

<http://yadyra.ru>

Факультет почвоведения, агрохимии и экологии
Кафедра экологии

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА на тему:
«ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ
РАСТЕНИЙ РАПСА, УСТОЙЧИВЫХ К
ЗАСОЛЕНИЮ И ПОВЫШЕННОМУ
СОДЕРЖАНИЮ ТЯЖЕЛЫХ
МЕТАЛЛОВ»

Выполнила:
студентка 507 группы
Факультета почвоведения,
агрохимии и экологии
Кислова У.Л.

Руководители:
Проф. Черников В.А.
Асп. Радионов Н.В.

Москва 2007

Оглавление

Оглавление	2
ВВЕДЕНИЕ	4
Рабочая гипотеза	5
Цель работы	6
Задачи	6
I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Медь и цинк в почве	8
1.2 Медь и цинк в растениях – поглощение, транспорт, биологическая роль	10
1.3 Механизмы адаптации растений к действию ТМ	25
1.4 Трансформация с использованием агробактерий	34
1.5 Экологическая роль трансгенных растений	38
II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	40
2.1 Объекты исследований:	40
2.1.1. Рапс	40
2.1.2. Ген Myb 4	42
2.1.3. Медь и цинк	42
2.2. Методы исследований	43
2.2.1. Метод идентификации трансгенных конструкций в растении	43
2.2.2. Определение содержания меди и цинка в листьях исследуемых растений	46

2.2.3. Определение содержания свободного пролина в листьях исследуемых растений	47
2.2.4. Определение оводненности листьев	48
III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	49
3.1. Трансформация рапса.....	49
3.2. Физиологические опыты	54
3.2.1. Определение содержания цинка и меди в листьях рапса	54
3.2.2. Определение оводненности листовой ткани рапса.....	59
3.2.3. Определение содержания свободного пролина	60
IV. ВЫВОДЫ.....	62
V. БИБЛИОГРАФИЯ.....	64
V. ПРИЛОЖЕНИЯ.....	74
5.1. Выделение тотальной ДНК из растительной ткани.....	74
5.2. Состав реакционной смеси для проведения ПЦР	76
5.3. Гель-электрофорез	76
5.4. Среды для трансформации и получения эксплантов	77

ВВЕДЕНИЕ

По масштабам загрязнения и воздействию на биологические объекты тяжелые металлы (ТМ) занимают особое место среди загрязняющих веществ. Большинство из них необходимо живым организмам, однако в результате интенсивного атмосферного рассеивания в биосфере и значительной концентрации в почве многие из металлов становятся токсичными для них. В то же время почвы подверженных загрязнению территорий часто служат базой для производства сельскохозяйственной продукции, что сказывается на её качестве и безопасности.

Используемые для обезвреживания ядовитых веществ, попадающих в окружающую среду с отходами химических предприятий, микроорганизмы не способны удалять из почвы и воды вредные для здоровья тяжелые металлы, а также радиоактивные изотопы. А вот зеленые растения способны извлекать из окружающей среды и концентрировать в своих тканях различные элементы. Растительную массу не составляет особого труда собрать и сжечь, а образовавшийся пепел или захоронить, или использовать как вторичное сырье.

Этот метод очистки окружающей среды был назван фиторемедиацией – от греческого "фитон" (растение) и латинского "ремедиум" (восстанавливать).

Фиторемедиация стала эффективным и экономически выгодным методом очистки окружающей среды только после того, как обнаружили растения-гипераккумуляторы тяжелых металлов, способные накапливать в своих листьях до 5% никеля, цинка или меди в пересчете на сухой вес - то есть в десятки раз больше, чем обычные растения. Биологическое значение этого феномена еще до конца не раскрыто: можно, например, предположить, что высокое содержание токсичных элементов защищает растения от вредителей и делает их более устойчивыми к болезням.

Фиторемедиация в последнее время привлекает все большее внимание научной общественности вследствие высокой экономической выгоды в сравнении с иными способами очистки загрязненных территорий и своей «экологичности» и эстетичности.

Однако даже для гипераккумуляторов существуют летальные концентрации тяжелых металлов, с которыми растение справиться не способно.

Фиторемедиация является одним из новейших направлений генной инженерии. Трансгенные растения могут использоваться для очистки почв, грунтовых вод от загрязнителей: тяжелых металлов, радионуклидов и др. Методом генной трансформации можно увеличить устойчивость растения к повышенному содержанию тяжелых металлов в почве, тем самым, расширив возможности его применения на сильнозагрязненных территориях. Это осуществляется путем конструирования *in vitro* функционально активных генетических структур, содержащих гены различных организмов, и введения таких конструкций в геном растения.

Рабочая гипотеза:

В исследованиях по выяснению функции гена *MyB 4* было показано, что продукт данного гена (регулятор транскрипции) является индуктором ответа на многочисленные абиотические стрессы, в первую очередь на загрязнение окружающей среды ионами тяжелых металлов, а также на холодовой стресс и засоление.

Считается, что экспрессия в растениях рапса гена *MyB 4* под сильным промотором может в значительной степени повлиять на устойчивость растений к абиотическим стрессам, в частности к повышенным концентрациям солей меди и цинка в почве, что позволит более успешно использовать это растение в целях фиторемедиации на загрязненных территориях.

Цель работы:

- получение растений рапса со встроенным геном MuV 4 и изучение их реакций на абиотический стресс – повышенные концентрации солей ТМ: цинка и меди;
- сравнение полученных результатов с аналогичными показателями у нетрансгенных растений рапса и выводы относительно эффективности применяемого гена с целью увеличения устойчивости к повышенным концентрациям солей меди и цинка;
- определение возможности использования полученного трансгенного рапса в сельском хозяйстве при фиторемедиации загрязненных земель.

Задачи:

1. Получить культуру клеток *Agrobacterium tumefaciens*, несущих ген MuV 4.
2. Протрансформировать экспланты рапса на агробактериальном газоне.
3. Получить каллус и жизнеспособные регенеранты с него.
4. Пересадить регенеранты на питательную среду и вырастить растения.
5. Проверить их методом ПЦР на наличие гена MuV 4.
6. Полученные растения выращивать при разных концентрациях солей меди и цинка.
7. Провести физиологические опыты с нетрансгенным рапсом, чтобы изучить особенности развития растений данного вида в условиях повышенных концентраций этих металлов:
 - a. установить в нескольких временных точках содержание ионов меди и цинка в листьях растений, выращенных на разных концентрациях солей.
 - b. определить в динамике содержание пролина и оводненность тканей растений при разных условиях выращивания.

8. После получения необходимого количества семян трансгенных растений провести аналогичные опыты с трансгенами, чтобы сравнить полученные результаты и сделать выводы.

Работа проводилась в лаборатории экспрессии генома и лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН совместно и под руководством асп. Радионова Н.В.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Медь и цинк являются микроэлементами, т.е. относятся к группе незаменимых элементов в питании растений. Микроэлементы требуются в очень малых количествах, однако в их отсутствии нормальная жизнедеятельность невозможна [17]. В то же время, при повышенных концентрациях в среде эти металлы высоко токсичны для растений и прочих живых организмов.

Медь и цинк в почве

Наличие в почве тяжелых металлов, в том числе меди и цинка, является не только результатом антропогенной активности, но и зачастую обусловлено особенностями генезиса почв, химическим составом тех пород, на которых формировался данный почвенный комплекс. Медь и цинк относятся к рассеянным химическим элементам, содержащимся в горных породах в небольших количествах, так по данным Виноградова (1962) [4] содержание меди в земной коре в целом (кларк) составляет 47 мг/кг, цинка – 83 мг/кг. Наиболее богаты солями меди и цинка осадочные горные породы – глины, суглинки, песчаники и пр., причем содержание данных ТМ зависит не только от генезиса породы, но также в значительной степени обусловлено гранулометрическим составом, – тонкодисперсные глинистые породы с высоким содержанием илстых частиц значительно богаче солями тяжелых металлов по сравнению с песчаниками.

В горных породах Cu и Zn обычно приурочены к определенной группе минералов. По Хендерсону [18], к минералам-концентраторам относятся калиевые полевые шпаты, биотит, пироксены, оливины и некоторые другие. Наибольшая насыщенность ТМ свойственна собственным и акцессорным минералам (например, для Cu – медная руда, малахит), однако ввиду невысокого содержания этих минералов их доля в балансе незначительна.

При выветривании горных пород главными носителями ТМ становятся вторичные минералы, среди которых особое значение имеют минералы богатые межплоскостными пространствами. Почвы, формируемые на таких минералах, характеризуются тяжелым гранулометрическим составом и, как следствие – высоким содержанием ТМ. По данным для Сибири содержание меди в лессовидном суглинке составляет 36,4 (и лишь 4,6 мг/кг в песчаных породах), цинка – до 71,7 [11]. Одной из основных причин таких различий в содержании ТМ в породах различного гранулометрического состава является несхожесть состава минералогического. Так в песках преобладает кварц, почти лишенный ТМ, тогда как в суглинках и глинах велика доля глинистых минералов, богатых тяжелыми металлами.

Основное биологическое значение имеют подвижные формы меди и цинка, содержание которых в почвах различных регионов значительно разнится. Причиной таких различий является, прежде всего, специфика гранулометрического и минералогического составов, уровень гумусированности, реакция среды.

Подвижные формы меди и цинка распределяются в профиле почв неравномерно. Повышенное их количество чаще всего свойственно гумусовому горизонту, некоторое накопление возможно также и в аллювиальном или карбонатном горизонтах.

Среди незагрязненных почв особое место занимают те, которые сформировались над близко залегающими к поверхности рудными телами, содержание ТМ в таких почвах может быть достаточно высоким, нередко настолько, что делает возможным произрастание на данных почвах лишь специфической металлофитной флоры.

Между почвами геохимических аномалий и техногенно загрязненными наблюдаются различия в статусе ТМ – в первом случае на фоне относительно небольшого накопления ТМ в гумусовом горизонте прослеживается значительное увеличение их содержания с глубиной почвенно-

геологического профиля, тогда как во втором они концентрируются в приповерхностном слое.

Среди прочих источников техногенного поступления меди и цинка в почвы основное место занимают предприятия черной и особенно цветной металлургии.

Валовое количество меди и цинка в почвах, загрязненных металлургическими предприятиями может достигать внушительных размеров. Например в слое почвы 0 – 5 см вблизи металлургического предприятия обнаружено содержание цинка до 400 мг/кг, меди до 8500 мг/кг, а в почвах прилежащих к цинкоплавильному предприятию содержание цинка приближалось к 10000 мг/кг [4, 11]. Примерно половина количества меди и цинка в пахотном горизонте представлена подвижной их фракцией, в подпахотной толще ее доля значительно меньше – 17 – 19%. Из этого можно сделать вывод, что цинк и медь, попадая в почву в металлической форме и в форме оксидов, достаточно быстро приобретают высокую мобильность.

Другим, чрезвычайно важным источником загрязнения почв медью и цинком является применение загрязненных минеральных удобрений (главным образом фосфорных) и пестицидов. Так, например, в почвах крымских садов, которые постоянно обрабатываются медь-содержащими препаратами для борьбы с болезнями, концентрация меди может достигать до 180 мг/кг, что превышает естественное фоновое содержание более чем в 7 раз.

Медь и цинк в растениях – поглощение, транспорт, биологическая роль

Медь – эссенциальный элемент, вовлеченный во множество физиолого-биохимических процессов в живых организмах, что во многом является следствием его способности, как металла с переходной валентностью, легко менять окислительно-восстановительный статус *in vivo*.

В растениях медь обнаруживается в двух формах – Cu^{2+} и Cu^+ . Входя в состав коферментов, обеспечивает возможность протекания важнейших физиологических процессов, связанных с передачей электронов и изменением статуса естественных окислительно-восстановительных систем, таких, например, как транспорт электронов при фотосинтезе и дыхании, ответ на окислительный стресс, трансдукция гормонального сигнала [80].

Среди ферментов, функционирование которых так или иначе связано с присутствием меди, можно назвать Cu/Zn-супероксид дисмутазу, цитохромоксидазу, аминоксидазу, аскорбатоксидазу и полифенолоксидазу. На клеточном уровне, медь также играет существенную роль в транскрипции, окислительном фосфорилировании и механизмах транспорта белков [98].

Большая часть меди (75% всего содержания в листе) концентрируется в хлоропластах. Здесь сосредоточен медьсодержащий белок синего цвета – пластоцианин, осуществляющий перенос электронов между ФС II и ФС I [17].

Действие повышенных концентраций меди на растения. Токсические уровни меди могут являться как результатом антропогенной активности, так и следствием естественных почвообразовательных процессов, сопряженных с выветриванием пород с изначально высоким содержанием данного ТМ.

Переходная валентность меди, играющая столь значительную роль во множестве биохимических процессов, в случае высоких концентраций элемента обуславливает и хорошо выраженные токсические его свойства. Изменение Red/Ox-статуса может приводить к образованию в клетке крайне токсичного гидроксил-радикала и других активных форм кислорода, вызывающих нарушение структуры ДНК, липидов, белков [94, 85, 64]. В высоких концентрациях медь становится чрезвычайно токсична, вызывая такие симптомы, как хлороз и некроз тканей, обесцвечивание листьев и

ингибирование роста корня. На клеточном уровне в основе механизмов такого действия может лежать ингибирование ферментативной активности вследствие связывания ионов Cu с сульфгидрильными группами, замещение медью других важных элементов, окислительная активность [67, 98].

Отрицательное влияние меди на фотосинтетический аппарат выражается не только в снижении содержания хлорофилла, но и в нарушении структуры мембран хлоропластов, что резко снижает продуктивность фотосинтеза [27, 76].

Особенности проявления токсического действия меди во многом зависят от фазы развития растения и промежутка времени, в течение которого оказывалось воздействие. Так, высокие концентрации меди на начальных этапах развития вызывают резкое замедление развития листьев и повышение содержания пигментов в расчете на единицу площади листовой поверхности [67]. Ингибирование роста обнаруживается уже через день после обработки. При длительном действии меди концентрация хлорофилла снижается [27, 73], изменяется соотношение хлорофилла a/b [19,67], что обусловлено нарушением внутренней структуры хлоропластов. Один из общих для многих растений симптомов, проявляющихся в результате длительной обработки высокими концентрациями меди – снижение биомассы корня [67].

Внешние симптомы токсического действия Cu есть результат глубоких нарушений клеточного метаболизма и даже непосредственного действия этого ТМ на генетический аппарат клетки. В микромолярных концентрациях, в присутствии H_2O_2 , медь способна вызывать нарушение структуры ДНК [67]:

В растении медь присутствует главным образом в виде комплексов с органическими молекулами и проявление ее токсичности во многом определяется природой последних [67].

Было показано, что комплексы меди с пептидами, содержащими металлсвязывающие домены на N-конце молекулы действительно способны оказывать отрицательное действие на структуру ДНК, в то время, как комплексы меди с белками, металлсвязывающие домены которых локализованы в иных частях молекулы, такими свойствами не обладают [94]. Существует также мнение, что Cu не оказывает прямого влияния на ДНК, а повреждающее ее действие носит опосредованный характер: реакция перехода меди из двух валентного в одновалентное состояние сопровождается, как отмечалось выше, образованием в клетке активных форм кислорода, которые, в свою очередь, оказывают дестабилизирующее влияние на хроматин [67].

Что касается фотосинтетического аппарата, то наиболее уязвимой для токсичных концентраций меди его частью является фотосистема II (рис. 1) [25, 26, 35]. Предполагается, что поток электронов от Tyr_z к $P680+$ блокируется высокими концентрациями меди. Также показана конкуренция ионов Cu^{2+} с Ca^{2+} окислительной части ФСII [66] и Fe^{2+} . Обнаружено замещение высокоактивной формы $Cyt\ b_{559}$ малоактивной, по-видимому, вследствие связывания Cu^{2+} с остатками гистидина, ведущего к изменению окислительно-восстановительной активности цитохрома [98].

Известно, что фотосинтетическая активность падает при длительной экспозиции растения светом высокой интенсивности. Этот процесс, включающий в себя снижение эффективности электрон-транспортной цепи и структурные повреждения реакционного центра ФС II, известен как фотоингибирование [22]. Показано, что медь способствует интенсификации этого процесса, по-видимому, это связано с усилением продукции медью активных форм кислорода (главным образом – гидроксил- радикала) в данных условиях [98]. Так же предполагается, что сниженное содержание хлорофилла (во многом, вследствие индуцированной медью из-за конкурентного ингибирования Fe-недостаточности), вызванное токсичными

концентрациями меди, делает фотосинтетически активные органы растения более восприимчивыми к фотоингибированию [74].

