

- М. Я. Єфіменко [та ін.] // Вісн. Сумського нац. аграр. ун-ту. – 2002. – Вип. 6. – С. 3–12.
5. Сураєва Н. М. Оптимальные приемы капацитации спермы быков для оплодотворения яйцеклеток / Н. М. Сураєва, А. З. Кесян, М. И. Прокофьев // Вестник акад. с.-х. наук. – 1993. – № 4. – С. 49–50.
 6. Prather R. S. Nuclear transplanted as a method for cloning embryos / R. S. Prather // Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. – 1990. – № 195, 1. – P. 7–12.
 7. Production of chimaeric mice derived from embryonic stem cells with the neomycin phosphotransferase gene introduced by electroporation / T. Tokunaga, T. Furasawa, M. Okazaki [et al.] // J. Reprod. Devel. – 1992. – № 38, 5. – P. 27–32.
 8. Trish B. Modification of the zona – free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with *in vivo* fertility / B. Trish, P. Kent // Gamete Res. – 1989. – № 22, 4. – P. 385–397.
 9. Харенко М. І. Біотехнологія розмноження свиней / М. І. Харенко, М. В. Черненко. – К. : „Ветінформ”, 1996. – 216 с.
 10. Assesment of bull sperm fertilizing ability / H. Rodriguez–Martinez, B. Larsson, B. R. Zhang [et al.] // Reprod. Dom. Anim. – 1996. – № 31. – P. 515–517.
 11. Кузнєцов В.С. Біотехнологія у тваринництві // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть / ред. кол. : В. В. Моргун (гол. ред.) [та ін.]. – К. : Логос, 2001. – Т. 4. – С. 31–57.
 12. Penetration by bull spermatozoa into the zone pellucida of dead bovine oocytes recovered from frozen – thawed ovaries / H. Tatemoto, T. Horiuchi, T. Maeda [et al.] // Theriogenology. – 1994. – № 42. – P. 465–474.

Резюме

Обсуждается эффективность использования метода получения *in vitro* эмбрионов крупного рогатого скота для достоверной оценки оплодотворяющей способности гамет быков-производителей, сперма коротых используется для сохранения генофонда

It is discussed effects of using method production bovine embryo *in vitro* for reliable evaluation of impregnating ability bull spermatozoa, which semen gene poll preservation

КОЛОДЯЖНАЯ Я.С.

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

Université Libre de Bruxelles, Bd. du Triomphe, CP242, Bruxelles, 1050, Belgique

e-mail: jsk@ngs.ru

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ В ОБЕСПЕЧЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ К ТОКСИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

В связи с антропогенным воздействием возрастает загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами, в число которых входят ртуть, кадмий, свинец, цинк, медь и некоторые другие. Благодаря наличию механизмов устойчивости, действующих на разных уровнях организации, некоторые виды растений способны расти и развиваться без серьезных нарушений физиологических процессов в присутствии довольно высоких концентраций металлов в окружающей среде. В настоящее время идентифицировано свыше 450 видов растений в 34 семействах (0,2 % составляют покрытосемянные растения), способных накапливать такие металлы как цинк, никель, марганец, медь, кобальт, кадмий (Verbruggen, 2009). При этом большинство из них аккумулируют именно никель. В частности, существуют такие гипераккумуляторы

тяжелых металлов как арабидорсис *Arabidopsis halleri* и ярутка *Thlaspi caerulescens*, принадлежащих к родам *Brassicaceae*. *Thlaspi caerulescens* является уникальным видом, поскольку никакому другому виду растений не свойственна устойчивость к кадмию, который является одним из самых токсичных в ряду тяжелых металлов.

Важную роль в детоксикации некоторых тяжелых металлов (особенно меди) играют такие белки как металлотионеины, которые обладают высокой гомологией к аналогичным белкам у животных. Однако есть и существенные различия в расположении остатков цистеина. Установлено, что они имеют низкую молекулярную массу (до 10 кД), высокое содержание цистеина (около 30%), их синтез индуцируется ионами Cd, Zn, Cu, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Pb. Такие элементы, как Ca, Al, Na, Mg, не индуцируют образования металлотионеинов.

У растений идентифицировано по крайней мере четыре типа МТ, отличающихся по числу и положению доменов, обогащенных цистеином. Данная работа связана с изучением роли МТ третьей группы. Цель работы — детальное исследование роли металлотионеинов (МТ), в частности AtMT3 и TcMT3, обнаруженных у арабидопсиса и ярутки. Поскольку на данный момент не обнаружено растений нокаутов по гену МТ3, то в ходе работы планируется получить и проанализировать генетически модифицированные растения, у которых экспрессия гена, отвечающего за синтез металлотионеинов, снижена.

Материалы и методы

В работе использовали ГМ растения табака *Nicotiana glauca*, арабидопсиса *Arabidopsis halleri* и ярутки *Thlaspi caerulescens*

1. Для переноса ДНК использовали вектора *pGiBIN-19*, *pK7GWIWG2D(II)*. Методами Gateway клонирования созданы конструкции, в результате экспрессии которых должно произойти снижение экспрессии гена МТ3 (RNAi стратегия).

