

На правах рукописи



Назарова Янина Иордановна

**ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РИСКОВ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ ДЛЯ
ПОЧВЕННОЙ МИКРОБНОЙ СИСТЕМЫ**

03.02.08 – Экология (биология)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владимир – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого»

Научный руководитель: доктор биологических наук, старший научный сотрудник **Широких Ирина Геннадьевна**

Официальные оппоненты: **Терехова Вера Александровна**
доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», профессор кафедры земельных ресурсов и оценки почв

Вершинина Зиля Рифовна
кандидат биологических наук, Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

Защита состоится «___» _____ 201_ г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 212.025.07 при ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых» по адресу: 600000, г. Владимир, ул. Горького, 87, корп.1, ауд. 335.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ВлГУ и на сайте <http://diss.vlsu.ru>.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные печатью, можно присылать по адресу: 600000, г. Владимир, ул. Горького, д. 87, ВлГУ, кафедра биологии и экологии.

Автореферат разослан «___» _____ 201_ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Кулагина Екатерина Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы, степень ее разработанности. Генетическую модификацию растений (ГМР) сегодня рассматривают как мощный фактор изменения среды обитания человека (Жученко, Чесноков, 2012). При анализе проблем биобезопасности генной инженерии основной упор делается на критериях и методах оценки пищевой безопасности ГМР и получаемых из них продуктов (Кузнецов, Куликов, Цыдендамбаев, 2010). Экологические последствия широкомасштабного коммерческого использования ГМР, вследствие малой изученности их возможных негативных воздействий на живые системы, остаются непредсказуемыми.

С этих позиций при использовании ГМР должен контролироваться весь комплекс взаимодействий в биосфере, включая почвенные микроорганизмы, которые осуществляют важнейшие биосферные функции, играя роль связующего звена биологического и геологического круговорота веществ на планете (Добровольский и др., 2011). Для исключения возможности причинения ущерба почве при выращивании ГМР необходима оценка экологических рисков их возможного воздействия на почвенные микроорганизмы. Особый интерес представляют исследования ризосферных микробных комплексов, играющих важную роль не только в процессах роста и развития растения, но и в поддержании почвенного гомеостаза, реализации почвой своих экологических функций.

Известны работы, посвященные оценке состояния микробных сообществ почвы, на которой выращивали ГМР. Полученные результаты свидетельствуют как об отсутствии видимого эффекта (Arshad et al., 2016; Vital-López L. et al., 2017; Zhou D. et al., 2017; Dunfield, Germida, 2001; Nielsen et al., 2001; Kay et al., 2002; Motavalli et al., 2004; Devare et al., 2007; Locke et al., 2008; Wagner et al., 2008), так и о его наличии (O'Callaghan et al., 2005; Krogh, Griffiths, 2007).

Отмечается сильное варьирование наблюдаемых эффектов в зависимости от конкретного вида и экологических условий выращивания растений, а также от техники трансформации и встраиваемой генетической конструкции (Turrini, Sbrana, Giovannetti, 2015). Большинство работ выполнены преимущественно с использованием генно-молекулярных методов, которые обладают высокой пропускной способностью, но не позволяют судить о физиологических особенностях и экологических функциях обнаруживаемых микроорганизмов. В связи с этим не утратил своего значения традиционный (чашечный) метод, позволяющий получать информацию об изменениях функциональной структуры модельных микробных комплексов (Мукашева, Шигаева, 2015).

Выбор актиномицетов в качестве модельной группы микроорганизмов обусловлен их способностью продуцировать фитогормоны, антибиотики и другие физиологически активные соединения (Norwood, 2007), участвовать в разложении органических остатков в почве. Многообразие аспектов взаимодействия с растением определяет актуальность биоиндикационного изучения комплексов актиномицетов в ризосфере ГМР.

Цель и задачи исследования.

Целью работы являлось выяснение возможности использования структуры ризосферных комплексов актиномицетов в оценке потенциального экологического риска для почвенной микробной системы при выращивании табака (*Nicotiana tabacum* L.) и томата (*Solanum lycopersicum* L.) с усиленной антиоксидантной защитой.

Для достижения намеченной цели решали следующие задачи:

1) Исследовать особенности ассоциативного взаимодействия актиномицетов с растениями семейства Solanaceae (на примере *Solanum tuberosum* L.).

2) Получить репрезентативные выборки трансгенных по гену *Fe-SOD1* растений табака и томата путем клонального микроразмножения *in vitro* и последующего выращивания в условиях закрытого грунта.

3) Провести в модельных опытах оценку функциональной активности гетерологичного гена *Fe-SOD1* в вегетативном потомстве ГМР.

4) Определить численность, разнообразие и таксономическую структуру комплексов актиномицетов в ризосфере растений исходных сортов и независимых трансгенных линий табака и томата.

5) Выделить из ризосферы растений исходных сортов и трансгенных линий представителей рода *Streptomyces* в чистую культуру и провести их видовую идентификацию по фенотипическим и генотипическим признакам.

6) Изучить метаболический потенциал (антибиотикорезистентность, антагонистическую и целлюлозолитическую активность, способность к синтезу ауксинов) выделенных культур для определения функциональной структуры ризосферных комплексов стрептомицетов.