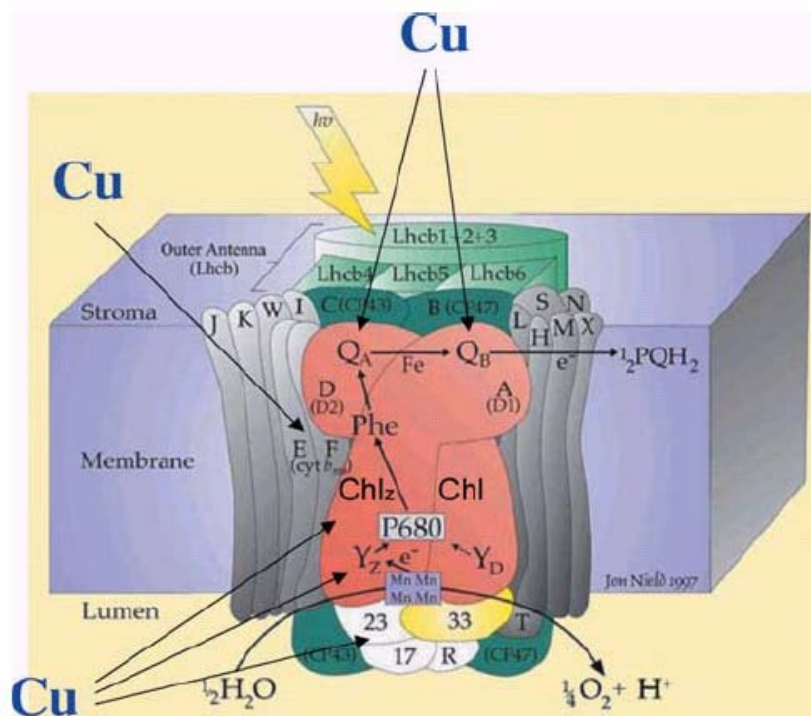


Рис. 1. Схема токсического действия высоких концентраций меди на компоненты ФС II [98]

Давно известна способность ТМ к вытеснению катионов металлов из порфириновых комплексов *in vitro*. Эксперименты, проведенные на интактных растениях, показали, что медь способна вытеснять катионы Mg^{2+} из порфиринового комплекса молекулы хлорофилла *in vivo* [67]. Кроме того, связываясь с остатками гистидина, медь нарушает связь молекулы хлорофилла с белками светоулавливающего комплекса ФСII. Это ведет к значительному снижению продуктивности последнего. Связывание, по-видимому, происходит не только с гистидином хлорофилл-связывающих белков, но и с гистидином гетеродимера D1/D2 [67].

Токсичные концентрации меди могут оказывать не только прямое действие на активность целого ряда ферментов, нарушая нативную конформацию молекулы, но и действовать опосредованно – интенсифицируемый медью синтез в клетке этилена снижает эффективность работы фотосинтетического аппарата, активация липоксигеназы ведет к усилению процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ), что нарушает нормальную структуру липидных компонентов мембран. Такое нарушение приводит к выходу ионов кальция в цитоплазму из Са-содержащих органелл (таких как хлоропласты, митохондрии, ЭПР, вакуоль) и из апопласта. В регуляцию концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме вовлечен ряд механизмов, среди которых большую роль играют Ca^{2+} АТФазы, ингибирование активности которых высокими концентрациями меди делает невозможным отток кальция из цитоплазмы. Высокие концентрации кальция, вызывая усиление активности фосфолипаз, действуют как триггеры катаболических процессов в цитоплазме [67].

Процесс ПОЛ приводит к накоплению в клетке целого ряда активных метаболитов, часть которых действует как раневые сигналинг-факторы (трауматин, фазеоловая кислота), часть (жасмоновая кислота, АФК, этилен) непосредственно принимает участие в усилении катаболизма [69]. Процесс принимает характер «каскада».

Хорошо известна способность металлов с переходной валентностью, таких, как медь, индуцировать синтез гидроксил радикалов (OH^\cdot) вследствие взаимодействия супероксида (O_2^\cdot) с H_2O_2 . Мишенью действия данных АФК являются самые различные компоненты клетки – мембраны, фотосинтетический аппарат и пр. Аскорбат-глутатионовый цикл вовлечен в ответ на индуцированный медью окислительный стресс [46].

Таким образом, высокие концентрации меди действуют на самые различные клеточные процессы. Интенсивность действия Си на тот или иной процесс, среди прочего, во многом определяется фазой развития растения,

его физиологическим состоянием и длительностью стрессорного воздействия.

Механизмы поглощения меди и ее транспорт по растению к настоящему времени довольно слабо изучены. Известные на данный момент транспортные системы меди приводятся на рис. 2.

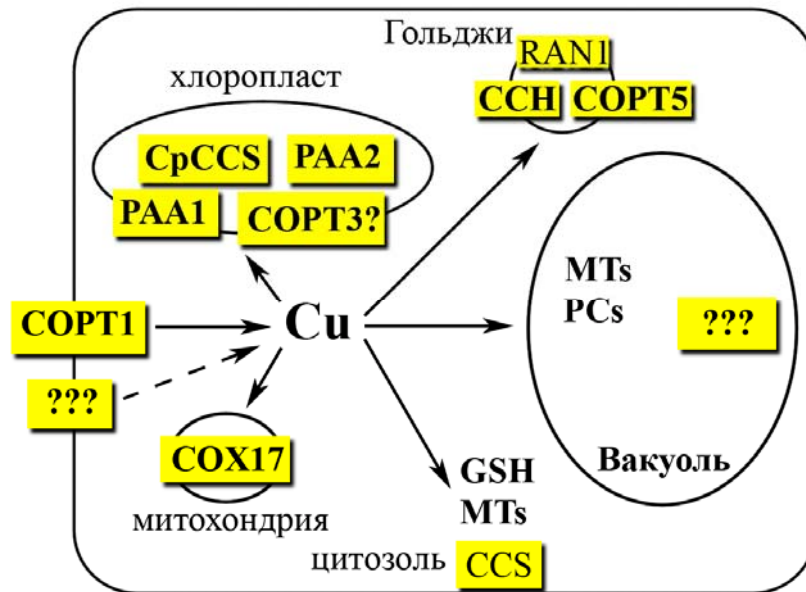


Рис. 2. Схема идентифицированных клеточных транспортных путей меди [98]. Мембранные транспортеры (COPT1, COPT3, COPT5, COX17, PAA1, PAA2, RAN1), Си-шапероны (CCH, CCS, CpCCS), детоксифицирующие факторы - металлотioneины (MTs), фитохелатины (PCs), глутатион (GSH).

АТФазы II-типа – транспортеры тяжелых металлов были обнаружены во многих живых организмах, в том числе и растениях, они вовлечены в мембранный транспорт целого ряда микроэлементов и потенциально токсичных для клетки металлов. Это подгруппа большого семейства II-типа АТФаз, использующих энергию АТФ для переноса различных заряженных субстратов через клеточную мембрану. АТФазы тяжелых металлов относятся к типу 1В АТФаз.

Сравнение интрамембранных последовательностей привело к разделению 1В АТФаз на два класса – 1) транспортеры одновалентных

катионов, таких как Cu, Ag, 2) транспортеры двухвалентных катионов – Cd, Pb, Zn, Co [48]. Биохимические исследования с использованием мембранных везикул позволили установить, что основным субстратом, переносимым этим типом АТФаз является преимущественно одновалентная медь Cu (I) и лишь в незначительной степени Cu (II) [98]. Было найдено восемь белков, относящихся к типу 1В АТФаз – НМА1-НМА8.

СОРТ транспортеры – другое широко распространенное семейство Cu-транспортеров. Пять (СОРТ1-5) представителей данного семейства транспортеров были найдены у *Arabidopsis thaliana*. Все они состоят из трех трансмембранных доменов и N-концевого металлсвязывающего домена, богатого остатками метионина и гистидина, по количеству которых различают три группы СОРТ транспортеров. В первую группу входят СОРТ1 и СОРТ2, с высокой афинностью к катионам одновалентной меди [83]. Ген, кодирующий СОРТ1, экспрессируется в кончиках корней, пыльцевых зернах, трихомах и устьицах, что играет важную физиологическую роль в аккумуляции меди в данных органах в условиях недостатка этого микроэлемента в среде, поскольку было показано, что, например в таких процессах, как развитие пыльцы и элонгация корня медь играет значительную роль [83].

Вторая группа включает СОРТ3 и СОРТ5 транспортеры и принимает участие в транспорте ионов меди в хлоропластах, обладает несколько меньшей афинностью к Cu, поскольку менее богата остатками метионина и гистидина. Наконец, СОРТ4 транспортер представляет третью группу. Гены кодирующие СОРТ4 активно экспрессируются в корнях, СОРТ4 беден остатками цистеина и предположительно играет лишь косвенную роль в процессе трансмембранного переноса меди [98].

Си-шапероны принадлежат к новому семейству низкомолекулярных металл-рецепторных протеинов, локализованных в цитозоле, т.н. металлошаперонов, участвующих в транспорте ионов металлов внутри

клетки. Си-шапероны выполняют крайне важную функцию транспорта меди по цитоплазме к местам утилизации Си-зависимыми протеинами. Они предотвращают случайное связывание меди в цитозоле с другими белками. В настоящее время известно три различных представителя Си-шаперонов растений – ССН, СОХ17 и ССS. Ген ССН арабидопсиса имеет высокую степень гомологии с АТХ1 геном дрожжей и является наиболее изученным из всех трех Си-шаперонов растений. Высокий уровень экспрессии гена ССН обнаружен в стеблях арабидопсиса. Основываясь на гомологии с ССН и его аналога из дрожжей, было выдвинуто предположение о том, что данный шаперон взаимодействует непосредственно с АТФазами II-типа [98]. Ген СОХ17 был выделен из арабидопсиса (AtСОХ17). Он кодирует последовательность, идентичную СОХ17 Си-шаперону дрожжей, принимающему участие в транспорте меди к митохондриям, где она необходима для функционирования цитохром-оксидазного комплекса. Значительное усиление экспрессии гена AtСОХ17 в ответ на повышение концентрации меди в среде может свидетельствовать о том, что данный шаперон, так же как и металлотионеины, принимает участие в детоксикации меди в растениях [98].

Как поставщик кофактора к медь-зависимым белкам митохондрий (Cu/Zn СОД, цитохром-оксидаза), СОХ17 вовлечен в усиление активности специфических ферментов стресса [24]. Ген ССS, гомолог LY7 гена дрожжей, был выделен из томата, арабидопсиса и картофеля (*Solanum tuberosum*). Показано, что регуляция экспрессии гена StССS находится под контролем ауксина. Не обнаружено усиления экспрессии гена StССS в растениях картофеля в ответ на обработку медьсодержащими препаратами. Так же не обнаружено усиления экспрессии гена данного шаперона и при выращивании растений картофеля в условиях *in vitro* на среде с высоким содержанием меди. Это позволяет сделать вывод о том, что в присутствии повышенных концентраций меди в цитоплазме отпадает необходимость в

CCS шапероне, основной функцией которого является обеспечение кофактором Cu/Zn СОД [92].

Несмотря на существенную роль, которую играют ССН и ССС шапероны в поддержании гомеостаза меди, не обнаруживается усиление экспрессии их генов в ответ на повышение концентрации Cu, что позволяет предположить, что данные белки становятся необходимыми главным образом в условиях недостатка меди, обеспечивая при этом нормальное функционирование Cu-зависимых ферментов. В противоположность этому, активация гена *AtCOX17* в ответ на обработку медью позволяет рассматривать этот шаперон, наряду с металлтионеинами, как один из факторов детоксификации высоких концентраций данного ТМ.

Другие возможные транспортеры меди. Новое семейство протеинов, вовлеченных в транспорт двухвалентных катионов – т.н. N-ramp (Natural resistance associated macrophage proteins) транспортеры, по-видимому могут принимать участие в транспорте меди. Семейство генов N-ramp транспортеров отличается высокой консервативностью, их гомологи были найдены у различных живых организмов. Что касается растений, то достаточно хорошо исследованы N-ramp транспортеры риса (*Oryza sativa*).

На основании сравнения последовательностей генов выделено две их группы: 1) *OsNramp1*, *OsNramp3* и *AtNramp5* и 2) *OsNramp2*, *AtNramp1*, *AtNramp2*, *AtNramp3*, *AtNramp4*, что позволяет предположить различную субстратоспецифичность данных транспортеров.

Также как и N-ramp транспортеры других организмов, N-ramp транспортеры растений имеют 12 трансмембранных доменов и длинную С-концевую последовательность. Достоверно участие данных переносчиков в транспорте двухвалентных катионов у растений не было показано, однако, хорошо изучено их участие в аналогичных процессах дрожжей [49, 98].

Таким образом, к настоящему времени известно несколько различных групп переносчиков меди в высших растениях, тем не менее, механизмы

регуляции экспрессии их генов все еще до конца не ясны. Вероятнее всего регуляция осуществляется на транскрипционном или посттрансляционном уровнях. Контроль работы генов многих металл-транспортеров других организмов осуществляется именно на стадии транскрипции, что обеспечивается взаимодействием транскрипционных факторов с ионами металлов. Jonak et al. (2004) [98], было показано, что повышенные концентрации меди приводят к активации митоген-активируемых протеинкиназ (MAPKs), по-видимому, MAPKs, принимают участие в трансдукции сигнала, индуцированного повышением концентрации ТМ.

Цинк, также как и медь является эссенциальным элементом, среднее его содержание в растениях лежит в пределах 20-60 мг/кг сухой массы [80]. Известно более 300 ферментов, для функционирования которых необходим цинк, среди них – щелочная фосфатаза, алкоголь-дегидрогеназа, Cu/Zn супероксид дисмутаза и др. [80]. Также цинк играет важную роль в стабилизации структуры многих белков, в том числе некоторых последовательностей регуляторов транскрипции – цинковых пальцев, цинковых кластеров [44]. Он необходим для регуляции азотного обмена, деления клеток, синтеза ауксинов [87]. В отличие от меди, цинк в клетке не участвует в окислительно-восстановительных процессах.

Действие повышенных концентраций цинка на растения.

Известно не малое число видов – гипераккумуляторов цинка, способных успешно расти в присутствии значительных концентраций данного ТМ в почве, однако для большинства растений высокие концентрации Zn являются токсичными [80]. Негативному влиянию высоких его концентраций подвержены самые разные метаболические процессы, показана его токсичность для генетического аппарата [80], процессов фотосинтеза [32].

Среди наиболее типичных симптомов повреждающего действия высоких концентраций цинка на растения можно назвать ингибирование

развития корня, скручивание и отмирание кончиков молодых (преимущественно) листьев, хлороз [80]. Цинк оказывает ингибирующее действие как на элонгацию клеток корня, так и на их деление. Высокие концентрации цинка в цитоплазме приводят к появлению хлоротичных пятен, вследствие конкуренции с ионами железа. Так в присутствии токсичных концентраций Zn, признаки хлороза отмечаются даже при содержании железа в листе более 100 ppm, в то время как в обычных условиях критический нижний порог концентрации Fe^{2+} лежит ниже 40 ppm [21].

Связываясь с SH-группами плазмалемных белков, цинк приводит к нарушению барьерных свойств мембран, что, в свою очередь, приводит к резкому увеличению концентрации Zn в цитоплазме и взаимодействию его с сульфгидрильными группами прочих белков. Таким образом, токсическому действию цинка подвергается целый ряд биохимических процессов [80].

Показано отрицательное действие Zn на процесс клеточного деления, по-видимому, это связано с нарушением структуры хроматина [88]. Несмотря на то, что цинк, в отличие от меди, не участвует напрямую в окислительно-восстановительных процессах, тем не менее, активируя окислительные ферменты, он также способен приводить к повышению концентраций свободных радикалов в клетке [64]. Кроме отрицательного действия на мембраны, активные формы кислорода способны оказывать дестабилизирующее действие на ДНК [67]. Имеются данные о возрастании хромосомных aberrаций в присутствии высоких концентраций ТМ, в том числе и цинка [41].

Сообщается о негативном действии токсичных концентраций цинка на фотосинтез, однако механизм этого действия к настоящему времени почти не ясен, предполагается, что цинк оказывает дестабилизирующее влияние на мембраны хлоропластов [93]. Показано разрушающее действие цинка на

хлорофилл, возрастающее при снижении рН клеточного сока [40], изменение соотношения хлорофилл a/b [19].

Механизмы поглощения цинка и его транспорт. Известно, что цинк поглощается в виде двухвалентного катиона – Zn^{2+} . Показано, что одновременное присутствие в питательном растворе Cu^{2+} значительно снижает поглощение цинка растением [28]. К надземным органам цинк транспортируется по ксилеме и, попадая в клетку, депонируется в вакуоли в виде комплексов с метал-связывающими белками, что необходимо для предотвращения накопления в цитоплазме токсичных концентраций Zn^{2+} .