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

Среды для получения регенерантов из корневых эксплантов

CIM1: среда MS с добавлением 1 мг/л 2,4-D, 0.5 мг/л кинетина, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара. (Hanikenne, 2008)

CIM2: среда MS с добавлением 0,5 мг/л 2,4-D, 0.05 мг/л кинетина, 30 г/л сахарозы, 7 г/л агара. (Valvekens, 1988)

SIM1: среда MS с добавлением 1,0 мг/л БАП, 0.5 мг/л НУК, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара.

SIM2: среда MS с добавлением 5 мг/л 2-iP, 0.1 мг/л ИУК, 30 г/л сахарозы, 7 г/л агара.

Экспланты за неделю до трансформации помещаются на среды CIM и оставляются в темноте. После трансформации экспланты переносят на среды SIM, содержащие антибиотики, подавляющие 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.

Среды для получения регенерантов из листовых эксплантов

среда MS с добавлением 1 мг/л 2,4-D, 0.05 мг/л БАП, 100 мг/л инозитола. 10 мг/л тиамин гидрохлорида, 1 мг/л никотиновой кислоты, 30 г/л сахарозы, 7 г/л агара. (Vera-Estrella, 2009)

3. Анализ ГМ растений табака, экспрессирующих ген МТ3.

Устойчивость к воздействию тяжелых металлов исследовалась при выращивании в течение двух недель растений в возрасте 2 месяцев в гидропонной культуре на среде Hoegland с добавлением 10μM CdSO₄. Раствор менялся через неделю. Оценка проведена по результатам изменения массы (сухого веса и биомассы).

Оценка скорости накопления кадмия растениями была проведена при использовании ¹⁰⁹Cd.

Результаты

Трансгенные растения табака, несущие ген МТЗ, показали повышенную устойчивость к такому токсическому воздействию, как присутствие ионов кадмия. По сравнению с контрольными растениями, у ГМ растений отмечены более низкая скорость накопления кадмия. Темпы роста также были выше. Последующие эксперименты по исследованию растений, было решено проводить, используя стратегию замолкания целевого гена.

Корневые экспланты арабидопсиса *Arabidopsis halleri* и ярутки *Thlaspi caerulescens* помещали для прекультивирования на неделю на среды СИМ I и СИМ II. После чего экспланты кокультивировали с агробактерией в течение 4-5 дней, а затем переносили на среду СИМ I и СИМ II, соответственно. Для подавления роста агробактерии добавляли натриевую соль тикарциллина, которая, как показали эксперименты, не подавляет процесс регенерации, в отличие от цефотаксима.

Обнаружено, что на среде СИМ I (рис. 1б) процесс каллусообразования и регенерации идет лучше, чем на СИМ II (рис. 1а).

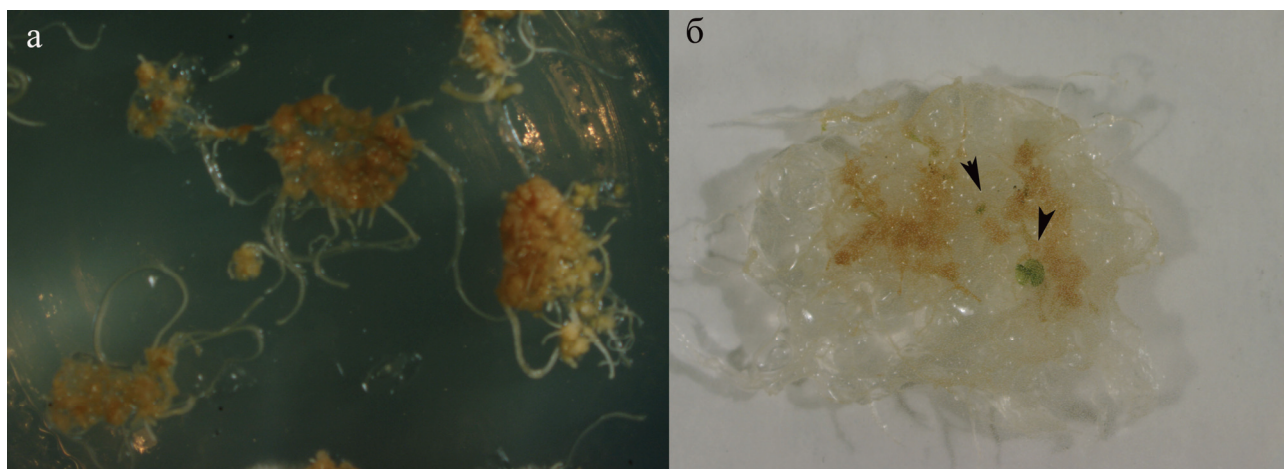


Рис. 1. Каллусообразование и регенерация растений арабидопсиса *A. Halleri*. Стрелками указаны регенеранты.