Научная новизна. Впервые в ризосфере растений-трансформантов выявлены перестройки в функциональной структуре комплексов актиномицетов, имеющие биоиндикационное значение. Установлены достоверные различия между ризосферными комплексами исходных сортов и трансгенных линий по частоте встречаемости и долевого вкладу стрептомицетов с фиторегуляторной активностью, участвующих в защите растений от фитопатогенов и в процессах биодеструкции целлюлозы. Впервые экспериментально показана связь между синтезом лектинов ризосферными стрептомицетами и их способностью колонизировать ткани растения. Впервые продемонстрировано усиление антиоксидантной защиты растений *N. tabacum* и *S. lycopersicum* в результате экспрессии гетерологичного гена *Fe-SOD1* при стрессе, обусловленном токсичностью ионов алюминия в кислой почве.

Теоретическая и практическая значимость работы. Обоснована возможность использования актиномицетов в качестве модельной группы микроорганизмов в биоиндикации возможных нарушений экологического состояния почвы при коммерческом выращивании трансгенных культур. Показано, что генно-инженерное усиление антиоксидантной защиты может приводить к изменению функциональной структуры сообществ микроорганизмов, ассоциированных с корнями растений-трансформантов

томата и табака. Получены результаты, указывающие на перспективность использования гена *Fe-SOD1* из *Arabidopsis thaliana* для генно-инженерной защиты фотосинтетического аппарата растений от окислительного стресса, обусловленного токсичностью алюминия в кислых почвах. Выделены культуры стрептомицетов, способные оказывать на растение фиторегуляторное и биоконтрольное действие, обладающие целлюлозолитической активностью и высокой колонизирующей способностью, перспективные для разработки новых экологически приемлемых биопрепаратов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Метаболически активные актиномицеты являются неотъемлемым компонентом микробных сообществ в ризосфере растений семейства Solanaceae, вступают с ними в ассоциативное взаимодействие, способны заселять различные органы, проникать в ткани, не оказывая при этом негативного влияния на рост и развитие растения-хозяина, его продуктивность.

2. Генно-инженерная защита растений табака и томата от окислительного стресса не повлекла существенных изменений в численности, разнообразии и таксономической структуре ризосферных комплексов мицелиальных прокариот. Выявленные различия между исходными сортами и трансгенными линиями по характеру и величине сопоставимы с теми, что имеют место между растениями, полученными в результате традиционной селекции.

3. Выявленные перестройки в функциональной структуре актиномицетных комплексов растений-трансформантов могут иметь своим следствием нарушения таких процессов, как биодеструкция в почве растительных полимеров, биологический контроль фитопатогенов и фитогормональная регуляция роста и продуктивности растений.

Методология и методы исследований. Методология работы спланирована согласно поставленной цели. Эксперименты проводили *in vitro* и *ex vitro*, в условиях вегетационных опытов в климатических камерах, с использованием стандартных и разработанных методик. Использовали микробиологические и биохимические методы, метод культуры изолированной растительной ткани, а также расчет синэкологических показателей структуры сообществ. Статистическую обработку данных проводили стандартными методами (Лакин, 1990) с использованием пакета программ Microsoft Excel 2007.

Личный вклад автора. Тема, цель, задачи, объекты, методы и план исследования определены автором совместно с научным руководителем. Эксперименты с растениями и микроорганизмами осуществлялись при непосредственном участии автора. Анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и основных защищаемых положений, выполнены лично автором.

Степень достоверности и апробация результатов.

Достоверность результатов и обоснованность выводов проведенного исследования подтверждены использованием комплекса методов, адекватных

целям и задачам работы, использованием статистических методов, практической апробацией результатов. Результаты исследований были представлены на Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем» (Киров, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018); «Экология родного края: проблемы и пути их решения» (Киров, 2016); Всероссийских молодежных научных конференциях «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2016); «Экология и почвы» (Пушино, 2014); Всероссийском симпозиуме «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность» (Москва, 2016); Конкурсе «Молодежь в экологии» в рамках Форума «Эко-Киров» (Киров, 2017); Международных научно-практических конференциях аспирантов и молодых ученых «Знания молодых: наука, практика и инновации» (Киров, 2015, 2016, 2017); Международных научно-практических конференциях «Аграрная наука: развитие и перспективы» (Николаев (Украина), 2015, 2016); «Роль почв в биосфере и жизни человека» (Москва, 2015); «Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах» (Киров, 2015); «Методы и технологии в селекции и растениеводстве» (Киров, 2016); «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Уфа, 2018); «Мелиорация почв для устойчивого развития сельского хозяйства» (Киров, 2019).

По материалам диссертационной работы опубликовано 29 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 157 страницах печатного текста, иллюстрирована 18 таблицами и 36 рисунками. Состоит из введения, обзора литературы, шести глав экспериментальной части, заключения, одного приложения, списка использованной литературы, включающего 225 наименований, в т. ч. 162 – на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

В работе использовали растения из семейства Solanaceae: картофель (*Solanum tuberosum* L.), томат (*Solanum lycopersicum* L.) и табак (*Nicotiana tabacum* L.).

Взаимодействие растений с актиномицетами изучали в инокуляционных экспериментах *in vitro* с картофелем Пранса. Учитывали морфометрические показатели растений и численность стрептомицетов в различных органах и тканях без отмывки и после отмывки водой.

Трансгенные линии табака Самсун и томата Белый налив были получены во ВНИИСХБ (г. Москва) и любезно предоставлены нам для исследования в рамках договора о сотрудничестве. Трансгенность полученных линий bn4, bn6, bn34, bn27 (томат) и Ttrf13, Ttrf3, Ttrf2, Ttrf8 (табак) была доказана методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Серенко и др., 2009, Нодельман, 2010). Трансформанты несли гетерологичный ген, кодирующий цитоплазматическую

Fe-содержащую супероксиддисмутазу (*Fe-SOD1*) из *Arabidopsis thaliana* (L.), который придает растению устойчивость к окислительному стрессу.

