev, Orel, Russia

* tipuzina@gmail.com

Key words: transgenic plants with the *Bt* gene; phytohormones; microelements zinc and boron; *Solanum tuberosum*

Motivation and Aim: In fundamental research, genetic engineering technologies are increasingly being used, which help to identify the molecular genetic mechanisms of physiological and biochemical processes in the plant organism. It is known that phytohormones play a leading role in the regulation of plant growth and development. At the same time, insufficient attention is paid to the study of the hormonal status of transgenic plants in domestic and foreign studies. There is data on the influence of exogenous hormones on the growth responses of transgenic plants [1, 2]. Only a few studies have shown changes in the content of one or two groups of phytohormones in transformants [3, 4]. However, the manifestation of a physiological response depends on the hormonal situation, namely, the content and ratio of phytohormones, which develops at a certain stage of ontogenesis. At the same time, from a practical point of view, it is important to outline ways to regulate the hormonal status of transgenic plants. Currently, plants transformed with the *Bt* gene from *Bacillus thuringiensis*, expressing endotoxin proteins that have a detrimental effect on beetles and, in particular, the Colorado potato

beetle, are widely used [5]. At the same time, the authors pay main attention to the environmental aspects of the cultivation of these crops. No works have been found that study the reaction of the plant hormonal system to transformation by the *Bt* genome, which does not allow us to outline ways of its regulation. The purpose of the work was to study the content of abscisic acid, zeatin, and indolylacetic acid in the original and transformed potato plants with the *Bt* gene at the initial stage of growth of the buds of the apical eyes of tubers. At the same time, the influence of the essential microelements zinc and boron on the content of phytohormones was studied.

Methods and Algorithms: The object of the study was potato plants (*Solanum tuberosum* L.) of the Superior variety and transgenic plants obtained on their basis by Monsanto with the *Bt* gene from the soil bacterium *Bacillus thuringiensis*, which produces delta-endotoxins. Transgene tubers were provided by the Laboratory of Genetics of the All-Russian Scientific Center for Chemistry named after A.G. Lorch. Experiments were carried out with tubers 72 hours after they were transferred from the vegetable storehouse (+4 °C) to laboratory conditions (20 ± 2 °C). Tubers were germinated in ditches with moistened sawdust. Variants of the experiment included soaking the tubers of the original and transgenic plants for 6 hours in solutions of ZnSO₄ (3 · 10⁻³ M), H₃BO₃ (8 · 10⁻³ M), control ones – in water. The apical eyes of tubers (bud-eye with cortical parenchyma) were analyzed 72 hours from the beginning of germination. The content of phytohormones auxins, cytokinins and abscisic acid was determined by enzyme-linked immunosorbent assay [6] using reagents from Uralinvest (Ufa). IAA, zeatin, and ABA (Serva, Germany) were taken as standard solutions of phytohormones. The figure and table show the arithmetic means of five biological and three analytical replicates. Reliability was assessed using the Student's test, considering differences at a confidence level above 0.95 to be significant.

Results: After three days of tuber germination, the transgene eyes contained 1.9 times more abscisic acid (Fig. 1a). Enrichment of tubers with zinc reduced the content of this hormone in the eyes of the original and transgenic plants to the same extent – 1.7 times. However, the microelement boron did not change the amount of ABA in transgenes, but decreased it by 1.6 times in the original plants. In contrast to ABA, the transgenes contained slightly less cytokinins (by 17 %) compared to the tuber eyes of the original plants (Fig. 1b). Zinc enrichment significantly increased the level of zeatin – 2.3 times in the original and 3 times in the transgenes. Treatment with the trace element boron was less effective compared to zinc. Auxins were more sensitive than cytokinins to the transformation of plants with the *Bt* gene, namely, their content was 2.5 times lower than the initial ones (Fig. 1c). Microelements increased the level of IAA, and to a greater extent in transgenes (zinc – by 2.2, boron – by 2.5 times), while in non-transformants zinc – by 25 %, boron – by 76 %.

Analysis of the ratio of the content of stimulant phytohormones (auxins + cytokinins) to ABA indicates a significantly lower ratio in transformants due to the predominance of abscisic acid (Table 1). Micronutrient enrichment increased this ratio regardless of transformation. The microelement zinc was more effective.