Также было отмечено, что растения *Thlaspi caerulescens*, произрастающие в различных регионах, имеют разные типы каллусов: растения, выращенные из семян, собранных в регионе Прауон (Франция), формируют более плотный каллус белого цвета, из которого редко формируются растения регенеранты. В то время как экспланты, полученные от растений, произраставших в районе St. Felix (Франция) образуют более рыхлый эмбриогенный каллус зеленого цвета (рис. 2б).

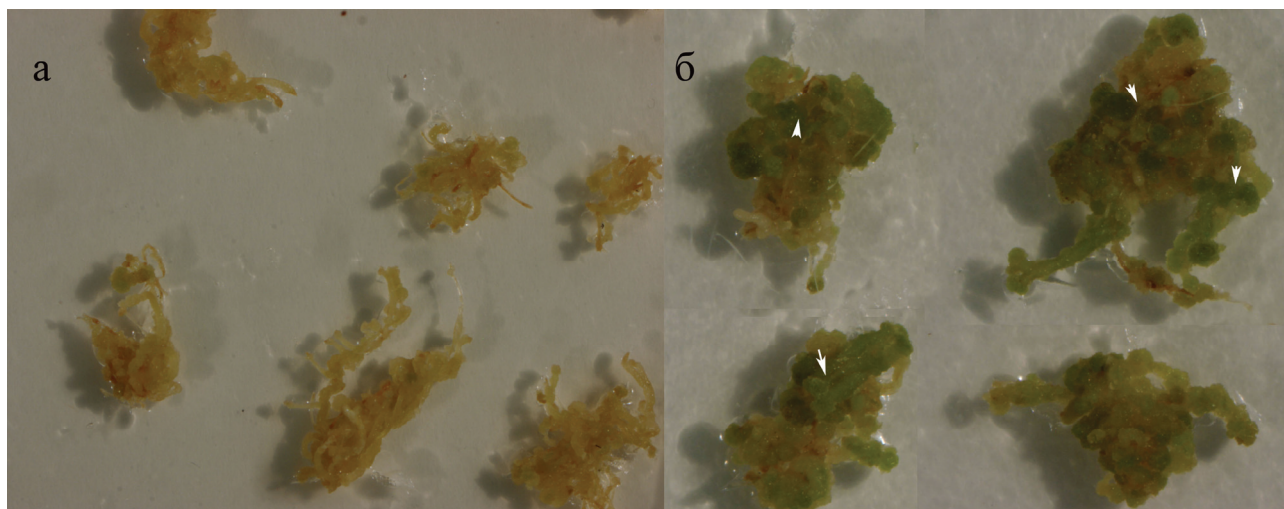


Рис. 2. Каллусообразование и регенерация растений ярутки *Thlaspi caerulescens*,

произрастающих в регионах Prayon (а) и St.Felix (б).

Попытки получить регенеранты из листовых эксплантов были до сих пор неудачны. Большая часть эксплантов гибнет в течение первых двух недель. Каллусы, которые формируются у оставшихся эксплантов, не способны к дальнейшему росту и развитию.

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. Hanikenne M, Talke IN, Haydon MJ, Lanz C, Nolte A, Motte P, Kroymann J, Weigel D, Krämer U. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4 // Nature. 2008. V. 15. P.391-405
2. Valvekens D, Montagu MV, Lijsebettens MV. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana root explants by using kanamycin selection. // Proc Natl Acad Sci U S A. 1988. V. 85(15). P. 5536-5540.
3. Vera-Estrella R. , Miranda-Vergara M. C., Barkla B. J.. Zinc tolerance and accumulation in stable cell suspension cultures and in vitro regenerated plants of the emerging model plant *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae) // Planta. 2009. V. 229. P. 977–986
4. Verbruggen N., Hermans C. and Schat H.. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants // *New Phytologist* (2009) V. 181. P.759–776

КОМАХИН Р.А., КОМАХИНА В.В., МИЛЮКОВА Н.А., ТРАЧУК Л.А., ЖУЧЕНКО А.А.*

ГНУ ВНИИ Сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН,

Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д.42, e-mail: recombination@iab.ac.ru

*Российская академия сельскохозяйственных наук,

Россия, 117218, г. Москва, ГСП-7, г. Москва, ул. Кржижановского, дом 15, корпус 2.,

e-mail: plant@pochta.ru

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕЙОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *NLS-recA-licBM3*

Рекомбинация – фундаментальный процесс, который наравне с репликацией и репарацией, необходим для метаболизма ДНК у про- и эукариот. В клетках существуют несколько ферментативных систем обеспечивающих различные пути рекомбинации ДНК. Одним из них является гомологичная генетическая рекомбинация (ГР), механизм функционирования которой основан на репарации двунитевых разрывов ДНК с использованием в качестве матрицы гомологичной молекулы ДНК. У прокариот и в соматических клетках эукариот ГР необходима для нормальной репликации и перезапуска поврежденных репликативных вилок (Сох, 2001).

В мейозе у эукариот ферменты ГР, интегрированные в структуры синаптонемного комплекса в виде рекомбинационных узелков, необходимы для правильной сегрегации хромосом и создания новых гаплотипов (Grelon et al., 2001; Богданов, Коломиец, 2007). Наряду с кроссинговером мейотическая рекомбинация