Клональное микроразмножение пробирочных растений проводили на среде МС (Murashige, Skoog, 1962). В камерах искусственного климата (ЛКА, Германия) растения выращивали при 4000 Лк, фотопериоде 16 час, температуре 25/18⁰ С день/ночь. Каждая из сравниваемых линий, включая исходный генотип, была представлена не менее чем тремя выращенными в почве клонами.

Для проверки функциональной активности целевого гена растения томата выращивали в обычных условиях, а растения табака, помимо этого – в условиях стресса, обусловленного токсичностью алюминия в кислой почве. Степень адаптации растений к стрессу оценивали с помощью данных о перекисном окислении липидов (ПОЛ) (Лукаткин, 2002), суммарной активности СОД (Beauchamp, Fridovich, 1971), содержании в листьях пластидных пигментов (Шлык, 1971). Временные промежутки между отбором смешанных проб листьев составляли в среднем две недели.

Актиномицеты учитывали и выделяли из ризосферы растений при посевах на среду с пропионатом натрия (для описания родовой структуры) и казеин-глицериновый агар (для описания видовой структуры комплекса). Дифференцировано учитывали колонии по морфотипам. Доминирующие на чашках колонии выделяли в чистую культуру (не менее 15 изолятов с растения) для исследования их функциональной активности и таксономической принадлежности, которую устанавливали в соответствии с определителями Берджи (1997) и Гаузе и др. (1983). Морфологические признаки исследовали при помощи светового микроскопа Leica DM 2500 (Carl Zeiss, Германия).

Филогенетическое положение штаммов рода *Streptomyces* определяли на основе анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рНК. Секвенирование фрагмента гена 16S рНК штаммов ТК-5 и Т-2-20 проведено в НПК “Синтол” (Москва). Полученную нуклеотидную последовательность сопоставляли с материалом, депонированным в NCBI с использованием пакета программ BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Выделенные культуры хранили в пробирках со скошенной овсяной средой при температуре 4°С. У каждого изолята изучали целлюлолитические (Teather, Wood, 1982) и антагонистические (Егоров, 1991) свойства. В качестве тест-культур использовали фитопатогенные микромицеты и бактерии. Способность выделенных штаммов продуцировать ауксины определяли с реактивом Сальковского (Libbert, Risch, 1969).

Статистическую обработку данных проводили стандартными методами (Лакин, 1990) с использованием пакета программ EXCEL и STATGRAFICS.

Результаты и обсуждение

Изучение ассоциативного взаимодействия актиномицетов с растениями семейства *Solanaceae* (на примере картофеля)

В результате инокуляции картофеля стрептомицетами *in vitro* показано, что колонизация различных органов и тканей происходит избирательно и зависит от свойств конкретного штамма, важную роль в этом взаимодействии играет продукция лектинов.

Достоверных различий между инокулированными и контрольными растениями по морфометрическим показателям не выявлено. Клубнеобразование инокулированных растений *ex vitro* не уступало контрольным. Это свидетельствует, что актиномицеты являются автохтонным компонентом микробных сообществ в ризосфере растений семейства *Solanaceae*, способны вступать в ассоциативное взаимодействие, не оказывая негативного влияния на рост растения-хозяина, его продуктивность.

Оценка функциональной активности гетерологичного гена *Fe-SOD1* в вегетативном потомстве ГМР табака и томата

Проверка функциональной активности встроенного гена *Fe-SOD1* при выращивании ГМР в почве показала, что суммарная активность СОД у линии томата bn 6 в начальный период наблюдений (пять настоящих листьев) и у линии bn 4 при появлении первой цветочной кисти достоверно превышали аналогичный показатель исходного сорта Белый налив (рис. 1).

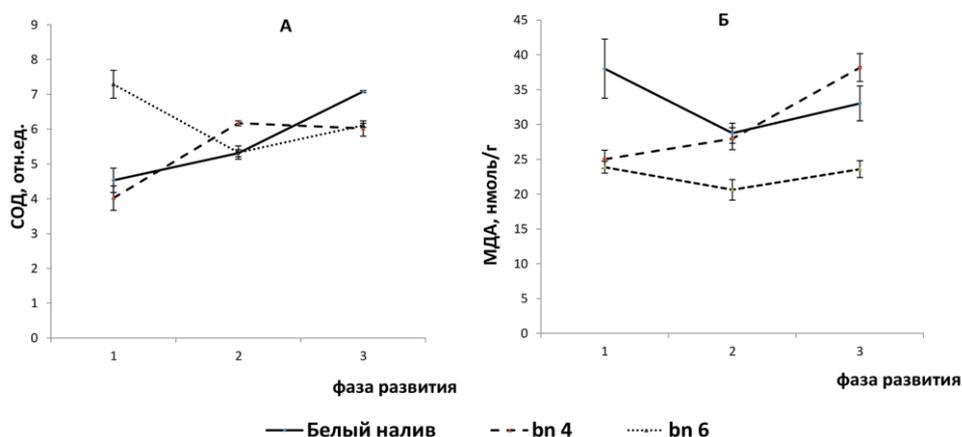


Рис. 1 – Динамика общей активности СОД (А) и перекисного окисления липидов (Б) в листьях различных генотипов томата по фазам развития: пятый настоящий лист (1), первая цветочная кисть (2), образование завязи (3).

