

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА ТРАНСГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ

Е.А. Андреева, Л.А. Лутова

Кафедра генетики и селекции
Санкт-Петербургского государственного университета

☼ Методом агробактериальной трансформации получена коллекция *ipt*-трансгенных растений на основе сорта картофеля Адретта. Опосредованный анализ экспрессии бактериального гена синтеза цитокининов *ipt* в растениях на чувствительность к экзогенным ауксину (ИУК) и цитокинину (кинетину) выявил измененную реакцию у 18 из 22 исследованных форм. Среди 18 растений, с измененной реакцией на фитогормоны, 16 форм проявили повышенную устойчивость к сульфату меди и/или хлориду никеля.

☼ Ключевые слова: *ipt*, картофель, цитокинины, тяжелые металлы.

УСТОЙЧИВОСТЬ К СОЛЯМ МЕДИ И НИКЕЛЯ У *ipt*-ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ

ВВЕДЕНИЕ

Фитогормоны оказывают влияние практически на все процессы, происходящие в растении [1], в частности, на устойчивость растений к абиотическим факторам среды — тяжелым металлам [2]. Больше внимание уделяют изучению влияния на данные процессы гормонов стресса — этилену и жасмоновой кислоте [2]. Меньше известно об участии цитокининов в развитии защитных реакций к абиотическим стрессам.

Многие из тяжелых металлов, в частности медь и никель, необходимы для жизнедеятельности растений, однако их высокие концентрации токсичны [2, 3]. Негативное действие на растения связано с окислительным стрессом: внутриклеточные свободные ионы металлов могут вступать в реакцию с молекулами воды, в результате чего образуются свободные радикалы, которые, в свою очередь, взаимодействуют с липидами мембран, вызывая их окисление [4]; нарушают фосфатные связи в нуклеиновых кислотах [5]; индуцируют денатурацию белков [6]. Кроме того, катионы тяжелых металлов могут замещать ионы металлов, входящие в состав макромолекул, нарушая функционирование последних [7].

Стратегия устойчивости растений к тяжелым металлам включает в себя либо механизмы, позволяющие воспрепятствовать проникновению ионов к сайтам-мишеням, либо реакции устойчивости к ионам, проникшим внутрь клетки [8]. Так, в геноме *Arabidopsis thaliana* идентифицировано большое количество последовательностей, кодирующих белки-транспортеры, обладающие узкой специфичностью по отношению к связываемым ионам металлов [9]. К основным защитным механизмам относят активацию синтеза низкомолекулярных веществ (фитохелатинов и металлотионинов), функции которых заключаются в связывании ионов металлов внутри клетки, тем самым препятствуя вступлению ионов в химические реакции; еще одной возможной функцией является транспорт связанных ионов [2, 8]. Кроме того, низкомолекулярные органические молекулы, органические кислоты, аминокислоты и их производные, экскретируемые в ризосферу растения, связывают ионы металлов, предотвращая их поглощение клетками корня [2, 9].

По-видимому, существует сложная система регуляции экспрессии генов, обеспечивающих устойчивость растений к металлам, однако к настоящему времени известны лишь отдельные ее компоненты. Практически неизученным является вопрос участия в активации этих реакций фитогормонов, особенно цитокининов. Имеются лишь отрывочные сведения, свидетельствующие о возможности такой регуляции. Так, синтез белка ABC-транспортера, участвующего в транспорте металлов в растениях риса (ген *Ospdr9*), индуцируется металлами

(кадмий и цинк), жасмоновой кислотой, ауксином (α -нафтилуксусной кислотой) и цитокининами (бензиламинопурином) [10]; экспрессия гена, контролирующего синтез фермента глутатион-S-трансферазы у риса (гены *Osgstu3* и *Osgtu4*), участвующего в развитии окислительного стресса, также активизируется металлами (кадмий и цинк), НУК и жасмоновой кислотой [11].