Мембранный транспорт цинка осуществляется специфическими переносчиками. В настоящее время показано участие в этом процессе П-типа АТФаз, ZAT, ZIP и некоторых других транспортеров [48].

АТФазы П-типа, подробно рассмотренные в разделе посвященном транспорту меди, также принимают участие и в трансмембранном переносе ионов цинка. В этом процессе участвует второе семейство АТФаз П-типа – $Zn^{2+}/Co^{2+}/Cd^{2+}/Pb^{2+}$ -переносчики, отвечающее за транспорт двухвалентных катионов [48, 98].

CDF транспортеры (от Cation Diffusion Facilitator), впервые обнаружены у бактерий. К настоящему времени, транспортеры этого семейства найдены у дрожжей, животных и растений, где они выполняют функцию переносчиков преимущественно ионов Zn, Cd и Co [75, 96]. Эти транспортеры состоят из шести трансмембранных и богатого остатками гистидина связывающего катионы металлов С-концевого доменов [75]. Представители этого семейства известны своей вариабельностью в размерах и могут состоять из 280 – 740 аминокислотных остатков [75, 96].

Впервые ZAT-ген CDF семейства транспортеров был найден у арабидопсиса. Показана 35-40% его гомология с ZnTs геном млекопитающих [96]. ZAT экспрессируется практически во всех частях растения конститутивно, однако известно усиление его экспрессии в присутствии

высоких концентраций цинка. Трансгенные растения с овер-экспрессией гена данного транспортера показывают высокую толерантность к токсическим концентрациям цинка, несмотря на накопление в клетке высоких концентраций данного ТМ. Предполагается, что ZAT участвует в везикулярной и вакуолярной компартментации Zn и таким образом вовлечен в детоксификацию последнего [48].

Еще один представитель CDF-семейства - ZTP1, был найден у известного гипераккумулятора цинка – *Thlaspi caerulescens* [23]. В отличие от ZAT арабидопсиса, ZTP1 экспрессируется главным образом в листьях и лишь незначительно в корнях, интенсивность экспрессии данного гена находится под влиянием концентраций Zn, Cd и Pb в среде – растения *Thlaspi caerulescens* произрастающие на почвах с высоким содержанием цинка отличаются и высокой интенсивностью экспрессии ZTP1 (и, как следствие, высокой устойчивостью) в сравнении с растениями, обитающими на неконтаминированных почвах [96].

Изучение генома арабидопсиса показало наличие восьми генов, в той или иной степени гомологичных CDF, предлагается переименовать ZAT белки данного семейства (экспрессируемые в растениях) в MTP (metal tolerance proteins), ввиду несомненного участия данных транспортеров в формировании механизмов устойчивости к ТМ [48].

ZIP транспортеры вовлечены в транспорт Fe, Zn, Mn и Cd. Около 85 представителей ZIP семейства были найдены у бактерий и всех типов эукариотических организмов, включая растения. 15 генов ZIP транспортеров было найдено у арабидопсиса. Сравнение аминокислотных последовательностей данного семейства транспортеров позволило выделить четыре подсемейства, все ZIP транспортеры растений относятся к одной группе [68].

ZIP переносчики представляют собой пептиды состоящие из 8 трансмембранных доменов с С- и N- концами лежащими за наружной частью

плазмалеммы. По количеству аминокислотных остатков ZIP транспортеры довольно сильно различаются, однако различия эти касаются главным образом области лежащей между третьим и четвертым трансмембранными доменами (рис. 3).

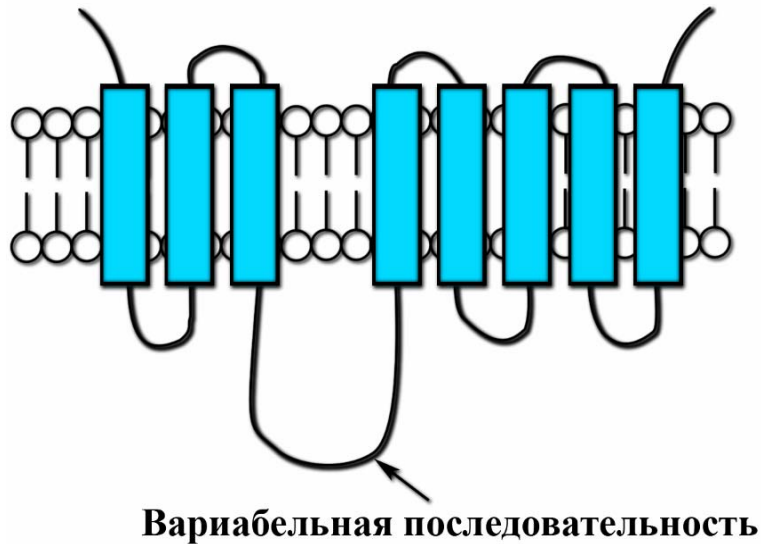


Рис. 3. Общая схема ZIP транспортера.

Именно эта область, богатая остатками гистидина, принимает участие в связывании катионов [48]. Наиболее консервативным участком молекулы типичного ZIP транспортера является четвертый трансмембранный домен, представляющий собой спираль и содержащий высококонсервативную последовательность гистидиновых остатков, которая составляет часть молекулы, ответственную за трансмембранный перенос ионов [45].

К настоящему времени функциональная роль ZIP транспортеров растений изучена недостаточно хорошо. Гены ZIP 1, 3 и 4 экспрессируются главным образом в корнях Zn-дефицитных растений [44]. Показано активное участие TcZNT1 из *Thlaspi caerulescens* в поглощении цинка, ген экспрессируется как в корнях, так и в надземных частях растений, интенсивность экспрессии находится в прямой зависимости от концентрации цинка в среде [48].

Механизмы адаптации растений к действию ТМ

Растениям присущ целый ряд защитных механизмов, вовлеченных в детоксикацию высоких концентраций ТМ. Основная задача всех этих механизмов – изоляция тем или иным способом токсичных концентраций металлов от метаболически активных компартментов клетки. Это может осуществляться либо компартментацией в менее активные части, либо, в отдельных случаях, полным препятствием поступлению катионов токсичных металлов в растение (связывание корневыми эксудатами, клеточной стенкой и пр.). Последний механизм получил название стратегии «избегания». В формировании устойчивости к ТМ может быть вовлечена и цитоплазматическая мембрана. Снижение ее проницаемости для ионов ТМ или наоборот, увеличение их оттока из цитоплазмы играет значительную роль.

На уровне протопласта белки теплового шока (БТШ) и специфические металл-связывающие пептиды, такие как металлотионеины и фитохелатины, вовлечены в формировании устойчивости растения к действию ТМ. В процессах хелатирования, помимо названных пептидов, могут принимать участие и низкомолекулярные органические соединения, такие, как карбоновые и аминокислоты. Совокупность всех этих процессов схематично отражена на рис. 4.

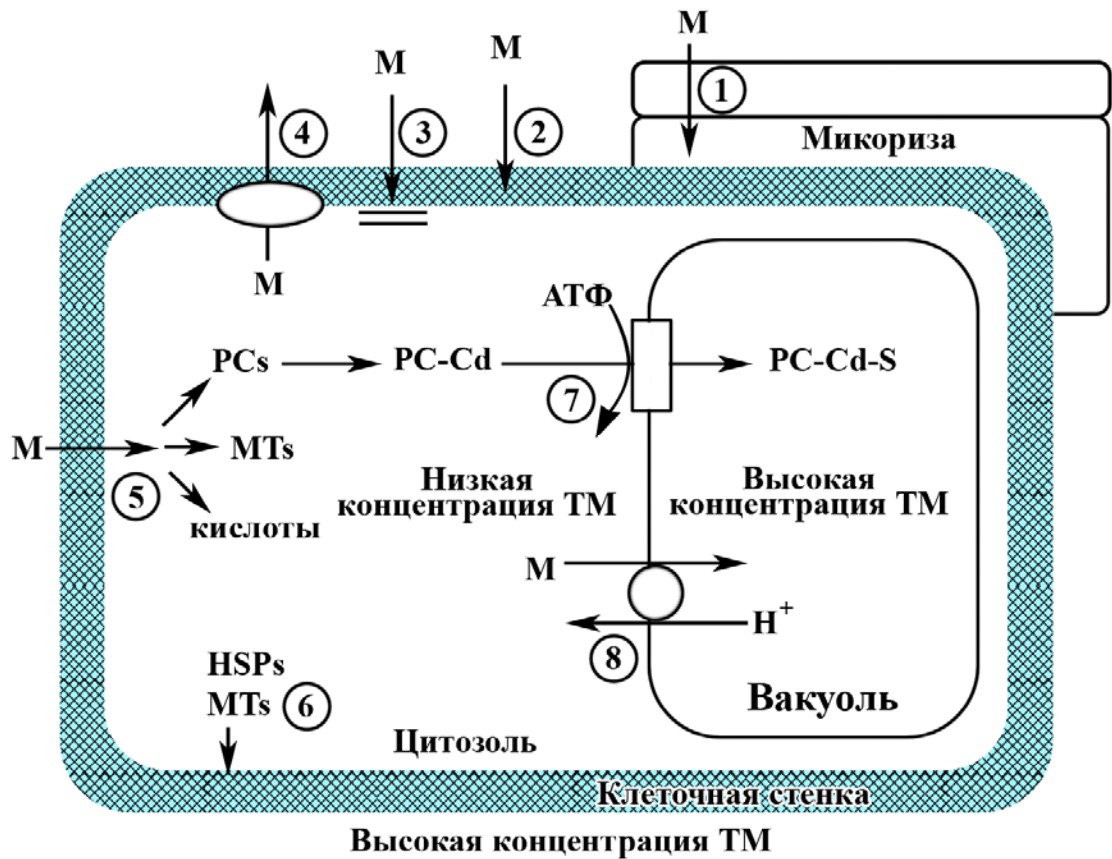


Рис. 4. Схема потенциально возможных механизмов вовлеченных в детоксикацию ТМ у высших растений [49].

1 - снижение поглощения ТМ микоризой, 2 - связывание ТМ клеточной стенкой и корневыми эксудатами, 3 - снижение плазмалемой поступления ТМ в цитозоль, 4 - выброс ТМ в апопласт, 5 - хелатирование, 6 - протекция плазмалемы в стрессорных условиях, 7 - транспорт ФХ-Cd комплексов в вакуоль, 8 - транспорт и компартиментация ТМ в вакуоль.

Барьерные механизмы

Микориза и эктомикориза в случае деревьев и кустарников, может быть достаточно эффективна в детоксикации ТМ [49]. Тем не менее, в настоящее время механизм такого действия до конца не ясен.

Клеточная стенка и эксудаты корней. Роль клеточной стенки в детоксикации ТМ у растений до настоящего времени остается спорной. Несмотря на то, что клеточная стенка клеток корня находится в непосредственном контакте с ионами ТМ, абсорбция их зависит от многих

физико-химических параметров и, в большинстве случаев, недостаточно эффективна [49]. Тем не менее, имеются данные, свидетельствующие о том, что металл-толерантная *Silene vulgaris ssp. humilis* аккумулирует в клеточной стенке корней в комплексах с белками либо в виде силикатов целый ряд ТМ [29].

Биологическая роль корневых эксудатов достаточно разнообразна, в том числе, образуя хелаты с катионами металлов, они увеличивают доступность последних для растения. Однако сообщается о роли гистидина и цитрата в связывании никеля и предотвращении таким образом его поступления в растение [81]. Поскольку в составе корневого эксудата достаточно много различных составляющих, предполагается, что он может принимать участие не только в связывании никеля, но также и других ТМ.

Хелатирование

Хелатирование ионов ТМ – один из главнейших механизмов их детоксикации, присущий широкому спектру организмов, в том числе и растениям. Несмотря на довольно хорошую изученность, до сих пор описаны далеко не все органические хелаторы металлов.

Большое количество карбоновых аминокислот может выступать в роли хелаторов ионов тяжелых металлов. Различия в содержании таких кислот как малат, малонат, оксалат, тартрат и цитрат в клеточном соке растений из контаминированных ТМ и незагрязненных почв указывает на возможную причастность данных кислот к связыванию и детоксикации ионов тяжелых металлов в клетке [78, 31]. Было показано, что некоторые гипераккумуляторы никеля характеризуются высоким содержанием цитрата, с которым преимущественно связываются катионы этого ТМ, количество кислоты находится в прямой зависимости от концентрации никеля в среде [58]. Имеются данные о участии малата в связывании цинка в цитоплазме и дальнейшем транспорте к вакуоли. У растений *Alyssum lesbiacum* –

гипераккумулятора никеля отмечено 36-кратное увеличение концентрации гистидина в кислом соке при экспозиции высокими концентрациями никеля [58]. Кроме того, повышенное снабжение гистидином растений не гипераккумуляторов позволяло значительно увеличить их устойчивость к Ni.

Фитохелатины

Фитохелатины (ФХ) – семейство небольших (6–8 kD) металлсвязывающих пептидов с общей структурой - $(\gamma\text{-Glu Cys})_n\text{-Gly}$ ($n=2\text{--}11$), синтез которых индуцируется ионами ТМ [77]. В настоящее время известно несколько различающихся между собой С-концевой аминокислотой групп ФХ-подобных пептидов, каждая из которых встречается в нескольких семействах высших растений (табл. 1):

Табл. 1. Различные ФХ-подобные пептиды [77]

ФХ-подобные пептиды	Структура	Нахождение
ФХ	$(\gamma\text{-Glu Cys})_n\text{-Gly}$	Различные семейства высших растений
Гомофитохелатин	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ala}$	Бобовые
Десглициновый ФХ	$(\gamma\text{-Glu Cys})_n$	Кукуруза, дрожжи
Гидроксиметил ФХ	$(\gamma\text{-Glu Cys})_n\text{-Ser}$	Злаковые
изо-ФХ	$(\gamma\text{-Glu Cys})_n\text{-Glu}$	Кукуруза

ФХ были обнаружены во многих фотосинтезирующих организмах, начиная водорослями и заканчивая покрытосеянными, имеются сведения о присутствии ФХ у некоторых грибов [77]. Это позволяет предположить, что пути синтеза ФХ развились очень давно и играли важную роль в выживании сосудистых растений в агрессивной среде.

Тот факт, что ФХ представляют собой γ -карбоксиламины, свидетельствует о том, что они не синтезируются вследствие прямой экспрессии генома, а являются продуктами биосинтетических путей (рис. 5).

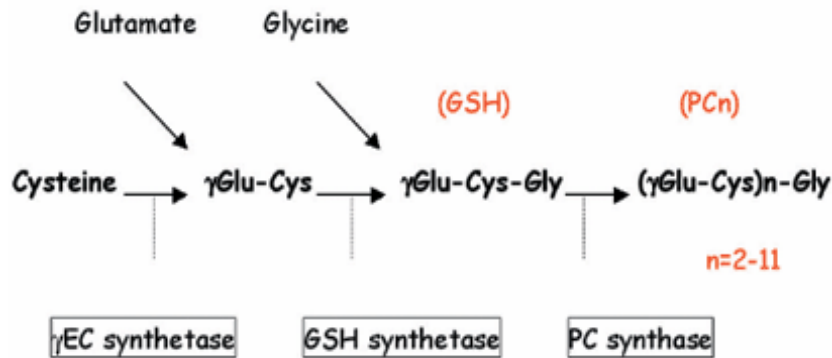


Рис. 5. Схема биосинтетических путей ФХ [55]

Первичным этапом синтеза ФХ является двух стадийный АТФ-зависимый синтез глутатиона γ -Glu-Cys-Gly. Первая стадия данного процесса представляет собой реакцию между Glu и Cys, катализируемую γ -глутамилцистеинсинтазой, продуктом данной реакции является γ -глутамилцистеин. Эта реакция является лимитирующей при синтезе глутатиона – прямого предшественника ФХ. Вторая стадия – синтез глутатиона из γ -глутамилцистеина катализируется ферментом глутатионсинтазой. Имеются данные, свидетельствующие о том, что регуляция генов, ответственных за синтез глутатиона, осуществляется жасмоновой кислотой, также существует предположение о том, что активное участие в этом принимает АБК или этилен [77].

Полученный глутатион уже может связывать ионы ТМ и транспортировать их в вакуоль, при этом на связывание одного двухвалентного катиона используются две молекулы глутатиона [16, 55], однако основную роль в детоксикации ТМ играют непосредственно ФХ. Синтез ФХ идет с участием ФХ-синтазы. Фермент представляет собой белковый комплекс из 4-х субъединиц, с молекулярной массой 25 kD каждая.