Величина накопления МДА, отражающая интенсивность перекисного окисления липидов, в начальный период роста в листьях растений исходного сорта была существенно выше, чем у растений с гетерологичным геном *Fe-SOD1*. Более низкий, в сравнении с исходным сортом, уровень окислительной деструкции у линии bn6 сохранялся в течение всего периода наблюдений, а у линии bn4 – только в начале онтогенеза, что могло быть связано с неустойчивой экспрессией встроенного гена.

У табака проверку функциональной активности встроенного гена осуществляли в условиях моделируемого эдафического стресса,

обусловленного токсичностью алюминия в кислой почве. В обычных условиях у трансформантов Ttrf13 и Ttrf3 показатели суммарной активности СОД достоверно выше, чем в листьях исходного сорта, что говорит о суперэкспрессии встроенного гена и о более высоком уровне антиоксидантной защиты. Различия с контролем по активности СОД, несущественные у трансформированных растений в фазу укоренения рассады, усиливались в процессе онтогенеза растений (рис. 2).

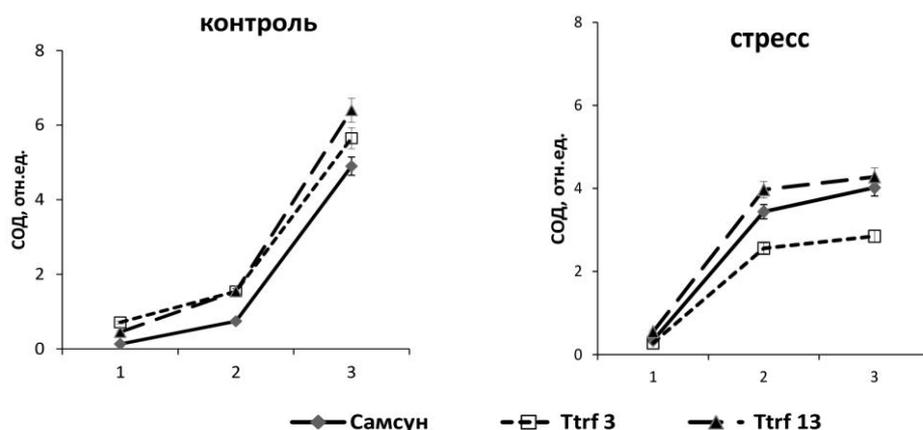


Рис. 2 – Динамика общей активности СОД в листьях различных генотипов табака по фазам развития: укоренение рассады (1), формирование растений (2), цветение (3). На контрольном (контроль) и провокационном фоне (стресс).

На фоне окислительного стресса, обусловленного токсичностью алюминия в кислой почве, преимущество перед исходным сортом проявила только линия Ttrf13, тогда как у трансформантов линии Ttrf3 суммарная активность СОД в листьях значительно уступала показателям сорта Самсун на протяжении периода наблюдений, за исключением фазы укоренения рассады. Это указывает на отсутствие в листьях трансформантов Ttrf3 стабильной экспрессии и функциональной активности встроенного гена *Fe-SOD1*.

Сравнение таксономической структуры комплексов актиномицетов в ризосфере ГМР и исходных сортов томата и табака

Определение структуры комплексов актиномицетов в ризосфере томата выявило у растений с генно-инженерным усилением антиоксидантной защиты ряд отличий от исходного сорта. Ризосферный комплекс линии bn6 отличался более низкими значениями абсолютной (266 тыс. КОЕ/г) и относительной (2,8%) численности, но более высоким родовым и видовым разнообразием мицелиальных прокариот (табл. 1). Индекс Шеннона, рассчитанный для линии bn6 ($H=0,822$) более чем в 2 раза превысил аналогичный показатель в ризосфере исходного сорта ($H=0,367$). В составе ризосферного комплекса сорта Белый налив были обнаружены в определенном соотношении представители родов *Streptomyces* (94%), *Micromonospora* (1,2%) и олигоспоровые формы (4,8%) актиномицетов. Долевое соотношение представителей этих родов в ризосфере томатов линии bn6 существенно изменилось в сторону большей представленности олигоспоровых (7,1%) и микромоноспоровых (5,8%) видов,

характеризующихся высокой избирательностью в отношении трофических субстратов, при сокращении долевого участия стрептомицетов (84%), традиционно считающихся видами-убиквистами. Актиномицетный комплекс линии bn6 включал в качестве минорного компонента представителей рода *Streptosporangium* (2,9%), не выявленных в ризосфере исходного сорта.

Таблица 1

Численность и структура комплексов актиномицетов в ризосфере томата в зависимости от генотипа растения

Показатель	Генотип растения		
	Белый налив	bn 6	bn 4
Общая численность прокариот, вырастающих на КГА, тыс. КОЕ/г	434,0	266,0	372,0
Доля актиномицетов в прокариотном комплексе, %	3,7	2,8	3,7
Количество секций и серий рода <i>Streptomyces</i>	8,0	9,0	9,0
Количество родов, выделяемых на среде с пропионатом натрия	3,0	4,0	3,0
Индекс Шеннона (H), бит/г	0,367	0,822	0,434
<i>Streptomyces</i>	94,0	84,0	91,0
<i>Micromonospora</i>	1,2	5,8	4,9
олигоспоровые формы	4,8	7,1	4,3
<i>Streptosporangium</i>	0	2,9	0

Исходный сорт и линия томата bn6 существенно различались между собой по видовой структуре стрептомицетного комплекса. В ризосфере сорта Белый налив по частоте встречаемости ($\geq 80\%$) доминировали виды 6 секций и серий, тогда как на корнях трансгенной линии число доминирующих секций и серий сократилось до 4 (рис. 3).