Однако в работе Noth и соавт. [12] среди 1,5 тысяч генов, экспрессия которых изменяется в течение 24 часов с момента индукции бактериального гена синтеза цитокининов *ipt* в трансгенном растении арабидопсиса, не были выявлены гены, непосредственно связанные с устойчивостью к металлам. Учитывая достаточно слабую изученность генетического контроля такой устойчивости, представляется возможным, что гормонрегулируемые гены будут обнаружены среди открытых рамок считывания с не идентифицированными к настоящему моменту функциями.

Изучение влияния фитогормона на физиологические процессы возможно на растениях с измененным эндогенным уровнем данного гормона. Трансгенные растения, содержащие ген синтеза цитокининов *Agrobacterium tumefaciens* — *ipt* (ответственен за синтез фермента изопентенилтрансферазы), имеют повышенный уровень цитокининов в тканях [13].

Картофель — важная сельскохозяйственная культура, выращивается повсеместно, в том числе на почвах, загрязненных тяжелыми металлами. Поэтому представляется интересным исследование зависимости устойчивости растений картофеля к солям тяжелых металлов от уровня цитокининов. В данной работе анализируется устойчивость к никелю и меди. Изучаемая система «трансгенные *ipt*-растения картофеля — тяжелые металлы» может быть использована в исследованиях по экологической генетике для изучения физиологических и генетических основ устойчивости растений к абиотическим факторам среды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе был использован сорт культурного картофеля Адретта, характеризующийся восприимчивостью к фитофторозу. В экспериментах по трансформации использовали асептические растения, выращенные в культуре *in vitro* и агробактериальные штаммы с плазмидами pGV3850 Tr4 и pGV3850 Km^R (контрольная) (любезно предоставлены д-ром Онджеем, Институт молекулярной биологии растений, Чешске Будейовице, Чехия) [13]. В состав плазмиды pGV3850 Tr4 входят гены *ipt* под контролем промотора 35S и маркерный ген *nptIII* под контролем промотора *nos* (нопалинсинтазы), плазмиды pGV3850 Km^R — маркерный ген *nptIII*.

В работе использовали методы трансформации междоузлий асептических растений, нанося бактериальную суспензию на раневую поверхность эксплантов [14]. Для регенерации побегов экспланты, трансформированные плазмидой с геном *ipt*, культивировали на среде Мурасиге-Скуга (МСО): с антибиотиками клафораном (500 мг/л) для подавления роста бактерий и канамицином (100 мг/л) для селекции трансформированных клеток [15]; трансформированные штаммом без гена *ipt* — на среде с фитогормонами — 0,1 мг/л ИУК, 1 мг/л зеатинном [16], а также клафораном и канамицином. Из регенерированных растений выделяли тотальную ДНК (СТАВ-метод) и проводили ПЦР [15]. В работе использовали праймеры к гену *nptII*, сконструированные на основе нуклеотидной последовательности, приведенной в компьютерной базе данных NCBI [17]. Последовательности праймеров к гену *nptIII*: F) GTCGTCTGGTCCGGTCATTTCC, R) GTGATCTCACSTTGCTCCTGCC.

Программа для амплификации:

1 цикл: 5 минут — 94°C; 5 минут — 68°C; 5 минут — 72°C;

2 цикл (34 повторности): 30 секунд — 94°C; 30 секунд — 68°C; 40 секунд — 72°C;

3 цикл: 5 минут — 72°C.

Анализ экспрессии гена *ipt* в трансгенных растениях проводили опосредованно, изучая реакцию эксплантов на добавление в культуральную среду экзогенного цитокинина (кинетина) и ауксина (ИУК). Экспланты (узлы с пазушными почками) растений картофеля исходного сорта были высажены на среду МСО с добавлением кинетина в концентрации 5 мг/л. Контроль — среда МСО без кинетина. Чашки выдерживали на свету в течение 2-х недель. Оценивали выживаемость эксплантов, формирование корней (в % от общего числа эксплантов).