Активатором ФХ-синтазы являются ионы ТМ, которые, по-видимому, связываются с остатками цистеина и гистидина на N-конце белка. Существует предположение о том, что и С-концевые остатки цистеина играют роль в активации фермента.

До настоящего времени нет единого мнения в вопросе о том, действительно ли фитохелатины участвуют в детоксификации ТМ у растений. Тем не менее, доказана роль ФХ в формировании устойчивости растений к кадмию [54, 55]. На нескольких Cd-чувствительных мутантах арабидопсиса с различной способностью к синтезу ФХ было показано, что устойчивость к действию кадмия тесно коррелирует с содержанием ФХ в растениях [54]. Кроме Cd к активации синтеза ФХ приводит обработка As, однако до настоящего времени нет данных об индукции накопления ФХ ионами Zn, Ni и Se. Ионы меди лишь в незначительной степени активируют синтез ФХ [49].

Металлотионеины

Металлотионеины (МТ) – вторая широко распространенная группа металлсвязывающих пептидов высших растений. В отличие от ФХ металлотионеины – кодируемые пептиды. Впервые они были выделены из почки лошади в 1957 году, к настоящему времени опубликовано более 2500 статей посвященных МТ животных, проведено 4 международных конференции [2]. Однако МТ растений к настоящему времени все еще остаются недостаточно изученными.

Все МТ принято делить на два больших класса [2]:

Первый класс (МТ I) – металлсвязывающие пептиды позвоночных. В металлсвязывающем домене молекула МТ I содержит 20 остатков цистеина, расположение которых крайне консервативно.

Второй класс (МТ II) – пептиды, сходные по строению с МТ I, но не имеющие столь консервативного положения остатков цистеина. Они распространены у беспозвоночных, растений, грибов, цианобактерий и некоторых других прокариот, морских водорослей и дрожжей.

Второй класс МТ в настоящее время делят на два типа. Оба типа характеризуются наличием в молекуле 12 остатков цистеина, однако МТ II типа 1 (МТ1) имеют структуру, представляющую собой сочетание только последовательностей следующего вида - 6Цист-Х-6Цист (Х – неконсервативная последовательность примерно 40 аминокислот, состав которых определяется видом растения и ионом металла, вызвавшего синтез МТ), а тип 2 представляет собой более сложные полипептиды, в молекуле которых встречаются как 6Цист-Х-6Цист-группировки, так и 6Цист-6Цист или 6Цист-Х-Х...Х-6Цист (в данном случае, аминокислотная вставка может быть значительно длиннее 40 остатков) [71, 90]. В состав аминокислотной последовательности, разделяющей два металлсвязывающих домена, могут входить и ароматические аминокислоты. Длина такого промежутка у МТ II других организмов составляет менее 10 аминокислотных остатков и не содержит ароматических аминокислот.

В настоящее время гены, кодирующие МТ, были найдены у большого числа растений, так, например, у томата их обнаружено четыре (LEMТ1, LEMТ2, LEMТ3 и LEMТ4), показано, что все они располагаются в различных частях генома. На арабидопсисе показано, что различные гены МТ экспрессируются в разных органах растений, на разных стадиях онтогенеза. Так МТ1, состоящий из трех изоформ - МТ1а, МТ1б, МТ1с, конститутивно экспрессируется у проростков растения (изоформа МТ1а), обработка медью значительно усиливает интенсивность экспрессии. Другая изоформа этого гена - МТ1с экспрессируется преимущественно в корнях и взрослых листьях. Не показано интенсификации уровня экспрессии ионами меди [39]. Другой ген МТ2 арабидопсиса также представлен несколькими изоформами - МТ2а

и MT2b. Обе изоформы конститутивно экспрессируются во взрослых листьях и только MT2a индуцируется медной обработкой [71].

MT синтезируются в норме в незначительном количестве. До настоящего времени нет однозначного ответа на вопрос, какую роль MT играют в жизни растения. Предполагается, что они принимают участие в поддержании гомеостаза микроэлементов (таких, как Zn, Cu и пр.) [49]. Также, MT возможно могут выполнять функцию антиоксидантов и мембранных протекторов [82].

Разные ионы металлов стимулируют синтез MT не в одинаковой мере. Такие металлы, как Ca, Al, Na, Mg, U не индуцируют образования MT. Повышение содержания в клетке металлсвязывающих пептидов при действии Fe и Cs наблюдается, очевидно, в определенных условиях, зависящих от вида растения и концентрации ТМ, так как по этому поводу имеются противоречивые данные [8]. Имеются данные об индукции синтеза MT ионами меди и цинка [39].

Процесс образования MT проявляет зависимость и от ионного окружения. Показано, что синтез CUP1 у *Saccharomyces cerevisiae*, индуцируемого Cu, при культивировании дрожжей в питательной среде, содержащей ионы других ТМ, в значительной степени снижен. При этом для ингибирования синтеза CUP1 содержание Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} должно быть, по меньшей мере, на порядок выше, чем Cd^{2+} и Mn^{2+} [8].

Компартментация

Выброс ионов за цитоплазматическую мембрану или их транспорт в вакуоль – два пути снижения токсического действия ТМ на цитоплазматические процессы.

Цитоплазматическая мембрана

Плазмалемму можно рассматривать как самую первую структуру растительной клетки, которая испытывает на себе токсическое действие ТМ. Такой симптом, как, например, повышение утечки электролитов из цитоплазмы вследствие нарушения нормального функционирования мембраны хорошо известен. Показано, что Cu увеличивает выход ионов калия из клеток корней *Agrostis capillaris*, *Silene vulgaris*, *Mimulus guttatus* [49]. Причиной такого действия ТМ на мембраны могут служить различные механизмы, включая окисление тиоловых групп клеточных белков, ингибирование H^+ АТФазы, изменения в соотношении липидных компонентов мембраны.

Плазмалема играет значительную роль в поддержании ионного гомеостаза клетки, однако снижение трансмембранного транспорта ионов ТМ, в присутствии их высоких концентраций у растений до настоящего времени изучено недостаточно.

Другим механизмом снижения цитоплазматической концентрации ТМ связанным с деятельностью плазмалеммы, может быть активный выброс ионов из клеточного пространства, однако, практически ничего не известно о функционировании данного механизма у растений. Тем не менее, данная стратегия является одним из главнейших компонентов устойчивости бактерий к ТМ и включает в себя функционирование таких транспортеров, как P-тип АТФазы, протонный антипортер. На животных была показана вовлеченность в регуляцию внутриклеточной концентрации ионов ТМ мембранного транспортера цинка ZnT-1 и CPx-семейства АТФаз, связанных с транспортом меди [48]. CPx АТФазы, рассмотренные подробнее в главе посвященной вопросам трансмембранного транспорта ионов, вместе с другими переносчиками (N-ramp белками, CDF и ZIP семействами), с большой степенью вероятности могут играть роль в формировании устойчивости к ТМ и у растений [49].

Вакуоль

Вакуоль является основным компартментом клетки, где накапливаются ТМ [49]. Наиболее изучена роль вакуоли в компартментации цинка. Обработка Zn меристематических клеток корня *Festuca rubra* приводила к усиленному развитию в них вакуолей [33], показана ключевая роль вакуолярной компартментации в развитии устойчивости к цинку ячменя [30]. Кроме цинка компартментации могут подвергаться ионы Cd и Mo, в то время, как Ni преимущественно присутствует в цитоплазме [30]. Изучение функционирования тонопластных транспортных систем в условиях индуцированного ТМ стресса также свидетельствует о значительной роли данного механизма детоксикации в формировании устойчивости растений к действию ТМ.

Данные об участии в компартментации ТМ других транспортных систем тонопласта ограничены. Из арабидопсиса были изолированы два гена SAH1 и SAH2, кодирующие тонопластный H^+/Ca^{2+} антипортер. Показано, что SAH1 участвует в транспорте кальция в вакуоль, в то время, как SAH2 по-видимому функционирует преимущественно, как переносчик ТМ [52].

Трансформация с использованием агробактерий

Для переноса чужеродных ДНК в клетки растений и их интеграции в ядерный геном существует естественный и широко распространённый метод: метод использования векторных систем.

Agrobacterium tumefaciens - почвенная бактерия семейства Rhizobiaceae, вызывающая у растений образование опухолей - корончатых галлов (crown galls). Растительные клетки после контакта с агробактериями начинают быстро и неорганизованно расти, образуя опухоли, секретирующие особые вещества, производные аргинина, называемые опидами [91]. Опины служат источником питания для агробактерий и по типу продуцируемых

опинов вид *A. tumefaciens* подразделяется на различные штаммы - октопиновые, нопалиновые, агропиновые и т. д. Кроме корончатых галлов в природе встречается другая болезнь - бородастые корни (hairy roots), что иногда дословно переводят как волосатые корни. Эта болезнь вызывается родственными *A. tumefaciens* бактериями вида *A. rhizogenes*. Образующиеся растительные корни также продуцируют опины: маннопин, агропин, кукумопин.



Рис. 6. Этапы трансформации ДНК

Механизмы трансформации растений посредством *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes* аналогичны [53]. В почвенных бактериях рода *Agrobacterium* помимо хромосомы содержится плазмида. Плазмида представляет собой кольцевую двухнитевую ДНК и состоит из Т - ДНК (transferred) - специфического участка размером 12 - 22 тпн, кодирующего ферменты синтеза фитогормонов и опинов; *vir* - области, отвечающей за перенос Т - ДНК в растение; генов утилизации опинов, а также локусов, контролирующих поддержание плазмиды в бактериальной клетке и перенос при конъюгации [97].

Процесс трансформации можно разбить на 4 этапа [14]: прикрепление бактерии к стенке растительной клетки; проникновение Т-ДНК внутрь клетки растения; интеграция Т-ДНК в геном растения и экспрессия Т-ДНК.

Перенос T-ДНК из бактерии в цитоплазму растительной клетки осуществляется за 30 минут кокультивирования [99].

Отмечено, что эффективность агробактериальной трансформации зависит от возраста и физиологического состояния растений [9]. Большое значение имеет также выбор растительного экспланта и условий кокультивирования [10].

Оптимизация условий агробактериальной трансформации с помощью синтетических сигнальных веществ, например, ацетосирингона или экссудатов, чувствительных к трансформации двудольных растений, способствует значительному повышению частоты трансформации [89, 84, 20, 6].

В природе существует большое количество штаммов *A.tumefaciens*, причем, многие из них вирулентны только для определенных видов растений. Для целей генетической инженерии растений используются штаммы широкой видовой специфичности, чья вирулентность показана для большого числа видов. В то же время, в некоторых случаях для трансформации определенного вида растений необходим подбор специфических штаммов *A.tumefaciens* [63].

Эксперименты с инсерционными мутантами *A.tumefaciens* показали, что делетирование генов, приводящих к индукции опухолевого роста, не воздействует на сам процесс переноса генов T-ДНК в растительную клетку. Полученные результаты дали возможность сконструировать так называемые обезоруженные (disarmed) векторы для генетической трансформации растений. Перенос генов за счет использования таких векторов не приводил к видимым изменениям в морфологии роста и развития трансформированных растений [12].

К важнейшими преимуществами “агробактериальных” методов генетической трансформации растений можно отнести простоту операций,

большую ёмкость векторов и возможность трансформации клеток и тканей без удаления или повреждения клеточной стенки.

Маркёры трансформации

Селективные гены

Одним из важных аспектов трансформации растений является отбор клеток, которые содержат интегрированные гены. Для выделения трансформированных клеток нужны были гены, экспрессия которых в клетках растений могла бы обеспечить им определенные преимущества при росте на селективных питательных средах. Большинство используемых в исследованиях по генетической инженерии растений генов имеют бактериальное происхождение. Среди них можно упомянуть ген дегидрофолатредуктазы (dhfr), ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (cat), обеспечивающие устойчивость, соответственно, к метотрексату [43] и хлорамфениколу [37, 51]. Одним из наиболее распространенных селективных генов является ген неомицинфосфотрансферазы II (npt II), клетки растений с этим геном приобретают устойчивость к антибиотикам канамицину и неомицину [37, 62]. Используются и другие селективные гены устойчивости к антибиотикам, среди которых можно упомянуть ген гигромицин фосфотрансферазы (hpt), сообщающий устойчивость к антибиотику гигромицину [43].

Селективный ген глюкозоизомеразы *E.coli* (xyl) дает клеткам возможность использовать ксилозу в качестве единственного источника углеводов [47].

Репортёрные гены

Кроме селективных генов, используемых для отбора трансгенных клеток, применяют репортёрные гены. Обычно к репортерным генам относят

те, чья экспрессия не дает клетке каких-либо селективных преимуществ, но приводит к ясно различимым феноменам, обычно, к появлению какой-либо окраски, как при обработке специфическими субстратами, так и в интактной системе.

В настоящее время широко используемым репортёрным геном является ген β -глюкуронидазы (GUS) uidA. Трансгенные клетки, экспрессирующие этот ген, при помещении на специфический субстрат окрашиваются в голубой цвет [56].

Из других аналогичных систем можно упомянуть ген синтеза люциферазы (luc), экспрессия которого давала свечение в субстрате люциферина [72, 34].

Большой интерес представляет репортёрный ген GFP (green fluorescent protein - зеленый флюоресцирующий белок) из медузы. Для использования его в целях генетической инженерии растений удалось сконструировать его сДНК-копию, которая правильно сплайсировалась в растительных клетках. Показана экспрессия этого гена в трансгенных растениях арабидопсиса [50], овса [57] риса [95]. К преимуществам использования этого гена относится возможность детекции трансформационных событий в живой системе. При облучении трансгенных растений, накапливающих этот белок, лучами ультрафиолета появляется зелёное свечение, видимое как под микроскопом, так иногда и невооруженным глазом.

Экологическая роль трансгенных растений

Одним из новейших направлений использования трансгенных растений является их применение для фиторемедиации - очистки почв, грунтовых вод и т. д. от загрязнителей: тяжелых металлов, радионуклидов и других вредных соединений. Известно, что большинство растений

накапливают кадмий в корнях, тогда как некоторые растения, такие как салат-латук и табак, накапливают его в основном в листьях [59]. Cd поступает в почву главным образом из промышленных выбросов и как примесь в фосфорных удобрениях [13]. Для снижения содержания ТМ в почве, перспективным может быть получение растений с повышенным синтезом в корнях фитохелатинов - естественных связывающих пептидов.

Возможно также использование металлотионеинов - небольших богатых цистеином белков, способных связывать тяжелые металлы. Показано, что металлотионеин является функциональным в растениях [60]. Получены трансгенные растения, экспрессирующие гены металлотионеинов, и показано, что они были более устойчивыми к кадмию, чем контрольные [70; 65]. Трансгенные растения с hMTII геном металлотионеина млекопитающих имели на 60 - 70 % ниже концентрации кадмия в стеблях по сравнению с контролем, снижен был также перенос кадмия из корней в стебли (транспортировано в стебли только 20 % поглощенного кадмия) [36].

Устойчивые к ртути бактерии экспрессируют ген mer A, кодирующий белок переноса и детоксикации ртути. Модифицированную конструкцию гена mer A использовали для трансформации табака, рапса, тополя, арабидопсиса. В гидропонной культуре растения с этим геном извлекали из водной среды до 80 % ионов ртути, при этом рост и метаболизм трансгенных растений не подавлялся. Устойчивость к ртути передавалась в семенных поколениях [86].

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследований:

Рапс

В качестве объекта трансформации выбран рапс (лат. *Brassica napus* ssp. *oleifera*) сорта Вестар (Westar).

Рапс — важное масличное растение из семейства Крестоцветных. В диком виде он не встречается, в культуре известен за 4 тыс. лет до н. э. Рапс произошёл от скрещивания озимой или яровой сурепицы (*B. campestris*) с капустой огородной (*B. oleracea*).



Brassica napus L. var. *napus*

Всё растение покрыто восковым налётом. Стебель высотой 50—150 см. Розеточные листья лировидно-перисто-надрезные, имеют очень редкое опушение; стеблевые листья — от лировидных (нижние) до удлинённо-ланцетных (верхние). Соцветие — кисть. Цветки мелкие, жёлтые, редко белые.

В семенах содержится жир от 33—40 (у ярового) до 40—50% (у озимого Р.). Резких морфологических различий между обеими формами Рапса нет. Озимый Рапс слабозимостоек, плохо переносит засуху. Лучшие

почвы — глубокие структурные суглинистые и глинистые с большим запасом питательных веществ и с водопроницаемой подпочвой.