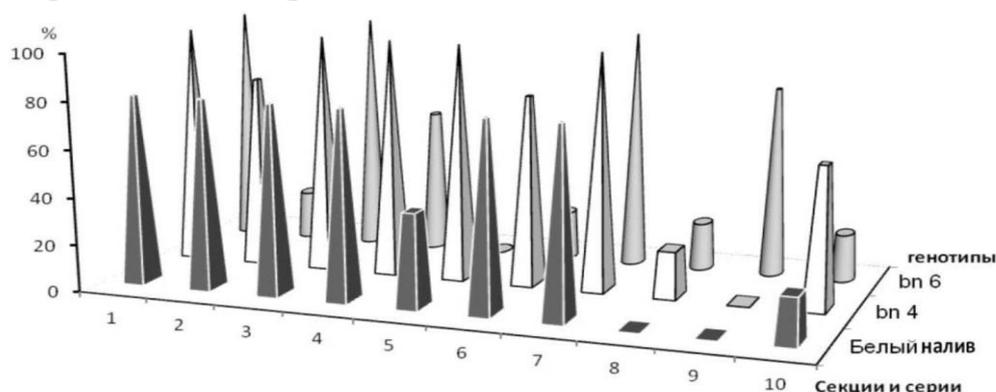


Рис. 3 – Частота встречаемости в ризосфере различных генотипов томата видов из секций и серий: 1 – Albus Albus, 2 – Albus Albocoloratus, 3 – Cinereus Achromogenes, 4 – Cinereus Chromogenes, 5 – Cinereus Aureus, 6 – Cinereus Violaceus, 7 – Helvolo-Flavus, 8 – Azureus, 9 – Roseus, 10 – Imperfectus.

В ризосфере линии bn6 были ниже, по сравнению с исходным сортом, показатели частоты встречаемости и долевого участия тривиальных для почвы видов из серий *Cinereus Chromogenes*, *Cinereus Violaceus* и *Albus Albocoloratus*, исчезли виды *Cinereus Aureus*, но появились не отмеченные в ризосфере исходного сорта виды из секций *Azureus* и *Roseus* (рис. 4).

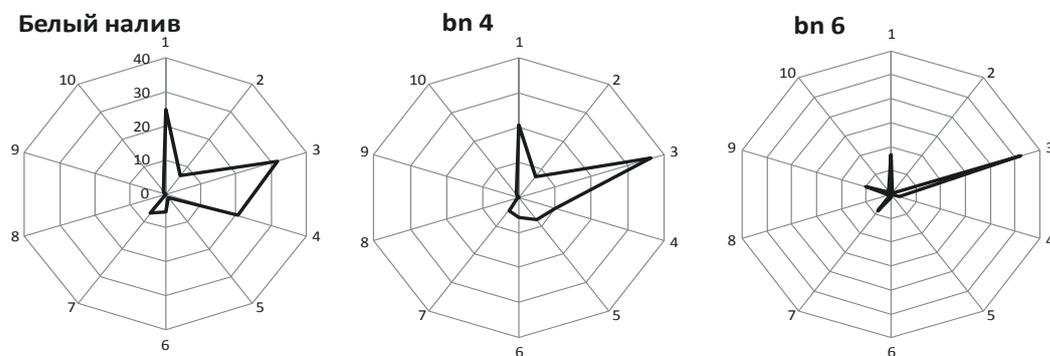


Рис. 4 – Долевое участие (%) в ризосферных комплексах различных генотипов томата видов из секций и серий: 1 – *Albus Albus*, 2 – *Albus Albocoloratus*, 3 – *Cinereus Achromogenes*, 4 – *Cinereus Chromogenes*, 5 – *Cinereus Aureus*, 6 – *Cinereus Violaceus*, 7 – *Helvolo-Flavus*, 8 – *Azureus*, 9 – *Roseus*, 10 – *Imperfectus*.

Комплекс актиномицетов в ризосфере трансгенной линии bn4 отличался от комплекса исходного сорта в меньшей степени, чем комплекс линии bn6. Менее выраженными были изменения в численности и разнообразии актиномицетов, относительном обилии выделяемых родов (табл. 1). Однако общие тенденции, заключающиеся в более низкой заселенности актиномицетами ризосферы трансформанта при увеличении их разнообразия, прослеживались и в этом случае. Спектр доминирующих секций и серий в ризосфере линии bn4 расширился с 6 до 7 за счет видов из серии *Cinereus Aureus* (рис. 3), при этом долевое участие в комплексе видов серии *Cinereus Chromogenes* сократилось вдвое (рис. 4).

Сравнительное изучение численности и видовой структуры рода *Streptomyces* в прикорневой почве растений табака проводили с выделением микрококсов ризосферы и ризопланы. В ризосфере численность стрептомицетов, как наиболее представительного в почвах таксона мицелиальных прокариот, изменялась несущественно (в пределах от $2,7 \times 10^5$ до $6,5 \times 10^5$ КОЕ/г), в зависимости от генотипа и почвенного фона, на котором выращивались растения. В ризоплане, напротив, наблюдались существенные различия в численности стрептомицетов между исходным сортом Самсун ($1,1-1,8 \times 10^6$ КОЕ/г) и трансгенными линиями табака Ttrf13 ($3,7 \times 10^5$ КОЕ/г) в обычных условиях и Ttrf3 ($5,9 \times 10^5$ КОЕ/г) на кислом фоне с алюминием.

Исходный сорт и трансгенные линии табака различались по видовой представленности стрептомицетов в ризосфере (табл. 2).