Второй вариант оценки экспрессии гена *ipt* — анализ корнеобразования у междоузлий на среде с добавлением ауксина (ИУК). Экспланты междоузлий растений картофеля высаживали на среду МСО с добавлением 0,1 мг/л и 1 мг/л ИУК. Через 2 недели культивации оценивали среднее число корней, образующихся на междоузлиях эксплантов отдельных вариантов. Контролем являлись междоузлия растений сорта Адретта.

Для оценки реакции эксплантов растений картофеля на ионы металлов экспланты высаживали на среду МСО с добавлением 0,5 мг/л (2мкМ) сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) или 0,5 мг/л (2,1 мкМ) хлорида никеля ($\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$), поскольку на данной концентрации у эксплантов наблюдали снижение корнеобразования при 100%-ной выживаемости. Контролем являлись экспланты растений на среде МСО без добавления соли. Чашки выдерживали на свету; через 2 недели

оценивали выживание и корнеобразование как % от общего числа эксплантов (для меди) и выживание и рост побегов в % от общего числа эксплантов (для никеля).

Математическую обработку данных проводили с использованием ф-преобразования Фишера и t-критерия Стьюдента ($P_0=0,05$) [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате экспериментов по агротрансформации растений картофеля сорта Адретта была получена коллекция растений-регенерантов (табл. 1), обозначенных как:

A1-A22 — растения, полученные при трансформации плазмидой pGV3850 Tr4;

AR1-AR4 — растения, полученные при трансформации плазмидой pGV3850 Km^R.

Таблица 1

Результаты трансформации картофеля (сорт Адретта), плазида pGV3850 Tr4, контрольная — pGV3850 Km^R

п междоузлий	п регенерирующих междоузлий	п полученных побегов	% трансформации
трансформация плазмидой pGV3850 Tr4 — среда МСО			
167	46	32	27,5 24,1–31,0
контроль (без трансформации) — среда МСО			
12	0	0	0,0 0,0–2,1 (% регенерации)
трансформация плазмидой pGV3850 Km ^R — среда МСО+1зеа, 0,1ИУК			
26	4	4	15,4 9,1–23,1
контроль (без трансформации) — среда МСО+ 1зеа; 0,1 ИУК			
10	4	5	40,0 25,2–55,7 (% регенерации)

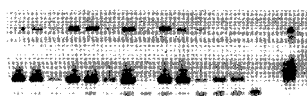


Рис. 1. Результаты ПЦР анализа ДНК растений картофеля с праймерами к гену *prtII* (размер продукта 600 п.н.). Дорожки 1–7 и 9–12–ДНК трансформированных растений картофеля; 8–ДНК исходной формы Адретта; 14–супернегативный контроль (реакционная смесь без добавления ДНК)



Рис. 2. Фенотип трансгенных растений картофеля: а) нормальный фенотип растения А14, б) морфологически измененное растение А11

С использованием метода ПЦР с праймерами к гену *prtII* была доказана трансгенная природа полученных регенерантов (рис. 1). Фенотип большинства полученных растений не отличался от контрольного (рис. 2а), изменения в морфологии побега были отмечены для растения А11 (рис. 2б).

Анализ уровня экспрессии гена *ipt* в трансгенных растениях при добавлении экзогенного цитокинина - кинетина (5 мг/л) выявил 8 форм, для которых процент эксплантов, формирующих корни, был статистически ниже, чем в контроле (табл. 2, выделены жирным).

Анализ реакции на экзогенный ауксин (ИУК, 0,1 и 1 мг/л) выявил 16 форм, у которых показатель корнеобразования снижен по сравнению с исходным сортом (табл. 3) на одной из концентраций ауксина или на обеих. Для подтверждения достоверности отличий использован критерий Стьюдента; значения,