Урожай семян озимого Рапса 10—30 ц, ярового — 8—15 ц с 1 га. Площади под рапсом в мире составляют более 20 млн. га. Ареал его распространения охватывает Европу, Азию и Америку. В нашей стране рапс возделывается на площади около 200 тыс. га. В настоящее время селекционерами как за рубежом, так и у нас выведены двунулевые сорта («00»), которые отличаются от ранее возделываемых отсутствием эруковой кислоты и малым содержанием гликозинолатов.

Применение: Основная продукция рапса – маслосемена, ежегодный мировой валовой сбор которых составляет более 25 млн. т. Их используют на пищевые (масло, маргарин, майонез и др.), технические (смазка, горючее сырье, мыловарение, парфюмерия, текстильная, резиновая, лакокрасочная, сталелитейная промышленности) и лекарственные цели. Зеленая масса, шрот и жмых современных сортов рапса используют на корм скоту и птице. Посевы служат также отличным медоносом.

В связи с тенденцией роста цен на ископаемое топливо производство биодизеля на основе растительного, в частности рапсового масла становится всё более привлекательным. По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН в сезоне 2003-04 годов было собрано 36 млн. тонн семян рапса, а в 2004-05 годах — 46 млн. тонн. В 2005 году под рапс было отведено 264 тыс. кв. км, что составляет около 2 % мировой площади пашни. Рентабельность топливного применения рапса постоянно растет.

Рапс является двудольным растением, поэтому хорошо заражается агробактерией. Он является одним из классических объектов генной инженерии, методики его трансформации достаточно хорошо проработаны.

Ген Myb 4

В качестве встраиваемого гена выбран ген **Myb 4**, который отвечает за реакцию на разнообразные виды абиогенных стрессов. Оверэкспрессия этого гена приводила к повышению устойчивости к холоду, морозу и дегидратации (соли, засуха). В ответ на стресс растение накапливает осмолиты: пролин, аминокислоты, глицинбетаин, сахара.

Характеристика семейства транс-факторов Myb у растений:

- участвуют в делении и дифференцировке клеток
- активируются под действием стрессовых условий (низкие температуры, засуха, засоление)
- участвуют в метаболизме фенилпропаноидов; предшественники лигнина
- участвуют в защитных ответах на патоген
- активируются при действии некоторых гормонов (АБК, гиббереллины)
- определяют форму клетки

Медь и цинк

Медь и цинк относятся к тяжелым металлам, но в малых количествах являются эссенциальными (то есть жизненно необходимыми для растений) элементами, вовлеченными во множество физиолого-биохимических процессов в живых организмах. Среди ТМ они наряду с никелем занимают особое место, поскольку их избыточное содержание в почве может быть результатом не только хозяйственной деятельности человека, но и естественных почвообразовательных процессов, так как эти металлы содержатся в высоких концентрациях в составе некоторых почвообразующих пород.

Медь, входя в состав коферментов, обеспечивает возможность протекания важнейших физиологических процессов, связанных с передачей

электронов и изменением статуса естественных окислительно-восстановительных систем, таких, например, как транспорт электронов при фотосинтезе и дыхании, ответ на окислительный стресс, трансдукция гормонального сигнала.

На клеточном уровне медь также играет существенную роль в транскрипции, окислительном фосфорилировании и механизмах транспорта белков. Большая часть меди (75% всего содержания в листе) концентрируется в хлоропластах. Здесь сосредоточен медьсодержащий белок синего цвета – пластоцианин, осуществляющий перенос электронов между ФС II и ФС I.

Цинк необходим для функционирования более 300 ферментов, среди них – щелочная фосфатаза, алкоголь-дегидрогеназа, Cu/Zn супероксид дисмутаза и др. Также цинк играет важную роль в стабилизации структуры многих белков, в том числе некоторых последовательностей регуляторов транскрипции. Он необходим для регуляции азотного обмена, деления клеток, синтеза ауксинов. В отличие от меди, цинк в клетке не участвует в окислительно-восстановительных процессах.

Пролин защищает структуру клетки, детоксицирует свободные радикалы. Оверэкспрессия *Myb 4* активизирует несколько путей ответа на холод и засуху. Прямой путь – пролинсинтаза.

Методы исследований

Метод идентификации трансгенных конструкций в растении

Идентификация генных конструкций в исследуемой ДНК при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных

условиях (in vitro). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В результате нарабатываются количества ДНК, достаточные для визуальной детекции.

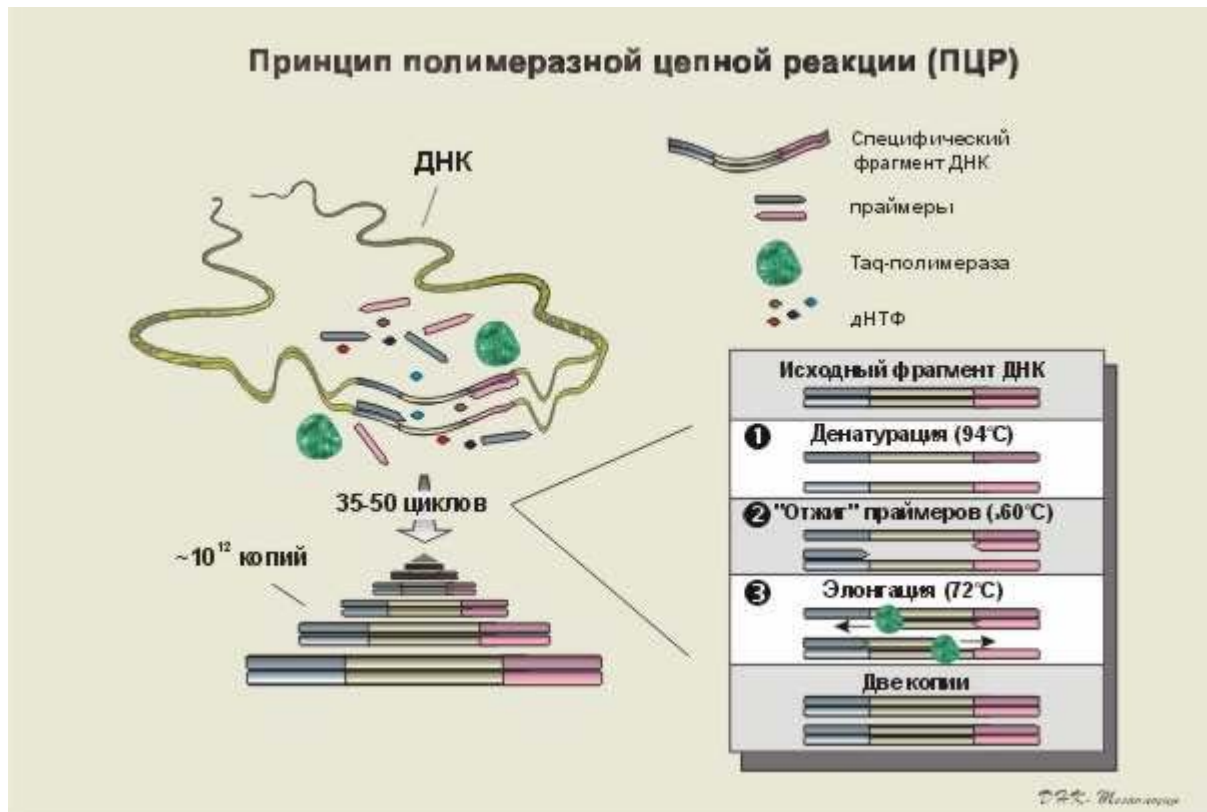


Рис. 8. Принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.

Два праймера, комплементарные концам требуемого фрагмента.

Термостабильная ДНК-полимераза.

Дезоксинуклеотидтрифосфаты (А, G, C, T).

Буферный раствор.

ПЦР проводят в **амплификаторе** — приборе, обеспечивающем периодическое быстрое охлаждение и нагревание пробирок по определенной программе, обычно с точностью не менее $0,1^{\circ}\text{C}$.

Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами, короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18—30 букв. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы, обрамляя начало и конец амплифицируемого участка.

После гибридизации матрицы с праймером (отжиг [2]), последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы.

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20—35 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий.

Двуцепочечную ДНК-матрицу нагревают до $94\text{—}96^{\circ}\text{C}$ (или до 98°C , если используется особенно термостабильная полимеразы) на $0,5\text{—}2$ мин., чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется денатурацией — разрушаются водородные связи между двумя цепями. Иногда перед первым циклом проводят предварительный прогрев реакционной смеси в течение $2\text{—}5$ мин. для полной денатурации матрицы и праймеров.

Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется отжигом. Температура отжига зависит от праймеров и обычно выбирается на $4\text{—}5^{\circ}\text{C}$ ниже их температуры плавления. Время стадии — $0,5\text{—}2$ мин.

ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это — стадия элонгации. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72°C . Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания

всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 10—15 мин.

Продукты ПЦР визуализируются при электрофорезе в 1% агарозном геле с бромистым этидием. В свете УФ-лампы можно увидеть, на каком расстоянии в геле ушла ДНК, сравнить его у исследуемых проб и положительного контроля. Маркер покажет, какого размера полученный фрагмент ДНК.

Определение содержания меди и цинка в листьях исследуемых растений

Навеску воздушно-сухого растительного материала (30-50 мг) заливали смесью концентрированных азотной (1,5 мл) и хлорной (0,8 мл) кислот и оставляли на сутки. Затем с помощью аналогового термостата TDB-400-A фирмы BioSan пробы прогревали 3 часа при 180° и после охлаждения до 150° вносили в них по 5-6 капель концентрированной H₂O₂. Через 10 минут к пробам приливали 1 мл HCl и выдерживали их 10 минут при температуре 110°. После обесцвечивания растворов концентрацию ТМ измеряли на атомно-абсорбационном спектрофотометре Hitachi-207 фирмы Hitachi.

Формулы для пересчета показаний прибора на мкг/г массы листа:

Для цинка:

$Zn(мМ) = E \times 0,0016 \times 1000$; E – показание прибора.

$$Zn = \frac{Zn(мМ) \times 0,065 \times 4}{M_{сух}} \text{ (мкг/г сух. ткани),}$$

$M_{сух}$ – масса сухой ткани образца, 4 – объем пробы, мл.

Для меди:

$Cu(мМ) = E \times 0,0032 \times 1000$; E – показание прибора.

$$Cu = \frac{Zn(мМ) \times 0,0635 \times 4}{m_{сух}} \text{ (мкг/г сух. ткани),}$$

$m_{сух}$ – масса сухой ткани образца, 4 – объем пробы, мл.

Определение содержания свободного пролина в листьях исследуемых растений

Содержание свободного пролина определяли с помощью кислого нингидринового реактива (30 мл ледяной уксусной кислоты + 20 мл 6М H_3PO_4 + 1,25 г нингидрина) по методу Бейтса.

Навеску свежей растительной ткани листьев (200 мг) заливали в пробирке 5-20 мл кипящей дистиллированной воды и на 10 минут помещали в кипящую водяную баню. В чистую пробирку приливали 1 мл ледяной уксусной кислоты и 1 мл нингидринового реактива, затем приливали 1 мл экстракта. Пробы инкубировали в течение 1 часа в кипящей водяной бане, после чего быстро охлаждали во льду. Интенсивность окраски определяли спектрофотометрически при длине волны 520 нм на спектрофотометре СФ-46. Значения содержания пролина рассчитывали с помощью калибровочной кривой, используя для ее построения пролин фирмы «Serva». Определение содержания пролина проводили в 2-х биологический и 2-х аналитических повторностях.

Формула пересчета оптической плотности на мкМ/г сырого веса:

$$П = D \times 0,4247 \times \frac{10}{0,2}; \text{ где } П \text{ – содержание пролина (мкМ/г сырого веса);}$$

D – оптическая плотность,

10 – объем пробы

Определение оводненности листьев

Предварительно бюксы промывали хромпиком, затем дистиллированной водой, сушили и доводили до постоянной массы, которую фиксировали.

Готовили среднюю пробу из измельченных бритвой листьев и отбирали навеску (около 1 грамма, ее записывали) и помещали в бюкс.

Бюксы сушили в термостате 1 сутки с открытой крышкой при температуре 80°, доводили до постоянной массы. Затем рассчитывали оводненность тканей листа.

Формула для определения оводненности ткани:

$$O = \frac{(m_{\text{свеж}} - m_{\text{сух}})}{m_{\text{свеж}}} \times 100\%,$$

где O – оводненность ткани, %.

$m_{\text{свеж}}$ – масса свежего листа, мг

$m_{\text{сух}}$ – масса листа после высушивания, мг

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работа проводилась параллельно в двух направлениях:

1. получение трансгенных растений;
2. физиологические опыты с растениями исходного сорта Вестар для последующего сравнения аналогичных результатов у трансгенов. Растения рапса выращивались в фитотроне при $t=20^{\circ}\text{C}$ и 18 часовом световом режиме при 70% влажности воздуха на питательной среде Хогланда-Снайдерс (см. приложение) с модификациями. Семена проращивали в перлите, затем пересаживали на водную культуру. Опыт проводился в водной культуре.

Трансформация рапса

1. Подготавливаем посуду (пинцеты) и среду, колбочки (2 ч. в сушильном шкафу на 200°C).
2. Разливаем среду S' без антибиотиков по колбочкам.
3. Дезинфицируем семена рапса (взвесить массу ~ 100 семян, и насыпать в 5 раз больше (~ 500 семян). Сначала обрабатывается белизной (20 мин.), затем спиртом и водой 5-6 раз.
4. Раскладываем семена по колбочкам (10 штук на колбу).
5. Через 5 дней проводим трансформацию на газоне (2 дня стоят в тепле и в темноте, и 3 дня на свету и в тепле):
6. Разливаем среду В по чашкам Петри без антибиотиков.

7. У проростков рапса срезаем листья, но не затрагиваем верхушку (точку роста). Каллус будет образовываться в месте поражения на листовом черешке.



Рис. 9. Проростки рапса на агаре

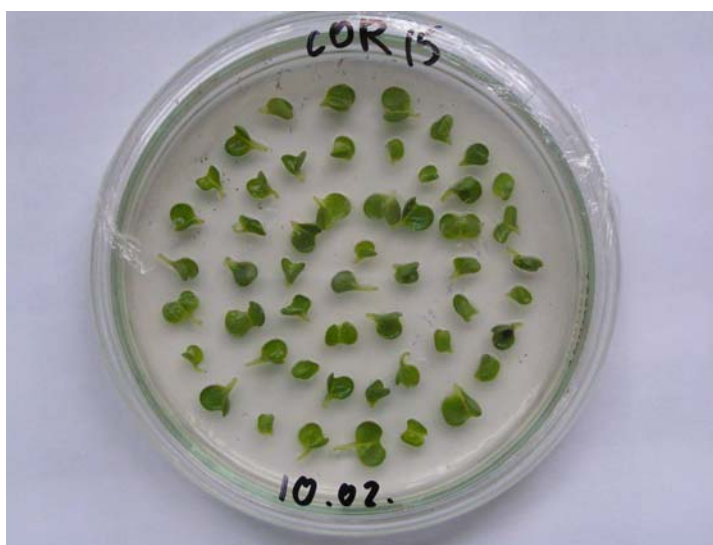


Рис. 10. Выращивание каллуса

8. Подготовка газона: наносим 50 мкл *Agrobacterium* на чашку Петри и размазываем шпателем по поверхности.

9. Выкладываем листочки рапса на чашку Петри (~40 штук/чашка).

Подписываем число.

10. Ставим на 2 дня в темноту и тепло.

11. За день до пересадки готовим среду D, инструмент (пинцеты, антибиотики).

12. Разливаем среду по чашкам, в горячую (но не кипяток) среду добавляем антибиотики: клафоран (до 800 мг/л) и гормоны: АБК (до 3 мг/л).

13. Перекладываем экспланты рапса на чашки – по 8 штук/ чашка (1 пинцет – 1 чашка).

14. Подписываем чашки (среда, конструкция, концентрация антибиотиков и гормонов, число).

15. Ставим на свет и в тепло.

16. Через две недели пересаживаем подросшие экспланты на ту же среду D 8/1, D 4/2, D 4/0, но уже без АБК. В растопленную, но не горячую среду добавляем: AgNO_3 , клафоран 500 мг/л, канамицин 15 мг/л.

17. Ставим на 2 недели на свет и тепло.

18. Отрезаем образовавшуюся массу каллуса с регенерантом от экспланта и пересаживаем на среду D.