Относительное обилие (%) видов секций и серий рода *Streptomyces* в прикорневой зоне, в зависимости от генотипа табака

Секция и серия	Нейтральный почвенный фон (контроль)			Кислый почвенный фон с алюминием (стресс)		
	Самсун	Ttrf3	Ttrf13	Самсун	Ttrf3	Ttrf13
	ризосфера					
<i>Cinereus Chromogenes</i>	3,0	28,0	80,5	66,7	52,9	86,3
<i>Cinereus Achromogenes</i>	20,3	62,7	8,2	21,0	21,2	11,5
<i>Cinereus Aureus</i>	0	0	5,7	10,1	21,2	0,4
<i>Cinereus Violaceus</i>	0	0	0,6	2,2	3,8	1,8
<i>Imperfectus</i>	0	0	5	0	0,9	0
<i>Albus</i>	76,7	9,3	0	0	0	0
	ризоплана					
<i>Cinereus Chromogenes</i>	33,3	25,7	50,0	38,7	27,5	25,8
<i>Cinereus Achromogenes</i>	36,7	22,9	0	12,9	35,9	9,7
<i>Cinereus Aureus</i>	26,7	51,4	25,0	19,4	9,1	64,5
<i>Cinereus Violaceus</i>	0	0	25,0	0	27,5	0
<i>Imperfectus</i>	3,3	0	0	29,0	0	0

По результатам многофакторного дисперсионного анализа, существенно зависело от генотипа табака варьирование численности ассоциированных с корнями представителей секций и серий *Cinereus Achromogenes* ($p=0,003$) и *Cinereus Chromogenes* ($p=0,007$). В ризосферном комплексе исходного сорта Самсун, преобладали неокрашенные виды серии *Cinereus Achromogenes* (20,3%) и секции *Albus* (76,7%), что характерно для зональных дерново-подзолистых почв. Соотношение пигментированных и лишенных окраски видов в пользу последних изменялось при стрессе, обусловленном кислотностью почвы и алюминием. В ризосферном комплексе Ttrf13, напротив, даже в обычных условиях доля участия видов серии *Cinereus Chromogenes* была выше (80,5%), чем серии *Cinereus Achromogenes* (8,2%), а при выращивании растений на кислом фоне она еще увеличивалась (до 86,3%). В ризоплане сравниваемых генотипов стрептомицетные комплексы характеризовались более равномерным участием представителей отдельных цветковых секций и серий. Но доминировали в комплексах исходного сорта (*Cinereus Chromogenes*, *Cinereus Achromogenes*) и трансгенных линий Ttrf3 (*Cinereus Achromogenes*) и Ttrf13 (*Cinereus Aureus*) представители различных секций и серий.

Сравнение функциональной структуры комплексов актиномицетов в ризосфере ГМР и исходных сортов томата и табака

Наряду с количественными и таксономическими различиями в ризосферных комплексах исходных сортов и трансгенных линий томата и табака были отмечены различия в функциональной структуре. Экологические функции актиномицетов в почве связаны с разложением растительных полимеров, значительная доля которых представлена целлюлозой. Целлюлозолитическую активность природных изолятов определяли на среде с

добавлением карбоксиметилцеллюлозы в качестве единственного источника углерода (рис. 5).

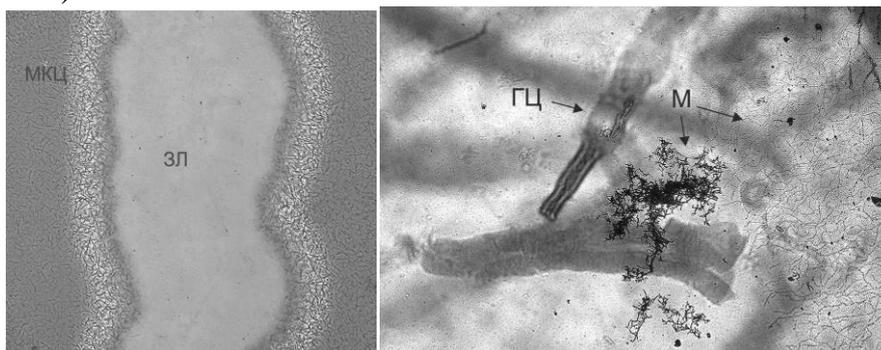


Рис. 5 – Образование зоны разрушения целлюлозы вокруг *Streptomyces* sp. на среде с КМЦ (слева) и микроскопическая картина: рост мицелия *Streptomyces* sp. на КМЦ и ее разрушение (справа). Обозначения: МКЦ – микрокристаллы целлюлозы, ЗЛ – зона гидролиза (тест-зона), М – субстратный и воздушный бактериальный мицелий, ГЦ – гидролизованная целлюлоза.

Все ризосферные изоляты стрептомицетов были разделены, в зависимости от величины зоны разрушения полимера, на группы со слабой (тест-зона не более 20 мм), умеренной (тест-зона изменяется от 21 до 30 мм) и сильной (тест-зона не менее 31 мм) целлюлозолитической активностью. По долевному участию представителей каждой группы в ризосфере линии трансформантов отличались от исходного сорта (рис. 6).