Таблица 2

Влияние кинетина на корнеобразование у трансгенных растений картофеля

Растение эксплантов	п проанализированных эксплантов(доверительные интервалы)	% корнеобразования,
растения с геном <i>ipt</i>		
A1	6	33,3 (16,0–53,3)
A2	5	100,0 (95,1–100,0)
A3	5	60,0 (37,8–80,2)
A4	6	50,0 (30,2–69,8)
A5	5	80,0 (59,7–94,4)
A6	5	60,0 (37,8–80,2)
A7	5	33,3 (14,6–55,3)
A8	4	25,0 (7,3–48,8)
A9	5	60,0 (37,8–80,2)
A10	5	80,0 (59,8–94,3)
A11	4	50,0 (26,1–74,0)
A12	5	60,0 (37,8–80,2)
A13	5	20,0 (5,7–40,2)
A14	5	100,0 (95,1–100,0)
A15	5	33,3 (14,6–55,3)
A16	5	60,0 (37,8–80,2)
A17	5	20,0 (5,7–40,2)
A18	5	0,0 (0–4,9)
A19	5	60,0 (37,8–80,2)
A20	5	0,0 (0–4,9)
A21	5	60,0 (37,8–80,2)
A22	5	60,0 (37,8–80,2)
растения с геном <i>prtII</i>		
AR1	5	80,0 (59,7–94,4)
AR2	5	100,0 (95,1–100,0)
AR3	5	100,0 (95,1–100,0)
AR4	5	100,0 (95,1–100,0)
исходная форма		
Адретта	12	100,0 (97,9–100,0)

Таблица 3

Интенсивность корнеобразования у трансгенных растений картофеля на среде с различными концентрациями ИУК

Растение	1 mg/l				0,1 mg/l			
	n	x_{cp} корней	Sx_{cp}	t	x_{cp} корней	n	Sx_{cp}	t
растения с геном <i>ipt</i>								
A1	6	10,5	0,99	1,34	3,8	5	1,11	4,30
A2	5	9,6	2,59	0,14	4,4	5	1,66	2,84
A3	5	4,4	2,1	1,97	6,6	5	2,42	1,18
A4	6	8,8	1,68	0,35	9,8	5	1,24	0,14
A5	5	9,0	1,16	0,12	6,2	5	1,02	2,68
A6	5	7,2	0,97	1,27	7,8	5	1,93	0,87
A7	5	5,0	2,28	2,47	2,4	5	0,51	7,83
A8	3	4,3	2,34	3,74	6,0	3	1,18	3,46
A9	5	10,8	2,02	0,68	5,8	5	0,69	3,69
A10	5	7,8	1,20	0,81	5,6	5	0,93	3,33
A11	10	1,3	0,56	10,0	0,6	12	0,36	14,52
A12	5	8,8	2,15	0,16	3,5	5	1,58	3,49
A13	5	0,8	0,89	5,50	0,6	5	0,40	10,47
A14	5	6,4	1,72	1,32	6,6	5	1,01	2,38
A15	3	2,6	0,57	6,11	4,3	4	1,21	5,41
A16	4	3,8	2,32	4,25	6,4	5	1,42	1,99
A17	5	4,4	1,89	2,12	7,0	5	2,02	1,20
A18	5	3,0	1,09	3,76	0,5	6	0,67	3,84
A19	5	8,6	2,38	0,22	5,6	5	0,95	3,28
A20	5	6,2	1,46	1,56	8,4	6	1,74	1,11
A21	6	8,3	1,59	0,80	5,4	5	1,12	3,11
A22	5	7,4	0,75	1,24	7,4	5	0,71	2,12
контрольные растения с геном <i>ptIII</i>								
AR1	5	6,2	1,46	1,56	9,2	5	1,24	0,28
AR2	5	9,4	1,69	0,10	7,6	5	0,51	2,20
AR3	5	8,2	0,37	0,78	7,2	5	0,66	2,28
AR4	5	6,4	0,81	1,89	8,8	5	0,37	0,94
исходная форма								
Адретта	5	9,2	1,24		9,6	5	0,76	

Примечания: n — количество проанализированных эксплантов на среде с ауксином; x_{cp} — среднее число образовавшихся корней на один эксплант; Sx_{cp} — среднее квадратичное отклонение; t — критерий Стьюдента, с помощью которого проведены сравнения трансгенных растений с исходной формой ($P_0=0,05$).