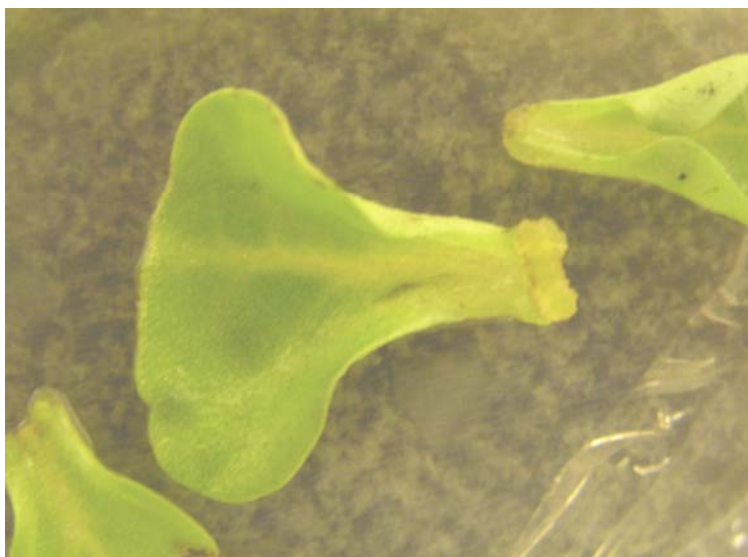


Рис. 11. Образование каллуса на срезе листа

19 Отрезаем регенеранты, верхнюю часть перекладываем на $\frac{1}{2}$ MS + НУК в пластиковые горшки. Каллус – в ч. Петри на D без гормонов + 0,3% агарозы.



Рис. 12. Растение, не прошедшее отбор на канамицине



Рис. 13. Растение прошло отбор на канамицине и осталось зеленым.

Таблица 2. Статистика по полученному каллусу и проросткам

Этап с AgNO ₃	Ген	Всего эксплантов	Давших каллус	Давших зеленый каллус	Давших желтый каллус	Давших проростки	Давших зел. прор.	Давших желт. прор.
D 4/0	COR	80	39	8	31	-	-	-
	pGA	112	57	9	48	2	-	2
D 8/1	COR	56	48	7	41	30	-	30
	pGA	54	34	5	29	10	-	10
D 4/2	COR	104	84	14	70	47	1	46
	pGA	108	83	7	76	21	1	20

Было получено несколько трансгенных растений, из них выжило только одно. В настоящее время оно цветет, и в будущем планируется получить его семена. Выращенный из семян рапс будет также проверен на трансгенность методом ПЦР, а затем с ним будут поставлены те же опыты, что и с обычным рапсом сорта Вестар.

*Рис.14. Трансгенное растение рапса*

Физиологические опыты

Параллельно с получением трансгенов, мы подбирали экспериментальные условия на растениях дикого типа, чтобы в дальнейшем повторить их с трансгенными растениями.

Условия экспериментов представлены ниже - состояние растений оценивалось по содержанию тяжелых металлов, накоплению пролина и водности листьев растений рапса.

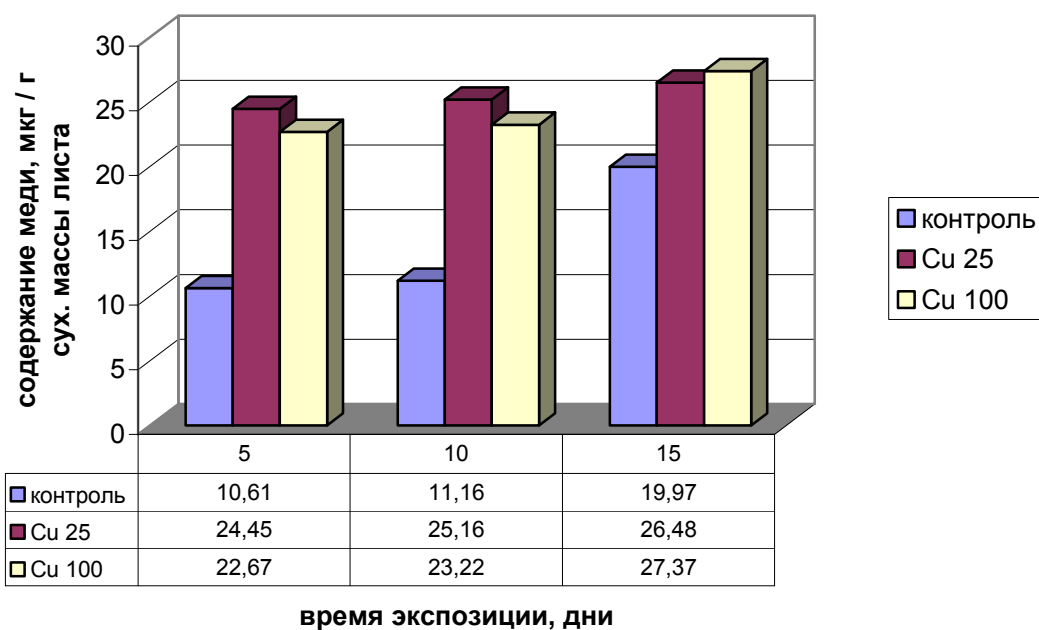
Ставилось 7 опытов с выращиванием рапса на повышенных концентрациях меди и цинка.

Использовались различные концентрации металлов: цинк – 1000, 2500, 5000 мкМ, медь – 25, 100 мкМ и различное время воздействия – 5, 10, 15 дней. После каждого опыта определялись следующие параметры.

Определение содержания цинка и меди в листьях рапса

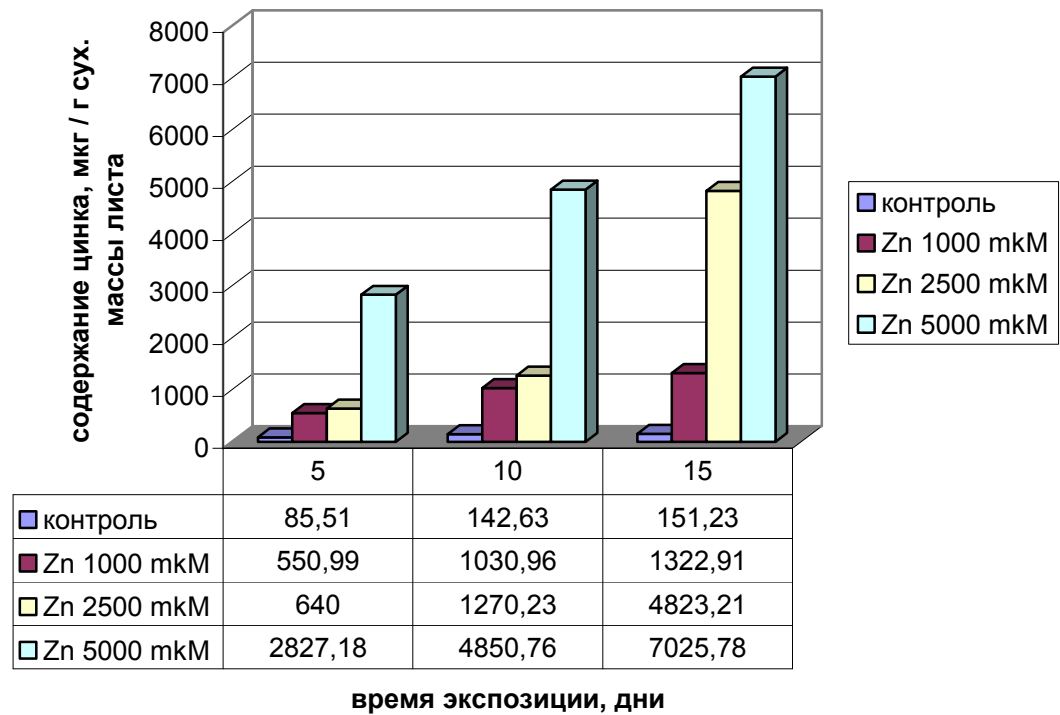
Исследования содержания меди в листьях показали, что в течение времени оно слабо изменяется, то есть растение не позволяет меди накапливаться в надземных органах, её содержание никогда не превышало контроль более чем в 2,5 раза. При слишком высоких её концентрациях растение погибает.

Рис. 15. Содержание меди в листьях рапса при влиянии сульфата меди

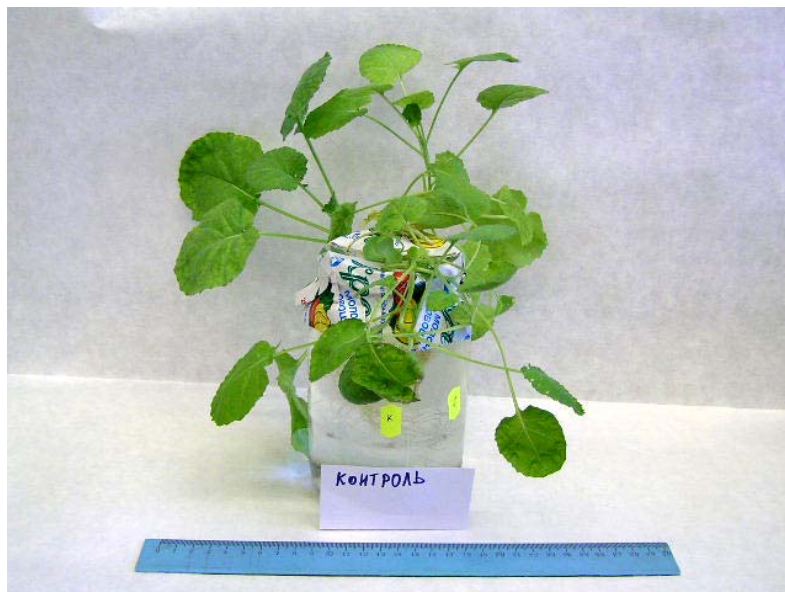


С цинком обратная картина – рапс способен поглощать этот металл из почвы, накапливая его в надземных органах, и выживать даже при очень высоких его концентрациях. В этом случае развитие растения несколько тормозится, но не прекращается. Летальная концентрация цинка для рапса очень велика, т.е. рапс обладает высокой устойчивостью, а также характерно значительное накопление в надземных органах – до 7000, а в некоторых экспериментах и до 10 000 мкг/г сух. массы листа. При 5000 мкМ растение погибало, но успевало накопить в вегетативной массе огромное количество этого тяжелого металла.

Рис. 16. Содержание цинка в листьях рапса при влиянии сульфата цинка



При таких высоких значениях концентрации наблюдается сильное повреждение, но эффект намного ниже, чем у меди. Здесь наглядно показано действие тяжелых металлов на растения рапса – на рис. 17. хорошо видно изменение водного статуса растений



Контроль



Медь 100 мкМ



Цинк 5000 мкМ

Рис. 17. Водный статус растений, выращенных в разных условиях

На рисунке 18 видны характерные некрозы, вызванные высоким содержанием цинка в листьях.

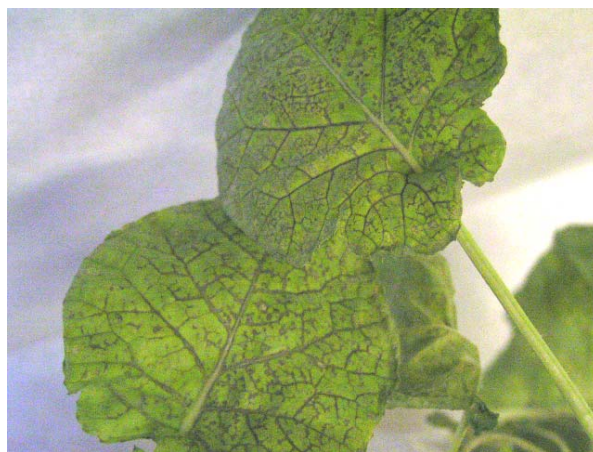
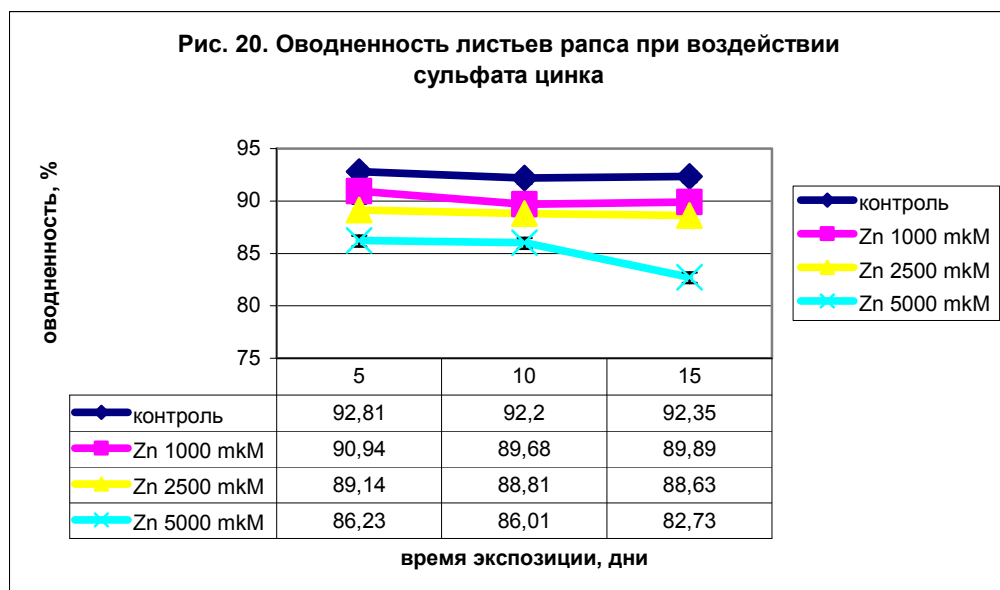
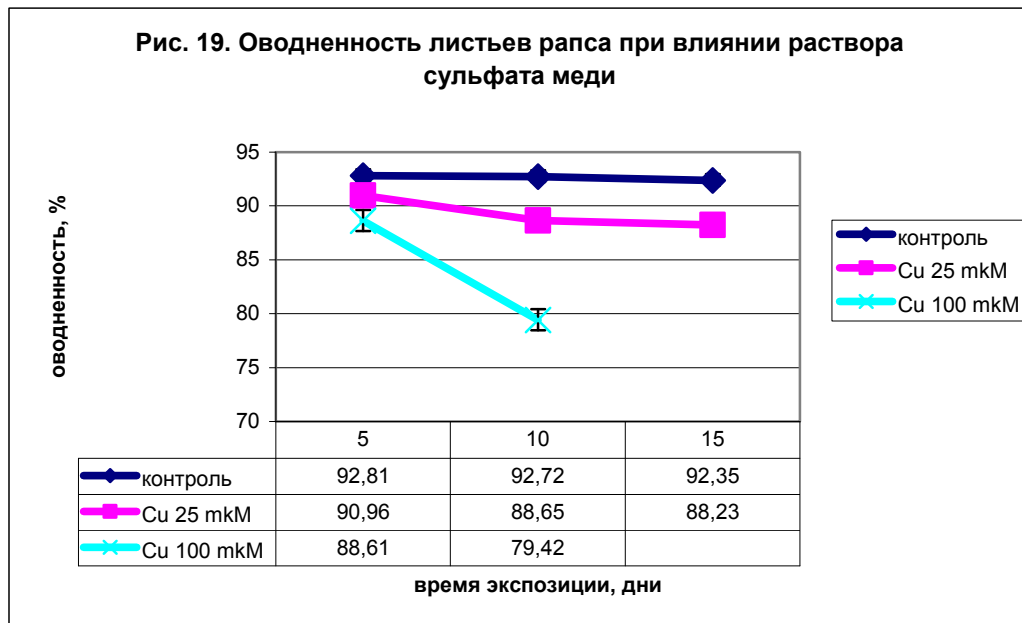
**Контроль****Zn 5000 мкМ**

Рис. 18. Некрозы на листьях растения, выращенного на среде с высокой концентрацией цинка.

Если умеренная концентрация цинка, при которой растения испытывают стресс, но не гибнут составляет 1000-2500 мкМ, то для меди эта концентрация – 25 мкМ, т.е. в 100 раз ниже, то есть медь является на 2 порядка токсичнее для рапса.

Определение оводненности листовой ткани рапса

Для показателей оводненности характерно следующее: при действии меди сильнее изменяется водный статус и при более низких концентрациях, чем у цинка. Это также говорит о большей устойчивости рапса к цинку и о высокой токсичности для него меди (см. рис.17).



Определение содержания свободного пролина

Нарушение водного статуса могло означать, что должен накапливаться пролин, как совместимый осмолит – содержание пролина при максимальной концентрации меди превышает контрольные значения в 30 раз, тогда как для цинка – в 18 раз.