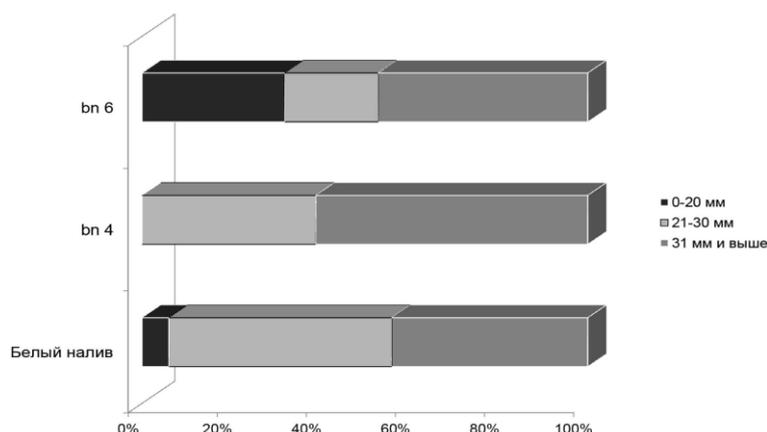


Рис. 6 – Долевое участие (%) в ризосферных комплексах томата стрептомицетов с разной целлюлозолитической активностью (пояснения в тексте).

Если в ризосфере исходного сорта преобладали стрептомицеты с целлюлозолитической активностью от умеренной (50%) до сильной (44%), то в ризосферном комплексе линии bn6, наряду с активными целлюлозолитиками (47%), значительную долю составили стрептомицеты со слабой активностью (32%). Ризосферный комплекс линии bn4 отличался от исходного сорта, напротив, более высокой представленностью стрептомицетов с высокой (61%) целлюлозолитической активностью.

Тестирование стрептомицетов из ризосферы табака также выявило изменение соотношения видов каждой выделенной группы у трансформантов по сравнению с исходным сортом Самсун. Линия Ttrf3 характеризовалась достоверным снижением, а линия Ttrf13, напротив, повышением встречаемости культур с сильной целлюлозолитической активностью, в сравнении с исходным сортом.

Особенностью вторичного метаболизма многих видов стрептомицетов является продукция антибиотиков, благодаря чему они могут ограничивать численность фитопатогенов на корнях растений. Тестирование ризосферных изолятов против одного и того же набора тест-культур фитопатогенов показало, что в ризосфере томата Белый налив встречаются стрептомицеты, подавляющие рост четырех тест-культур грибов и трех тест-культур бактерий (рис. 7).

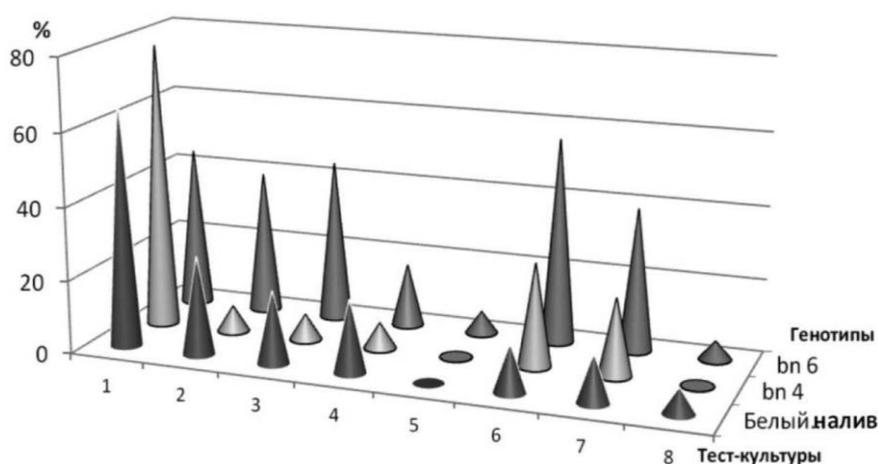


Рис. 7 – Частота встречаемости (%) в ризосфере различных генотипов томата стрептомицетов, ингибирующих рост тест-культур грибов: 1 – *Trichoderma* sp., 2 – *Fusarium culmorum*, 3 – *F. avenaceum*, 4 – *F. oxysporum*, 5 – *Alternaria* sp. и бактерий: 6 – *Arthrobacter simplex*, 7 – *Erwinia herbicola*, 8 – *E. rhapontici*.

В ризосфере линии bn 6 спектр антагонистов расширился за счет стрептомицетов, активных против гриба *Alternaria* sp., увеличились также частоты встречаемости антагонистов *Fusarium culmorum* и *F. avenaceum*, *A. simplex* и *Erwinia herbicola*. В ризосфере трансформанта bn 4, по сравнению с исходным сортом, наоборот, отмечены более низкая встречаемость антагонистов фитопатогенных грибов рода *Fusarium* и отсутствие антагонистов тест-бактерии *E. rhapontici*.

В комплексе стрептомицетов, ассоциированных с корнями табака Самсун, присутствовали виды-антагонисты грибов рода *Fusarium*, грамположительной и грамотрицательной тест-бактерий (рис. 8). В тех же условиях ризосферный комплекс трансгенной линии Ttrf3 отличался более низкой встречаемостью антагонистов *A. simplex* и отсутствием в комплексе антагонистов гриба *F. avenaceum*. Среди стрептомицетов, ассоциированных с корнями другой трансгенной линии Ttrf13, возросла частота встречаемости

видов, антагонистически активных в отношении бактерий, но снизилась встречаемость представителей с антифунгальной активностью (рис. 8).