отличающиеся от табличных ($P_0=0,05$), а также, соответствующие номера растений выделены жирным.

По результатам двух тестов у большей части трансгенных растений с геном *ipt* выявлена измененная реакция на экзогенные фитогормоны. Растения A1, A7, A8, A13, A15, A17, A18, A20 характеризовались измененной реакцией на экзогенный цитокинин; у растений A1, A2, A5, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14,

A15, A16, A18, A19, A21 изменена реакция на ауксин. Среди данных форм можно выделить группу, у которых изменена чувствительность к обоим типам гормонов A1, A7, A8, A13, A15, A18. Полученные результаты свидетельствуют о наличии изменений в эндогенном уровне гормонов у трансгенных растений.

Анализ развития эксплантов (узлы с пазушными почками) трансгенных растений картофеля на

Таблица 4

Вариабельность способности корнеобразования у узлов трансгенных растений картофеля с геном *ipt* на среде с сульфатом меди

Растение	n проанализированных эксплантов	% растущих побегов с корнями, доверительные интервалы
растения с геном <i>ipt</i>		
A1*	5	80,0 (59,8–94,3)
A2*	10	30,0 (16,7–45,2)
A3	12	25,0 (13,7–38,4)
A4	11	54,5 (39,5–69,1)
A5*	10	30,0 (16,7–45,2)
A6	10	30,0 (16,7–45,2)
A7*	11	54,5 (39,5–69,1)
A8*	10	60,0 (44,2–74,7)
A9*	11	54,5 (39,5–69,1)
A10*	11	72,7 (58,4–84,9)
A11*	12	8,3 (2,2–17,9)
A12*	10	30,0 (16,7–45,2)
A13*	9	11,1 (3,0–23,5)
A14*	10	30,0 (16,7–45,2)
A15*	13	53,8 (40,1–67,3)
A16*	10	60,0 (44,2–74,7)
A17*	11	9,1 (2,4–19,5)
A18*	11	36,4 (22,7–51,3)
A19*	5	80,0 (59,8–94,3)
A20*	5	20,0 (5,6–40,2)
A21*	14	28,6 (17,5–41,3)
A22	13	53,9 (40,1–67,4)
контрольные растения с геном <i>nptII</i>		
AR1	11	72,7 (58,4–84,9)
AR2	13	38,5 (27,8–49,7)
AR3	10	40,0 (25,3–55,7)
AR4	10	30,0 (16,7–45,2)
исходная форма		
Адретта	12	25,0 (13,7–38,4)

Примечание: жирным шрифтом отмечены растения, для которых процент образования корней статистически выше по сравнению с контролем; * — отмечены растения с измененной реакцией на экзогенные фитогормоны; n — объем выборки.

средах с сульфатом меди (2 мкМ) показал, что среди трансгенных растений картофеля наблюдается вариабельность по способности к корнеобразованию на среде с ингибирующей развитие корней концентрацией меди. У части трансгенных растений с геном *ipt* (A1, A4, A7, A8, A9, A10, A15, A16, A19, A22) по сравнению с контролем повышена устойчивость к ионам меди (табл. 4, рис. 3) — статистически выше процент эксплантов, образующих корни. У части устойчивых растений (A1, A7, A8, A9, A10, A15, A16, A19) также изменена чувствительность к гормонам. Кроме того, повышенная ус-



Рис. 3. Растения картофеля на среде с 0,5 г/л сульфата меди: три растения слева — контроль (сорт Адретта), два растения справа — трансгенное растение A15



Рис. 4. Растения картофеля на среде с 0,5 г/л хлорида никеля: три растения слева — контроль (сорт Адретта), три растения справа — трансгенное растение A16

тойчивость к ионам меди была выявлена у растения AR1 (получено при трансформации контрольной плазмидой).

