

5. Goto, K., Omura, T., Hara, Y. and Sadaie, Y. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus* // *J. Gen. Appl. Microbiol.*— 2000.— Vol.46.— P. 1–8.

6. Logan N. A. and Berkeley R. C. W. Identification of *Bacillus* strains using the API System // *Journal of General Microbiology.*— 1984.— Vol.130.— P. 1871–1882.

7. Neve G., Meglecz E. Microsatellite frequencies in different taxa // *Trends Ecol. Evol.*— 2000.— Vol.15, N9.— P. 3761.

8. Rossetti L., Giraffa G. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases // *Journal of Microbiological Methods.*— 2005.— Vol.63.— P. 135–144.

9. Giraffa G., Rossetti L., Neviani E. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria // *Journal of Microbiological Methods.*— 2000.— Vol.42.— P. 175–184.

Резюме

У роботі наведено результати фізіолого-біохімічного і генетичного аналізу пробіотичних штамів *B. subtilis* УКМ В-5139 та УКМ В-5140. Виявлено відмінності між штамми у засвоєнні різних джерел живлення, а також у спектрах продуктів ампліфікації з праймерами до мікросателітних послідовностей. Показано, що використані маркери можна застосовувати для диференціації штамів *B. subtilis*.

В работе представлены результаты физиолого-биохимического и генетического анализа пробиотических штаммов *B. subtilis* УКМ В-5139 и УКМ В-5140. Выявлены отличия между штаммами в усвоении широкого ряда источников питания, а также в спектрах продуктов амплификации с праймерами к микросателлитным последовательностям. Показано, что использованные маркеры возможно применять для дифференциации штаммов *B. subtilis*.

Results of physiology-biochemical and genetic analysis of *B. subtilis* probiotic strains UCM В-5139 and UCM В-5140 have been performed in the research. Some differences between the strains in the utilization of a wide range of nutrient sources as well as in the pattern of products of amplification with primers to microsatellite sequences have been detected. It has been shown the markers revealed in the research could be used to differentiate *B. subtilis* strains.

КОЛОДЯЖНАЯ Я.С.

Universite Libre de Bruxelles, Bd. du Triomphe, CP242, Bruxelles, 1050, Belgique
e-mail: jsk@ngs.ru

Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090. Новосибирск,
пр. Лаврентьева, 10

СТРАТЕГИИ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ТОКСИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Как известно, почвы в силу антропогенного влияния загрязнены тяжелыми металлами (ТМ), в число которых входят ртуть, кадмий, свинец, цинк, медь и некоторые другие. Попадая различными путями в атмосферу и почву,

эти металлы поступают сначала в растения, а затем с пищей могут попасть в организм человека или животных.

Существует класс растений, называемых гипераккумуляторами, которые способны абсорбировать и накапливать довольно значительные количества ТМ без видимого токсического проявления. На сегодняшний день насчитывают порядка 400 видов таких растений, способных накапливать цинк, кадмий, кобальт, медь, марганец или никель. В семействе *Brassicaceae* к таким видам относятся *Thlaspi caerulescens* и *Arabidopsis halleri* (Assunção et al., 2003; Bert et al., 2000, Bert et al., 2003). Генетическое родство с *Arabidopsis thaliana* (около 88% гомологии на уровне кодирующих последовательностей) делает эти виды модельными при изучении феномена гипераккумуляции, что особенно важно, поскольку механизмы устойчивости растений к ТМ до сих пор мало изучены. Один из механизмов защиты на уровне цитозоля — транспорт ТМ в вакуоль или апопласт. Предполагают, в частности, что пример таких транспортеров — семейство САХ (Cation Exchangers), которые, по-видимому, редуцируют транспорт в наземную часть растения. Белки семейства САХ имеют длину около 400 аминокислотных остатков (Cai and Lytton, 2004; Shigaki and Hirschi, 2006). На данный момент описано 11 представителей транспортеров этого типа; лучше всех охарактеризованы представители *CAX1*, *CAX2*, *CAX3*, *et CAX4*. Два других члена семейства — *CAX2* и *CAX8* — рассматриваются как потенциальные кандидаты, определяющие устойчивость и накопление ТМ у *A. halleri*. (Becher et al., 2004; Craciun et al., 2006).