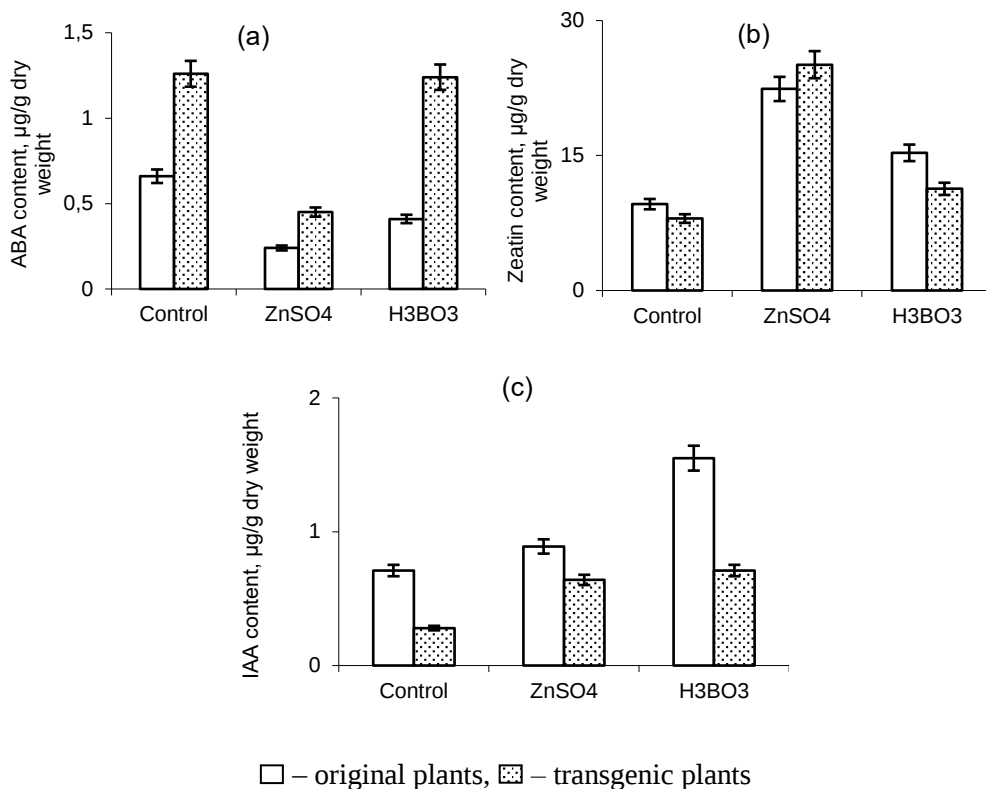


Fig. 1. The influence of microelements on the content of phytohormones in the eyes of tubers of original and transgenic plants: a – ABA; b – zeatin, c – IAA

Table 1. The influence of microelements on the ratio of phytohormones in the eyes of tubers of original and transgenic plants

Option	Zeatin + IAA/ABA	
	Original plants	Transgenic plants
Control	17.2	6.6
ZnSO ₄	9.70	57.2
H ₃ BO ₃	41.8	9.7

Conclusion: Thus, the study indicates that the hormonal system of *Solanum tuberosum* is sensitive to transformation by the *Bt* gene. The eyes of transformant tubers in the first three days of germination are characterized by an increased content of ABA, but less zeatin and IAA. Treatment of tubers with zinc sulfate and boric acid reduces the amount of ABA, but increases cytokinins and auxins, regardless of transformation. The microelement zinc had the greatest positive effect on the ratio of stimulant hormones to ABA due to both a significant decrease in ABA and an increase in zeatin levels.

Список литературы/References

1. Додуева И.Е., Фролова Н.В., Власенко М.А., Монахова В.А., Лутова Л.А. Трансформация инбредных линий редиса (*Raphanus sativus* L.) генами т-ДНК агробактерий: изменение опухолевого фенотипа и реакции на фитогормоны у трансгенных растений. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2005;1(2):22-29 [Dodueva I.E., Frolova N.V., Vlasenko M.A., Monakhova V.A., Lutova L.A. Transformation of inbred lines of radish (*Raphanus sativus* L.) with t-DNA genes of agrobacteria: changes in tumor phenotype and reaction on phytohormones in transgenic plants. *Vestnik Biotekhnologii I Fiziko-Khimicheskoy Biologii im. Yu.A. Ovchinnikova*. 2005;1(2):22-29 (in Russian)]
2. Кулуев Б.Р., Сафиуллина М.Г., Князев А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис А.В. Роль гена NtEXP A6 в регуляции роста органов табака. *Биомика*. 2014;6(1):1-12 [Kuluev B.R., Safiullina M.G., Knyazev A.V., Nikonorov Yu.M., Chemeris A.B. The role of the NtEXP A6 gene in the regulation of tobacco organ growth. *Biomika*. 2014;6(1):1-12 (in Russian)]
3. Пак Чун Ир. Изучение влияния повышенных уровней фитогормонов в трансгенных растениях на экспрессию хлоропластных генов. Автореферат дис. ... кандидата биологических наук. Москва, 1991 [Pak Chun Ir. Study of the influence of increased levels of phytohormones in transgenic plants on the expression of chloroplast genes. Abstract of thesis ... candidate of biological sciences. Moscow, 1991 (in Russian)]
4. Аксенова Н.П., Константинова Т.Н., Ложникова В.Н., Голяновская С.А., Гукасян И.А., Гатс К., Романов Г.А. Фотопериодическая и гормональная зависимость клубнеобразования у картофеля, трансформированного геном PHYB *Arabidopsis*. *Физиология растений*. 2005;52(5):701-707 [Aksenova N.P., Konstantinova T.N., Lozhnikova V.N., Golyanovskaya S.A., Gukasyan I.A., Gats K., Romanov G.A. Photoperiodic and hormonal dependence of tuber formation in potatoes transformed with the *Arabidopsis* PHYB gene. *Fiziologiya Rasteniy*. 2005;52(5):701-707 (in Russian)]
5. Викторов А.Г. Эколого-физиологические особенности Bt-растений, приводящие к вспышкам численности вторичных вредителей. *Физиология растений*. 2017;64(4):243-250 [Viktorov A.G. Ecological and physiological characteristics of Bt plants leading to outbreaks of secondary pests. *Fiziologiya Rasteniy*. 2017;64(4):243-250 (in Russian)]
6. Веселов С.Ю. Использование антител для количественного определения, очистки и локализации регуляторов роста растений. Уфа: БГУ, 1998 [Veselov S.Yu. Use of antibodies for quantification, purification and localization of plant growth regulators. Ufa: BSU, 1998 (in Russian)]