При анализе развития эксплантов на среде с хлоридом никеля (2,1 мкМ) выявлен ряд форм с увеличенной, по сравнению с контролем, эффективностью роста корнеобразующих побегов из пазушных почек (табл. 5, рис. 4). У растений A2, A3, A13, A14, A15, A16, A17, A18, A21, A22, а также контрольного трансгенного растения AR1, эффективность роста почек и формирования корней колебалась от 40 до 100%. Устойчивые растения A2, A13, A14, A15, A16, A17, A18, A21 также характеризовались измененной реакцией на экзогенные гормоны.

Таким образом, при анализе экспрессии гена *ipt* у трансгенных растений картофеля показана измененная реакция на экзогенные фитогормоны у 18 из 22 исследованных образцов. В тестах на устойчивость к тяжелым металлам 8 растений картофеля с измененной чувствительностью к экзогенным гормонам проявили повышенную устойчивость к ионам меди; 8 растений с измененной чувствительностью к экзогенным гормонам — к никелю (табл. 6). Кроме того, повышенной устойчивостью к обоим металлам обладает контрольное трансгенное растение AR1.

ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе не рассматривалось влияние цитокинина на устойчивость растений картофеля к абиотическим факторам, в том числе к солям тяжелых металлов. С помощью метода агробактериальной трансформации на основе сорта Адретта была получена коллекция трансгенных растений картофеля (22 образца) с геном синтеза цитокининов — *ipt*. Большая часть (21 форма) полученных растений имела фенотип, не отличающийся от растений исходного сорта. Исключение составила форма A11,

Таблица 5

Таблица 6

Способность к росту трансгенных растений картофеля на среде с хлоридом никеля

Растение	п проанализированных эксплантов	% растущих побегов с корнями, доверительные интервалы
растения с геном <i>ipt</i>		
A1*	10	30,0 (16,7–45,2)
A2*	10	40,0 (25,3–55,7)
A3	11	45,5 (30,9–60,5)
A4	10	10,0 (2,7–21,3)
A5*	10	10,0 (2,7–21,3)
A6	10	10,0 (2,7–21,3)
A7*	10	10,0 (2,7–21,3)
A8*	10	0,0 (0,0–2,7)
A9*	10	10,0 (2,7–21,3)
A10*	9	11,1 (3,0–23,5)
A11*	9	0,0 (0,0–2,8)
A12*	10	0,0 (0,0–2,5)
A13*	9	100,0 (97,3–100,0)
A14*	10	40,0 (25,3–55,7)
A15*	10	100,0 (97,5–100,0)
A16*	10	80,0 (66,1–90,9)
A17*	10	40,0 (25,3–55,7)
A18*	10	70,0 (54,8–83,2)
A19*	8	12,5 (3,4–26,3)
A20*	9	0,0 (0,0–2,8)
A21*	11	54,5 (39,5–69,1)
A22*	10	70,0 (54,8–83,2)
контрольные растения с геном <i>nptII</i>		
AR1	10	50,0 (34,5–65,5)
AR2	10	0,0 (0,0–2,5)
AR3	10	0,0 (0,0–2,5)
AR4	10	0,0 (0,0–2,5)
исходная форма		
Адретта	30	16,7 (10,5–24,1)

Примечание: жирным шрифтом отмечены растения, для которых процент образования корней статистически выше по сравнению с контролем; * — отмечены растения с измененной реакцией на фитогормоны; п — объем выборки.

для которой были отмечены изменения в морфологии листа, опущении надземных органов. Трансгенные растения с геном *ipt*, как правило, имеют измененный фенотип, выражающийся в снятии эффекта апикального доминирования, уменьшении размеров листа, ингибировании корнеобразования, что свидетельствует о сверхпродукции цитокининов [13, 19, 20]. Неизменный, по сравнению с исходной формой, фенотип большей части полученных нами трансгенных растений свидетельствует о невысоком уровне экспрессии гена *ipt*. Экспрессия гена *ipt* в трансгенных растениях была проверена косвенными методами — проведено изучение реакции расти-

Общая характеристика трансгенных растений картофеля по чувствительности к экзогенным фитогормонам и устойчивости к солям металлов