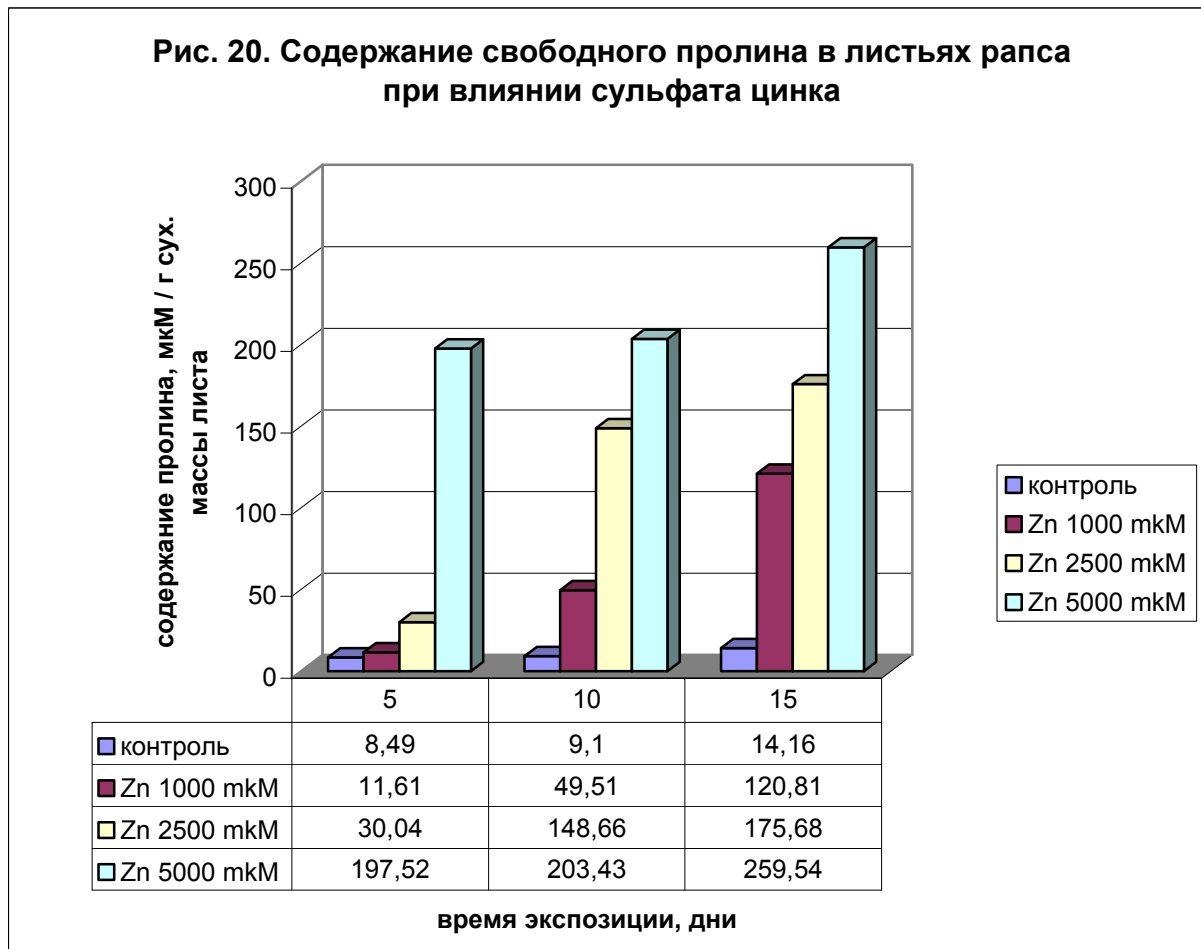
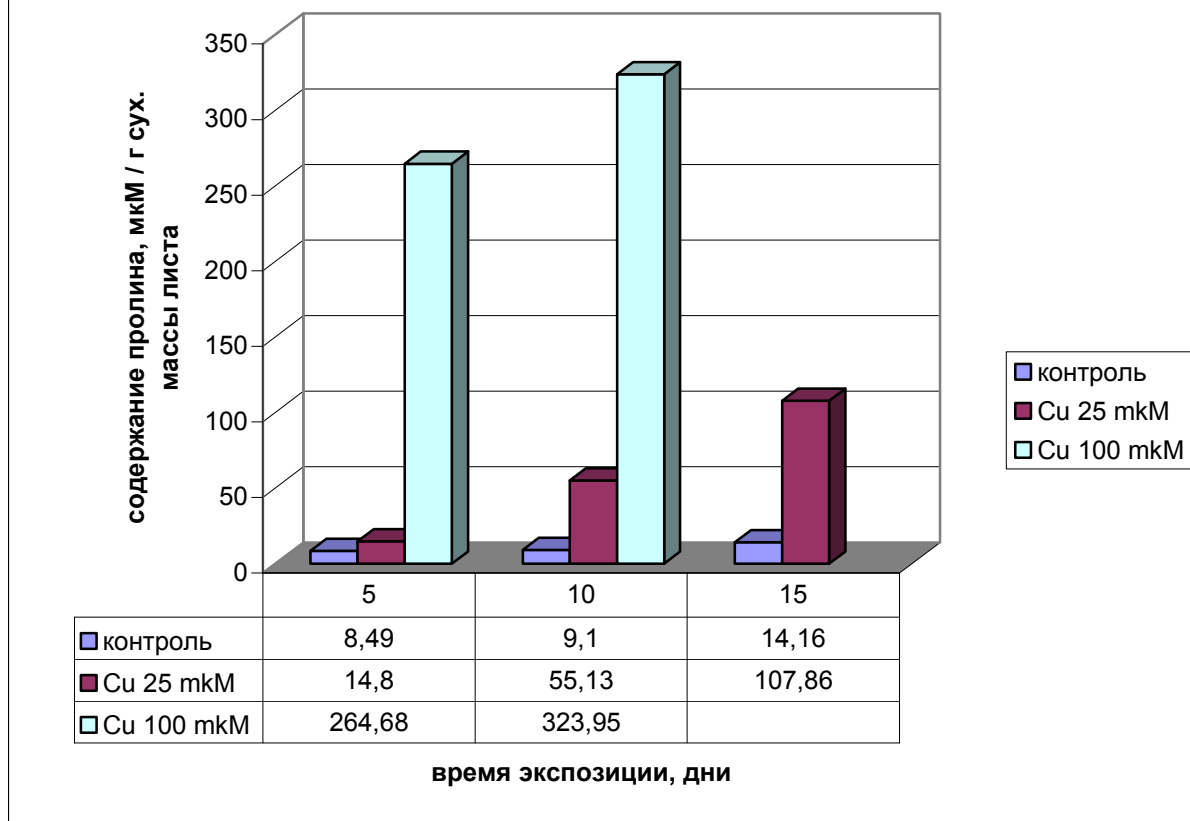


Рис. 21. Содержание свободного пролина в листьях рапса при влиянии сульфата меди



Повышение содержания пролина в тканях растения при стрессе говорит о его способности защищаться от неблагоприятных воздействий окружающей среды и выживать.

На графике видно, что медь является для рапса более сильным токсикантом. При концентрации в 100 мкМ вырабатывается больше пролина, чем при 5000 мкМ цинка, При 100 мкМ меди на 15 день выработка пролина прекращается, т.к. растение не справляется с данной нагрузкой и погибает.

При повышенных концентрациях цинка также увеличивается содержание пролина, но менее резко. При концентрациях 1000 мкМ и 2500 мкМ растение испытывает стресс, но справляется с ним. 5000 мкМ – опасная концентрация, способная привести к гибели, но все равно стресс меньше, чем при повышенном содержании меди.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенной работы было получено 4 трансгенных растения рапса (ген *Mub 4*). Жизнеспособным оказалось только одно растение.

2. Провести сравнительные исследования по устойчивости к повышенному содержанию ТМ не представлялось возможным, т.к. одного растения оказалось явно недостаточно. Поэтому на данном этапе работы проводились физиологические исследования на растениях сорта Вестар.

3. Не наблюдалось значительного накопления меди в надземной части растений ни при увеличении концентрации металла в среде, ни при увеличении длительности воздействия – содержание меди не превышало контрольные показатели более чем в 2,5 раза. Это говорит о том, что рапс является эксклюдером по отношению к меди, то есть не пропускает в клетки надземной части растения ионы меди;

4. Показано накопление значительного количества цинка в надземной части, причем максимальные абсолютные значения – до 7-9,9 мг/кг сух.массы - позволяют считать рапс гипераккумулятором цинка.

5. Благодаря своей мощной биомассе рапс может быть очень эффективным фиторемедиантом, то есть способен выносить из среды очень большие количества цинка;

6. Медь является значительно более сильным токсикантом для рапса, чем цинк. Летальная концентрация меди для рапса – 100 мкМ, для цинка – 5000 мкМ;

7. Наблюдалось снижение оводненности листьев рапса при действии тяжелых металлов, причем токсический эффект меди был выражен сильнее, чем цинка

8. Синтез пролина – одна из первых реакций на стресс. Пролин защищает структуру белков клетки от воздействия ионов солей (в.ч. солей ТМ) сразу после начала их воздействия, до того, как включатся другие механизмы адаптации. Пролин накапливался при действии обоих металлов – но содержание пролина при действии меди превышало контрольные показатели в 30 раз, тогда как при действии цинка – в 18 раз.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Бабкин В.В., Завалин А.А. Физиолого-биохимические аспекты действия тяжелых металлов на растения // Химия в сельском хозяйстве, 1995; № 5; с. 17-21.
2. Барабой В.А. Петрина Л.Г. Металлотioneины: структура и механизмы действия. Укр. биохим. журн. 2003, Т.75. С.28-36.
3. Важенина Е.А. Химические и минералогические исследования почв в окрестностях металлургических предприятий. Бюл. Почв. ин-та им. В.В.Докучаева. 1983, Вып.35. С.32-36.
4. Виноградов А.П. Среднее содержание химических элементов в главных типах изверженных горных пород земной коры. Геохимия. 1962, №7. С.555-571.
5. Воскресенская О.Л. Влияние избытка цинка в среде произрастания на целостность мембран и сверхслабое свечение корней овса. // – Йокшар-Ола: Мар. ун-т, 1987 – 15с. (Рукопись деп. в ВИНТИ 24.03.87, № 2103-В87)
6. Данилова С.А. Оптимизация агробактериального метода трансформации кукурузы.// Дисс. на соиск уч. степ. канд. б. н. М., 2001.
7. Димитчик В.В., Соколик А.И., Юрин В.М. Токсичность избытка меди и толерантность к нему растений // Успехи современной биологии, 2000, Т.121, №5, с. 511-526
8. Евсеева Т., Юранева И., Храмова Е. Механизмы поступления, распределения и детоксикации тяжелых металлов у растений. 2003, Физиология растений, V. 133, P. 218-229.
9. Захарченко Н.С., Каляева М.А., Бурьянов Я.И. Индуцирование процессинга агробактериальной Т-ДНК экссудатами однодольных растений. // Физиология растений - 1999 - т. 46 - № 2 - с. 282-291.

- 10.Ивашута С.И., Агафодорова М.Н., Солодкая Л.А., Кирьян И.Г., Мазин В.В. Влияние реципиентных систем на эффективность генетической трансформации кормовых растений // Биотехнология – 1995 – № 1-2 – с.6-10.
- 11.Ильин В.Б. Тяжелые металлы в системе почва – растение. Новосибирск. Изд. Наука, 1991, 150 с.
- 12.Кучук Н.В. Генетическая инженерия высших растений // Киев: Наукова думка - 1997 - 152 с.
- 13.Левенко Б.А. Биотехнология растений: сегодня и завтра // Физиология и биохимия культурных растений - 1999 - т.31 - №3 - с. 163 - 172.
- 14.Лутова Л.А., Павлова З.Б., Иванова М.М. Агробактериальная трансформация как способ изменения гормонального метаболизма у высших растений. // Генетика - 1998 - т. 34 - № 2 - с. 165 - 182.
- 15.Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы — М.: Наука, 2005 — В 2 т. – 276 с.
- 16.Серегин И.В. Фитохелатины и их роль в детоксикации кадмия у высших растений. Успехи биологической химии. 2001, Т.41. С.283-300.
- 17.Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений / Н.Н. Третьяков, Е.И. Кошкин, Н.М. Макрушин и др.; Под ред. Н.Н. Третьякова. – 2-е изд. – М.: КолосС, 2005. – 656с.
- 18.Хендерсон П. Неорганическая геохимия. М.: Мир. 1985, 339с.
- 19.Холодова В.П., Волков К.С., Кузнецов Вл. В. Адаптация к высоким концентрациям солей меди и цинка растений хрустальной травки и возможность их использования в целях фиторемедиации. Физиология Растений. 2005, Т. 52, №6, С. 848 – 858.
- 20.Aldemita R.R., Hodges T.K. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. // Planta - 1996 - v. 199 - p. 612-617.

21. Ambler J.E., Brown J.C., Gauch H.G. Effect of zinc on translocation of iron in soybean plants. *Plant Physiol.* 1970, V.46. P.320-323.
22. Aro E.M., McCaffery S., Anderson J.M. Photoinhibition and D1 protein degradation in peas acclimated to different growth irradiances. *Plant Physiol.* 1993, V. 103, P. 835-843.
23. Assuncao A.G.L., Costa Martins P.D.A., De Folter S., Vooijs R., Schat H., Aarts M.G.M. Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell and Environment.* 2001, V.24. P.217–226.
24. Balandin T., Castresana C. AtCOX17, an Arabidopsis homolog of the yeast copper chaperone COX17. *Plant Physiol.*, 2002, V. 129, P. 1852-1857.
25. Barón M., Arellano J.B., López-Gorgé J. Copper and photosystem II: A controversial relationship. *Physiol. Plant.* 1995, V. 94, P. 174-180.
26. Barón M., López-Gorgé J., Lachica M., Sadmann G. Changes in carotenoids and fatty acids in photosystem II of Cu-deficient pea plants. *Physiol. Plant.* 1992, V. 84, P.1-5.
27. Baszynski T., Tukendorf A., Ruszkowska M., Skórzynska E., Maksymiec W. Characteristics of the photosynthetic apparatus of copper non-tolerant spinach exposed to excess copper. *J. Plant Physiol.* 1988, V. 132, P. 708-713.
28. Bowen, J.E. Adsorption of Copper, Zinc, and Manganese by Sugar Cane Tissue. *Plant Physiology*, 1969, 44, 255-261.
29. Bringezu K., Lichtenberger O., Leopold I., Neumann D. Heavy metal tolerance of *Silene vulgaris*. *Journal of Plant Physiology.* 1999, V.154. P.536–546.
30. Brune A., Urbach W., Dietz K-J. Compartmentation and transport of zinc in barley primary leaves as basic mechanisms involved in zinc tolerance. *Plant Cell and Environment.* 1994, V.17. P.153–162.
31. Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta.* 2001, V.212. P.475–486.

32. Clijsters H., VanAssche F. Inhibition of photosynthesis by heavy metals, *Photosynth. Res.* 1985, V.7. P.31-40.
33. Davies K.L., Davies M.S., Francis D. Zinc-induced vacuolation in root meristematic cells of *Festuca rubra* L. *Plant, Cell and Environment.* 1991, V.14. P.399-406.
34. DeWet J.R., Wood K.V., DeLuca M., Helinski D.R. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. // *Mol. Cell Biol.* - 1987 - v. 7 - p. 725 - 737.
35. Droppa M., Horváth G. The role of copper in photosynthesis. 1990, *Plant Sci.* V. 9, P. 111-123.
36. Elmayer T., Tepfer M. Synthesis of a bifunctional metallothionein β - glucuronidase fusion protein in transgenic tobacco plants as a means of reducing leaf cadmium levels. // *Plant J.* - 1994 - v. 6 - is. 3 - p. 433 - 440.
37. Fromm M.E., Taylor L.P., Walbot V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* - 1985 - v. 82 - p. 5824 - 5825.
38. Fromm M.E., Taylor L.P., Walbot V. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. // *Nature* - 1986 - v. 319 - p. 791 - 793.
39. Garcia-Hernandes M., Murphy A., Taiz L. Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 1998, V.118. P.387-397.
40. Garty J., Karary Y., Harel J. Effect of low pH, heavy metals and anions on chlorophyll degradation in the lichen *Ramalina duriaei* (De Not) Bagl. *Environ. Exp. Bot.* 1992, V.32. P.229-241.
41. Gebhart E. Chromosome damage in individuals exposed to heavy metals, *Toxicol. Environ. Chem.* 1984, V.8. P.253-266.