Другая стратегия, которая приводит к увеличению устойчивости — хелатирование металлов. Например, в этот процесс вовлечены металлотионеины (МТ) — низкомолекулярные белки, обогащенные цистеином и способные связывать двухвалентные металлы. У растений идентифицировано по крайней мере четыре типа МТ, отличающихся по числу и положению доменов, обогащенных цистеином.

Материалы и методы

В работе использовали растения арабидопсиса *Arabidopsis halleri* и ярутки *Thlaspi caerulescens*

1. Для переноса ДНК использовали вектора *pK7GWIWG2D(II)*. Методами Gateway клонирования созданы конструкции, в результате экспрессии которых должно произойти снижение экспрессии гена, отвечающего за экспрессию металлотионеинов третьего типа (МТ3) — RNAi стратегия.

Поскольку на данный момент не обнаружено растений нокаутов по гену *MT3*, то в ходе работы планировали получить и проанализировать генетически модифицированные растения, у которых экспрессия гена, отвечающего за синтез металлотионеинов, снижена.

Для изучения функции гена *CAX* предполагается получить растения с пониженным и повышенным уровнями экспрессии.

2. Для агробактериальной трансформации были использованы штаммы C58, ЕНА105, Ag10, Ag11.

3. Методика трансформации корневых и листовых эксплантов арабидопсиса *Arabidopsis halleri* и ярутки *Thlaspi caerulescens*

а) *Среды для получения регенерантов из корневых эксплантов*

Среда для индуцирования каллусообразования (K1): среда MS с добавлением 1 мг/л 2,4-D, 0,5 мг/л кинетина, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агар.

Среда для индуцирования процесса регенерации (P1): среда MS с добавлением 1,0 мг/л БАП, 0,5 мг/л НУК, 1,0 мг/л гиббереллиновой кислоты, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара.

Экспланты за 10 дней до трансформации помещаются на среду K1 и оставляются в темноте. После культивирования с агробактерией экспланты переносят на среду P1, содержащие антибиотики, подавляющие рост агробактерии.

б) *Среды для получения регенерантов из листовых эксплантов*

На среде MS с добавлением 2 мг/л кинетина, 2 мг/л БАП + 1 мг/л НУК, 30 г/л сахарозы, 7 г/л агара, экспланты культивируют в течение 7–10 дней. После культивирования с агробактерией экспланты переносят на аналогичную среду с добавлением антибиотика, подавляющего рост агробактерии.

Антибиотики, являющиеся селективными и предназначенные для отбора трансформантов, добавляются через 2–3 недели после трансформации, чтобы уменьшить их отрицательное воздействие на процесс регенерации.

Результаты и обсуждение

Как известно, процесс трансформации растений очень тонкий и капризный, зависящий от множества факторов: генотипа, температуры, влажности, продолжительности светового дня и пр. В настоящее время опубликовано только одна работа, посвященная трансформации корневых эксплантов *Arabidopsis halleri* (Hanikenne et al., 2008), и нет публикаций о генетически модифицированных растениях *Thlaspi caerulescens*.

В результате работы было проанализировано влияние агробактериальных штаммов на процесс регенерации у *Arabidopsis halleri*. Отмечено, что



Рис. 1. Окрашивание сосудистых тканей вследствие экспрессии GUS

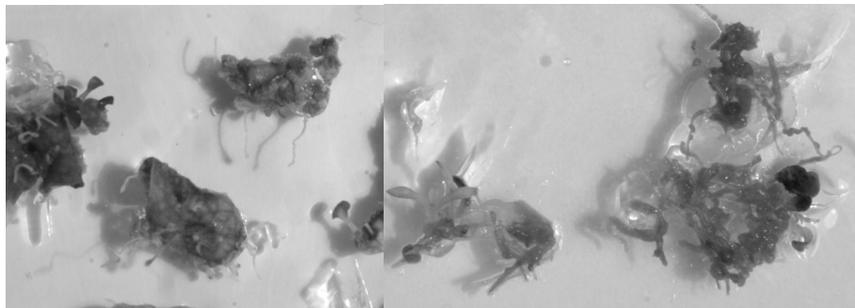


Рис. 2. Регенерация из листовых и корневых эксплантов

большее количество регенерантов получено при трансформации штаммами C58 и AgI1. Причем трансформанты были получены как из корневых, так и из листовых эксплантов. С целью визуализации процесса изначально использовали агробактерии, несущие “пустую” плазмиду с репортерным геном, позволяющим оценить наличие встройки методом GUS окрашивания.