Номер растения	Измененная реакция на ауксин	Измененная реакция на цитокинин	Устойчивость к меди	Устойчивость к никелю
A1, A7, A8	+	+	+	
A2, A14, A21	+			+
A3				+
A4			+	
A5, A11, A12	+			
A6				
A9, A10, A19	+		+	
A13, A18	+	+		+
A15	+	+	+	+
A16	+		+	+
A17		+		+
A20		+		
A22, AR1			+	+
AR2, AR3, AR4, Адретта				

Примечания: + — наличие реакции, пустая графа — отсутствие соответствующей реакции (реакции на экзогенный ауксин, цитокинин или устойчивость к металлу).

тельных эксплантов на добавление экзогенных гормонов ауксина (ИУК) и цитокинина (кинетина). В случае изменения уровня гормона в трансгенных растениях реакция на экзогенный гормон должна быть измененной по сравнению с исходной формой. В экспериментах с экзогенным ауксином измененную реакцию на гормон проявили 16 растений; в тесте с добавлением цитокинина — 8 форм; измененная реакция на оба типа гормонов зафиксирована у 6 растений. Ни в одном из тестов не выявлено измененной реакции у контрольных трансгенных растений картофеля.

Как правило, тест на устойчивость к солям металлов проводят *in vivo*: в теплице или в поле, используя для полива растения раствор соответствующей соли [21]. Однако в этом случае невозможно строго контролировать концентрацию соли в почве, кроме того, влияние на результаты теста может оказывать развитие на корнях растений эктомикоризы, которая увеличивает устойчивость растений к металлам [2]. Более строгим представляется применение теста *in vitro*. Нами подобраны условия проведения такого теста для меди и никеля: концентрации солей, признаки, по которым можно вести оценку устойчивости.

По результатам тестов выделено 10 трансгенных растений картофеля с повышенной устойчивостью к соли меди, из которых для 8 также показана измененная реакция на гормоны; к соли никеля повы-

шенной устойчивостью обладали 10 растений, у 9 из которых изменена чувствительность к гормонам. Две формы (A15 и A16) проявили повышенную устойчивость к обоим металлам, а также измененную реакцию на фитогормоны. Данные результаты свидетельствуют о наличии положительной связи между измененной реакцией на экзогенные гормоны (следовательно, повышенным содержанием цитокининов) и повышенным уровнем устойчивости к солям меди и никеля.

Интересным фактом является устойчивость к обоим металлам контрольного трансгенного растения AR1, что может быть объяснено специфическим местом встраивания Т-ДНК при трансформации. Полученная Т-ДНК инсерционная линия может быть использована для клонирования соответствующего гена.

Разработанный метод оценки устойчивости растений к солям металлов *in vitro* можно использовать для скрининга растений с целью поиска устойчивых форм; взаимосвязь между повышенным уровнем цитокининов и устойчивостью к солям металлов может быть использована в работах по получению устойчивых к загрязнению металлами растений и дальнейшего изучения данной проблемы.