42. Golovkin M.V., Abraham M., Morocz S., Bottka S., Feher a., Dudits D. Productiin of transgenic maize plants by direct DNA uptake into embryogenic protoplasts. // *Planta Science* - 1993 - v. 90 - is. 1 - p. 41 - 52.
43. Gritz L., Davies J. Plasmid - encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Esherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. // *Gene* - 1983 - v. 25 - p. 179 - 188.
44. Grotz N., Fox T., Connolly E., Park W., Guerinot M., Eide D. Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1998, V. 95, № 12, P. 7220-7224.
45. Guerinot M.L. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000, V.1465. P.190–198.
46. Gupta M., Cuypers A., Vangronsveld J., Clijsters H. Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant*. 1999, V. 106, P. 262-267.
47. Haldrup A., Petersen S.G., Okkels F.T. The Xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D xylose as the selection agent. // *Plant Mol. Biology* - 1998 - v. 37 - is. 2 - p. 287 - 296.
48. Hall J., Williams E. Transition metal transporters in plants. *J. Exp. Botany*, 2003, V. 54, № 393, P. 2601-2613
49. Hall J.L. Cellular Mechanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance. *J. Exp. Botany*. 2002, V. 53. P. 1–11.
50. Haseloff J., Siemering K.R., Prasher D.C., Hodge S. Removal of cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* - 1997 - v. 94 - p. 2122 - 2127.
51. Hauptmann R.M., Ozias - Akins P., Vasil V., Tabaeizadeh Z., Rogers S.G., Horsch R.B., Vasil I.K., Fraley R.T. Transient expression of electroporated

- DNA in monocotyledonous and dicotyledonous species. // *Plant Cell Rep.* - 1987 - v. 6 - p. 265 - 270.
- 52.Hirschi K.D., Zhen R.G., Cunningham K.W., Rea P.A., Fink G.R. CAXI, an H⁺/Ca²⁺ antiporter from *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 1996, V.93. P.8782–8786.
- 53.Hoekema A., Roelvink P.W., Hooykaas P.J.J., Schilperoort R.A. Delivery of T-DNA from the *A. tumefaciens* chromosome into plant cells. // *Embo J.* - 1984 - v. 3 - p. 2485-2490.
- 54.Howden R., Goldsbrough P.B., Andersen C.R., Cobbett C.S. Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiology.* 1995, V.107. P.1059–1066.
- 55.Inouhe M. Phytochelatins. *Braz. J. Plant Physiol.* 2005, V.17. P.65-78.
- 56.Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. GUS fusion: β - glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in plants. // *EMBO J.* - 1987 - v. 6 - p. 3901 - 3907.
- 57.Kaeppler H.F., Menon G.K., Skadsen R.W., Nuutila A.M., Carlson A.R. Transgenic Oat plants via visual selection of cells expressing green fluorescent protein. // *Plant Cell Reports* - 2000 - v. 19 - is. 7 - p. 661 - 666.
- 58.Kramer U., Cotter-Howells J.D., Charnock J.M., Baker A.J.M., Smith A.C. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature.* 1996, V.379. P.635-38.
- 59.Kuboi T., Noguchi A., Yazaki J. Family dependent cadmium accumulation characteristics in higher plants. // *Plant Soil.* - 1986 - v. 92 - p. 405 - 415.
- 60.Lefebvre D.D., Miki B.L., Laliberte J.F. Mammalian metallothionein functions in plants. // *Biotechnology* - 1987 - v.16 - p. 4743 - 4751.

61. Levesque H., Delepelaire P., Rauze P. et al. Common evolutionary origin of the central portions of the RiTL-DNA of the *A. rhizogenes* and the Ti-DNAs of *A. tumefaciens*. // *Plant Molecular Biology* - 1988 - v. 11 - p. 731-744.
62. Lorz H., Baker B., Schell J. Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. // *Mol. and Gen. Genet.* - 1985 - v. 199 - p. 178 - 182.
63. Lupotto E., Reali A., Passera S., Chan M.T. Maize elite inbred lines are susceptible to *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation. // *Maydica* - 1999 - v. 44 - is. 3 - p. 211 - 218.
64. Mahalingam R., Federoff N. Stress response, cell death and signaling: the many faces of reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum*. 2003, V.119. P.56-68.
65. Maiti T.B., Wagner G.J., Hunt A.G. Light inducible and tissue specific expression of a chimeric mouse metallothionein cDNA in tobacco. // *Plant Sci.* - 1991 - v. 76 - p. 99 - 107.
66. Maksymiec W, Baszynski T. The role of Ca²⁺ ions in modulating changes induced in bean plants by an excess of Cu²⁺ ions. Chlorophyll fluorescence measurements. *Physiol. Plant.* 1999, V. 105, P. 562-568.
67. Maksymiec W. Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica*, 1997, V. 34, P. 132 – 342.
68. Mäser P., Thomine S., Schroeder J.I., Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2001, V. 126. P.1646–1667.
69. Maslenkova L.T., Zanev Y., Popova L.P. Oxygen-evolving activity of thylakoids from barley plants cultivated on different concentration of jasmonic acid. *Plant Physiol.* 1990, V. 93, P. 1316-1320.
70. Misra S., Gedamu L. Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. and *Nicotiana tabacum* L. plants. // *Theor. and Appl. Genet.* - 1989 - v. 78 - p. 161 - 168.

71. Murphy A., Taiz L. Comparison of Metallothionein Gene Expression and Nonprotein Thiols in Ten Arabidopsis Ecotypes. *Plant Physiol.* 1995, V. 109. P. 945-954.
72. Ow D. W., Wood K.W., Luca M. et al. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. // *Science* - 1986 - v. 234 - p. 856 - 859.
73. Pätsikkä E., Aro E.-M., Tyystjärvi E. Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity in vivo. *Plant Physiol.* 1998, V. 117, P. 619-627.
74. Pätsikkä E., Kairavuo M., Sersen F., Aro E. M., Tyystjärvi E. Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. *Plant Physiol.* 2002, V. 129, P. 1359-1367.
75. Paulsen I.T., Saier Jr. M.H. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *Journal of Membrane Biology.* 1997, V. 156 P. 99–103.
76. Quartacci M.F., Pinzino C., Sgherri C.L.M., Dalla Vecchia F., Navari-Izzo F. Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. *Physiol. Plant.* 2000, V. 108, P. 87-93.
77. Rauser W.E. Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiology.* 1995, V.109. P.1141–1149.
78. Rauser W.E. Structure and function of metal chelators produced by plants - the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. *Cell Biochemistry and Biophysics.* 1999, V.31. P.19–48.
79. Raven J.A., Evans M., Korb R.E. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynth. Res.* 1999, V. 60, P. 111-149.
80. Rout G.R., Das P. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie* 2003, V.23, P. 3-11.

81. Salt D.E., Kramer U. Mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. In: Raskin I, Ensley B (eds) *Phytoremediation of Toxic Metals*. John Wiley and Sons Inc., New York, 2000, P.231-246.
82. Salt D.E., Rauser W.E. MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiology*. 1995, V.107. P.1293–1301.
83. Sancenón V., Puig S., Mira H., Thiele D., Peñarrubia L. Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 2003, V. 51, P. 577-587.
84. Schafer W., Gorz A., Kahl G. T-DNA integration and expression in a monocot crop plant after induction of agrobacterium. // *Nature* - 1987 - v. 327 - p. 529-532.
85. Schuetzenduebel A., Polle A. Plant Responses to Abiotic Stresses: Heavy Metal-Induced Oxidative Stress and Protection by Mycorrhization // *J.Exptl.Bot.* 2002, V.53.P.1351-1365.
86. Senecoff J.E., Merkle S.A., Meagher R.B. Manipulation of bacterial genes for mercury phytoremediation. // Abstr. “Plant Biology”, Annu. Meet. Amer. Soc. Plant Physiol. and Can. Soc. Plant Physiol. - Vancouver , 2 - 6 aug. - 1997 // *Plant Physiol.* - 1997 - v.114 - is. 3 - p. 308.
87. Shier W.T. Metals as toxins in plants, *J. Toxicol.-Toxin Rev.* 1994, V.13, P. 205-216.
88. Sresty T.V.S., Madhava Rao K.V. Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cells of pigeonpea. *Environ. Exp. Bot.* 1999, V.41. P.3-13.
89. Stachel S.E., Messens E., Montagu M.Van, Zambryski P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T - DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*. 1985, 318, 624 – 629.
90. Steffens J.C. The heavy metal-binding peptides of plants. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 1990, V.41. P.553-575.

91. Tempe J., Goldman A. Occurrence and biosynthesis of opines. // *Molec. Biol. Plant Tumours*. -1982 - New York: Acad. Press - p. 575 - 584.
92. Trindade L.M., Horváth B.M., Bergervoet M.J.E., Visser R.G.F. Isolation of a gene encoding a copper chaperone for copper/zinc superoxide dismutase and characterization of its promoter in potato. *Plant Physiol.*, 2003, V. 133, P. 618-629.
93. Tripathy B.C., Mohanty P. Zinc inhibited electron transport of photosynthesis isolated barley chloroplasts, *Plant Physiol.* 1980, V.66. P.1174-1178.
94. Ueda J., Shimazu Y., Ozawa T. Oxidative damage induced by Cu(II)-oligopeptide complexes and hydrogen peroxide. *Biochem. mol. Biol. int.* 1994, V.34, P. 801 – 808.
95. Upadhyaya N.M., Surin B., Ramm K., Gaudron J., Schunmann P.H., Taylor W., Waterhouse P.M., Wang M.B. *Agrobacterium* - mediated transformation of Australian rice cultivars Jarrah and Amaroo using modified promoters and selectable markers. // *Australian Journal of Plant Physiology* - 2000 - v. 27 - is. 3 - p. 201 - 210.
96. Van der Zaal B.J., Neuteboom L.W., Pinas J.E., Chardonens A.N., Schat H., Verkleij J.A.C., Hooykaas P.J.J. Over-expression of a novel Arabidopsis gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiology*. 1999, V. 119. P.1047–1055.
97. Van Larebeke N., Engler G., Holsters M. et al. Large plasmid in *A. tumefaciens* essential for crown gall - inducing ability. // *Nature* - 1974 - v. 252 - p. 169-170.
98. Yruela I. Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 2005, V.17, P. 145-156
99. Yusibov V., Steck T., Gupta V. et al. Transfer of T-DNA from *A. tumefaciens* and targeting to the nucleus of tobacco cells. // *Abstracts 4th Intern. Congress of Plant Molecular Biology Amsterdam, June 19-24 - 1994 - N 1669.*

ПРИЛОЖЕНИЯ

Выделение тотальной ДНК из растительной ткани

1. Навеску растительного материала (0,12 г) растирали в жидком азоте до состояния белого порошка в фарфоровой ступке.

2. Переносили в пластиковую пробирку (1,5 мл), заливали 0,5 мл буфера и ресуспендировали с помощью стеклянного пестика до гомогенного состояния.

Состав буфера для гомогенизации:

Компоненты буфера	Исходная концентрация	Доля компонента от конечного объема буфера	Мл компонента / 10 мл буфера
50 mM Трис-НСl буфер (рН 7,5)	1 М	1/20	0,5
150 mM NaCl	4 М	1/26,6	0,376
10 mM ЭДТА	0,2 М	1/20	0,5
2% SDS	10%	1/5	2
2% Sarcosyl	35%	1/17,5	0,571
вода			6,052

3. Центрифугировали при 10 000 об/мин на микроцентрифуге в течение 5 мин.

4. Супернатант переносили в чистую пластиковую пробирку (1,5 мл) и добавляли равный объем смеси фенол/хлороформ (1:1).

5. Перемешивали на вортексе в течение 3-х минут и центрифугировали при 12 тыс. об./мин. 3 минуты.

6. Затем осторожно, чтобы не захватить белок, скопившийся в интерфазе, отбирали верхнюю водную фракцию и переносили в чистую пластиковую пробирку (1,5 мл). Операцию обработки фенол-хлороформом проводили до исчезновения белка в интерфазе (~ 2 - 3 раза).

7. Далее проводили аналогичную обработку равным объемом хлороформа для экстракции остатков фенола (1 раз).

8. Обработка РНКазой: (после стадии 7 для более качественного выделения ДНК добавляли стадию избавления от РНК)

9. А. Добавляли 3 мкл РНКазы и инкубировали на воздушной бане (Biosom) при 37 °С в течение 45 минут

10. Б. После этого повторяли обработку фенол/хлороформом, а затем и хлороформом. Далее продолжали со стадии 8.

11. ДНК из водной фазы осаждали добавлением 3М ацетата натрия рН 5.5 (1/10 часть от общего V) и равным объемом изопропилового спирта.

12. Выдерживали на холоде (40С) в течение 30 мин.

13. Центрифугировали при 10 000 об/мин на микроцентрифуге в течение 2мин.

14. Осадок ДНК промывали 80% этиловый спиртом и сушили в термостате при 370С до исчезновения запаха спирта.

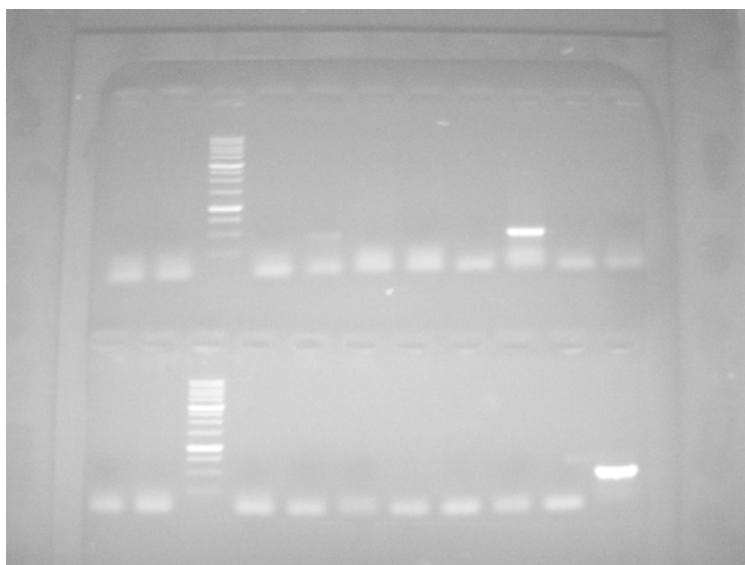
15. Растворяли в 70 мкл H₂O или TE буфера. Полученную пробу ДНК после оценки концентрации на электрофореze использовали для ПЦР-анализа.

Состав реакционной смеси для проведения ПЦР
(на пробу объемом 20 мкл):

ДНК	1,0 мкл
Taq – буфер	2,0 мкл
d NTP	2,0 мкл
Прямой праймер (15 пикоМ/мкл)	0,8 мкл
Обратный праймер (15 пикоМ/мкл)	0,8 мкл
Taq – полимераза	0,6 мкл
Вода (дистиллированная, автоклавирован.)	12,8 мкл

Гель-электрофорез

Приготовление геля: 40 мл ТАЕ (трицетилацетатный буфер) + агароза (40 мг) – 1% гель – кипятили до образования прозрачной однородной жидкости, остужали и добавляли 8 мкл EtBr (бромисторого этидия). Затем гель заливался в форежную плашку и застывал с установленными гребенками.



После застывания гель заливался ТАЕ и затем вынимались гребенки. В полученные слоты наносились заранее подготовленные пробы ДНК с красителем, а также контроль и маркер (5 мкл ДНК+8 мкл красителя + 2 мкл H₂O (общий объем доводился до 15 мкл).

Прибор подключается к сети таким образом, чтобы направление движения молекул ДНК в геле под действием силы тока было правильным (движении идет от «-» к «+»).

В свете УФ-лампы можно увидеть, на какое расстоянии в геле ушла ДНК, сравнить его у исследуемых проб и положительного контроля. Маркер покажет, какого размера полученный фрагмент ДНК.

Среды для трансформации и получения эксплантов

Среда S – для семян на 1 л среды

Макросоли 50 мл

Микросоли 1 мл

Сахароза 10 г

Агар-порошок 14 г

Среда В – для трансформации агробактерий и агробактериального газона

Макросоли 50 мл

Микросоли 1 мл

CaCl₂ 20% 3,3 мл

Fe-хелат 5 мл

Витамины 100 мкл

Сахароза 30 г

2,4-D 25 мкл

кинетин 250 мкл

НУК 250 мкл

Агар чешуйчатый 5 г.

Среда D – для регенерации и каллусообразования

Макросоли	50 мл
Микросоли	1 мл
CaCl ₂ 20%	3,3 мл
Fe-хелат	5 мл
Инозит	100 мг
Витамины	100 мкл
Сахароза	10 г
БАП, НУК	см. ниже
Агар чешуйчатый	5 г

При приготовлении среды D изменяем концентрацию:

D 4/2 = 4 мг/л НУК + 2 мг/л БАП

D 8/1 = 8 мг/л НУК + 1 мг/л БАП

D 4/0 = 4 мг/л НУК + 0 мг/л БАП