Попытки получить регенеранты из листовых эксплантов были до сих пор неудачны. Нами впервые была разработана такая методика получения не только регенерантов, но и трансформантов.

В ближайшее время планируется детальное изучение растений регенерантов, у которых снижена экспрессия целевого гена МТЗ.

Перспективы

Изучение процессов, регулирующих концентрации тяжелых металлов у растений, важно не только для понимания фундаментальных явлений, но и для практического применения. Например, увеличив накопление токсичных металлов в наземной части растений, можно очищать почвы. А также можно создавать растения, способные расти на загрязненных почвах.

Литература

- 1 Assunção, A.G.L., Schat, H., Aarts, M.G.M. (2003). *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants // *New Phytol* **159**, P. 351–360.
2. Becher M, Talke I, Krall L, Krømer U (2004) Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *The Plant Journal*, 37: 251-268.
3. Bert V, Macnair M.R., de Laguerie P., Soumitou-Laprade P. and Petit D. (2000) Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New Phytologist*, 146: 225–233.
4. Bert V, Meerts P., Saumitou-Laprade P., Salis P., Gruber W. and Verbruggen N. (2003) Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. *Plant and soil*, 249: 9–18.
5. Cai X. and Lytton J. The Cation/Ca²⁺ Exchanger Superfamily: Phylogenetic Analysis and Structural Implications. 2004. *Mol. Biol. Evol.* 21(9): 1692–1703.

6. Craciun A.R., Courbot M., Bourgis F., Salis P., Saumitou-Laprade P. and Verbruggen N. Comparative cDNA-AFLP analysis of Cd-tolerant and sensitive genotypes derived from crosses between the Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis lyrata* ssp. *petraea*. *Journal of Experimental Botany*, 2006 57(12): 2967–83.

7. Hanikenne M., Talke I.N., Haydon M.J., Lanz C., Nolte A., Motte P., Kroymann J., Weigel D. Krömer U. *Nature*. 2008. 453: 391–395

8. Shigaki T. and Hirschi K.D. (2006) Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H⁺ exchangers in plants. *Plant Biol (Stuttg)*, 8(4): 419-29.

**КОМИСАРЕНКО А.Г.,¹ МИХАЛЬСКАЯ С.И.,¹ МОРГУН Б.В.,^{1,2}
МУЖАНОВСКАЯ О.В.,² КОЧЕТОВ А.В.,³ ТИЩЕНКО Е.Н.¹**

¹Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: oltyko@gmail.com

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 148

³Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ *AGROBACTERIUM*- ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Прогресс в генетическом улучшении линий и гибридов подсолнечника методологией *Agrobacterium*-опосредованной трансформации сдерживается низкой эффективностью интродукции рекомбинантных молекул ДНК в клетки, способные к реализации морфогенетического потенциала. На сегодняшний день проанализирована восприимчивость к агробактериальной инфекции ряда эксплантов подсолнечника и для определённых генотипов предложены протоколы трансформации [1–4].

Нами разработан способ индукции регенерации из сегмента побега 3–4-суточных проростков линий и гибридов отечественной селекции подсолнечника, где в отличие от проанализированных на сегодняшний день частей проростка использован сегмент, состоящий из нижней половины семядоли с расщепленной верхней частью гипокотила размером 1–2 мм [5]. Этот эксплант может быть удобным объектом для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, поскольку индукция побегообразования происходит путём прямого органогенеза через короткий период времени (5–7 дней). Однако первоначальные исследования показали низкую эффективность интродукции Т-ДНК в геном подсолнечника одновременно с существенным падением частоты регенерации. В связи с этим целесообразно было проводить поиск факторов, которые положительно влияют на оба эти процесса. Для повышения устойчивости растений подсолнечника к абиотическим стрессорам