Литература

1. Heyl A., Schmullig T. Cytokinin signal perception and transduction // *Curr Opin Plant Biol.* — 2003. — Vol. 6, N. 5. — P. 480–488.
2. Hall J. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance // *J. Exp. Bot.* — 2002. — Vol. 53, N. 366. — P. 3–11.
3. Angus S., William R., Jon E. et al. Early Copper-Induced Leakage of K⁺ from Arabidopsis Seedlings Is Mediated by Ion Channels and Coupled to Citrate Efflux // *Plant Physiol.* — 1999. — Vol. 121, N. 4. — P. 1375–1382.
4. Chubatsu L., Meneghini R. Metallothionein protects DNA from oxidative damage // *Biochem J.* 1993. — Vol. 291. — P. 193–198.
5. Stohs S., Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions // *Free Radic Biol Med.* — 1995. — Vol. 18. — P. 321–336.
6. Watkins C., Ferguson I. The interaction of copper and zinc with calcium in apple fruit // *Sci Hortic.* — 1982. — Vol. 17. — P. 319–325.
7. Prasad M. Metal-biomolecule complexes in plants: Occurrence, functions and applications // *Analisis magazine.* — 1998. — Vol. 26, N. 6. — P. 284–289.
8. Wintz H., Fox T., Wu Y.-Y. et al. Expression profiles of Arabidopsis thaliana in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis // *J. Biol.Chem.* — 2003. — Vol. 278, N. 48. — P. 47644–47653.
9. Briat J.F., Lebrun M. Plant responses to metal toxicity // *CRAcad SciIII.* — 1999. — Vol. 322, N. 1. — P. 43–54.
10. Moons A. Ospdr9, which encodes a PDR-type ABC transporter, is induced by heavy metals, hypoxic stress and redox perturbations in rice roots // *FEBS Lett.* — 2003. — Vol. 23, N. 553. — P. 370–376.
11. Moons A. Osgtu3 and osgtu4, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots // *FEBS Lett.* — 2003. — Vol. 23, N. 553. — P. 427–432.
12. Hoth S., Ikeda Y., Morgante M. et al. Monitoring genome-wide changes in gene expression in response to endogenous cytokinin reveals targets in Arabidopsis thaliana // *FEBS Lett.* — 2003. — Vol. 554. — P. 373–380.
13. Ondrey M., Macas J., Kostrica P. Potato transgenesis by T-DNA morphoregulatory genes // *Rostlinna vyroba.* — 1993. — Vol. 39, N. 11. — P. 1065–1074.
14. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция растений. — Киев: Наукова думка. — 1990. — 280 с.
15. Дрейнер Дж., Скотт Р., Армитадж Ф. и др. Генная инженерия растений. — М.: Мир. — 1991. — 408 с.
16. Ходжайова Л.Т., Усольцева М.Ю., Асеева Е.А., Лутова Л.А. Клеточная селекция растений картофеля, устойчивых к фитофторозу, с использованием веществ, нарушающих метаболизм стероидов // *Физиология Растений.* — 1998. — Т. 45, № 2. — С. 283–288.
17. NCBI: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=23381122_AJ414108
18. Терентьев П.В., Постова Н.С. Практикум по биометрии. Л.: Изд-во ЛГУ. — 1977. — 152 с.
19. Ebinuma H., Sugita K., Matsunaga E., Yamakado M. Selection of marker-free transgenic plants using the isopenitil transferase gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1997. — Vol. 94. — P. 2117–2121.
20. McKenzie M., Mett V., Stewart R., Jameson P. Controlled cytokinin production in transgenic tobacco using a copper-inducible promoter // *Plant Physiol.* 1998. — Vol. 116, N. 3. — P. 969–977.
21. Delpere C., Rahme J. and Lutts S. Investigation of morpho-physiological and biochemical impact of cadmium toxicity in Lycopersicon esculentum plants // *Abstracts of workshop «Phytoremediation of toxic metals», Sweden, Stockholm.* — June, 12–15, 2003.

Сокращения: ИУК — индолилуксусная кислота, НУК — нафтилуксусная кислота, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, *ipt* — ген, кодирующий изопентенилтрансферазу, МСО — среда Мурасиге-Скуга, ПЦР — полимеразная цепная реакция, п.н. — пара нуклеотидов.

Copper and nickel resistance at *ipt*-transgenic potato plants

E.A. Andreeva, L.A. Lutova

Department of genetics and breeding, Saint-Petersburg State University, University emb., Saint-Petersburg, Russia

☼ SUMMARY: Using agrobacterial transformation collection of *ipt*-transgenic plants based on cv. Adretta was obtained. Analysis of transgenic plants susceptibility to the exogenous phytohormones auxin (IAA) and cytokinin (kinetin) for 18 from 22 analyzed forms reveals altered reaction to hormones. Among 18 plants with altered reaction to phytohormones for 16 forms enhanced resistance to copper sulfate and/or nickel chloride was observed.

☼ KEY WORDS: *ipt*, potato, cytokinins, heavy metals.