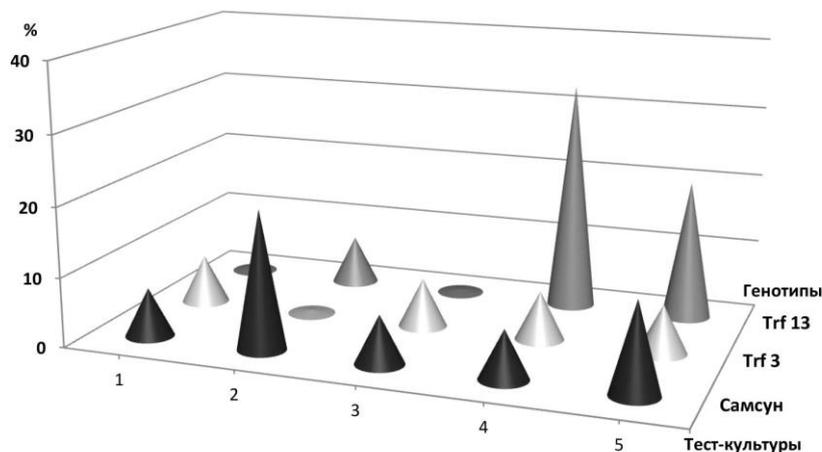


Рис. 8 – Частота встречаемости (%) в ризосфере различных генотипов табака стрептомицетов, ингибирующих рост тест-культур грибов: 1 – *Fusarium culmorum*, 2 – *F. avenaceum*, 3 – *F. oxysporum* и бактерий: 4 – *Erwinia herbicola*, 5 – *Arthrobacter simplex*.

Важным условием ассоциативного взаимодействия стрептомицетов с растениями является синтез ауксинов. Определение способности изолятов из ризосферы томата и табака продуцировать ауксины показало, что продукция ИУК на среде с 200 мкг/мл триптофана за 72 час роста стрептомицетов варьирует от 11,7 до 22,5 мкг/мл в зависимости от штамма и растения-хозяина. В среднем, для выборок одинакового объема, показана достоверно ($P \geq 0,99$) более высокая продуктивность штаммов из ризосферы линии bn6, чем из ризосферы исходного сорта и линии bn4 (табл. 3).

Таблица 3

Образование ауксинов культурами стрептомицетов из ризосферы томата и табака

Показатель	Генотип растений					
	томата			табака		
	Белый налив	bn4	bn6	Самсун	Ttrf3	Ttrf13
Средняя продукция ИУК, мкг/мл	13,7±1,3	14,5±1,3	18,9±2,0	10,9±1,2	14,1±3,9	10,6±1,5
Пределы колебаний (мин.-макс. ИУК), мкг/мл	11,7-15,9	13,4-18,1	16,6-22,5	9,5-12,2	9,8-21,4	9,0-13,2
Доля активных продуцентов ИУК (≥ 20 мкг/мл · 72 час), %	нет	нет	38	нет	14	нет

Для изолятов из ризосферы табака наибольшая средняя продуктивность ИУК была у штаммов из ризосферы линии Ttrf3. Штаммы, способные продуцировать ИУК в концентрации 20 мкг/мл и выше встречались только

среди стрептомицетов, ассоциированных с корнями томата линии bn6 и табака линии Ttrf3.

ВЫВОДЫ

1. Изучение колонизации меристемных растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) ризосферными штаммами *Streptomyces* sp. ТК-5 и Т-2-20 показало, что к 35 сут культивирования растений численность стрептомицетов в их тканях достигала 10^7 КОЕ/г и продолжала увеличиваться до 10^9 КОЕ/г к 60 сут. Плотность заселения отдельных тканей и органов картофеля варьировала в пределах двух порядков и зависела от способности штамма продуцировать лектины. Анализ морфометрических показателей растений картофеля *in vitro* и показателей продуктивности *in vivo* показал, что растения, подвергнутые инокуляции, не имели отклонений в росте, развитии и клубнеобразовании, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния исследуемых штаммов на растения картофеля при ассоциативном взаимодействии.

2. Путем клонального микроразмножения *in vitro* независимых трансгенных линий томата *S. lycopersicum* L. Белый налив и табака *Nicotiana tabacum* L. Самсун с гетерологичной вставкой *Fe-SOD1* из *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., получено 44 растений линий bn 4, bn 6, bn 34, bn 27 томата и 34 растений линий Ttrf 3, Ttrf 13, Ttrf 2, Ttrf 8 табака. При последующем выращивании трансформантов в условиях закрытого грунта в поколениях T0 (для томата и табака), T1 и T2 (для томата) проведена комплексная оценка по морфометрическим и биохимическим показателям, показавшая, что в результате генно-инженерного вмешательства габитус растений изменялся несущественно, а накопление МДА – продукта ПОЛ – в листьях трансгенных линий было ниже по сравнению с исходными формами в 2,1-2,5 раза в зависимости от генотипа и фазы развития растений, что может свидетельствовать о большей сбалансированности окислительно-восстановительных процессов у растений, снабженных гетерологичной вставкой *Fe-SOD1*.

3. Проверка функциональной активности встроенного гена *Fe-SOD1* в листьях трансгенных линий табака Ttrf 13 и Ttrf 3 на фоне окислительного стресса, обусловленного токсичностью алюминия в кислой почве, показала, что преимуществом перед исходным сортом отличалась только линия Ttrf 13, тогда как в листьях трансформантов Ttrf 3 суммарная активность СОД значительно уступала показателям исходного сорта на протяжении всего периода наблюдений, за исключением фазы укоренения рассады. Это указывает на отсутствие в листьях трансформантов Ttrf 3 стабильной экспрессии и функциональной активности встроенного гена *Fe-SOD1*.

4. Установлено, что в ризосфере растений табака и томата постоянно обнаруживаются представители родов *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium* и актиномицеты, условно объединяемые нами в группу олигоспоровых. Сравнительное изучение структуры комплексов актиномицетов

в ризосфере, не выявило у трансформированных по гену *Fe-SOD1* линий табака Ttrf 3, 13, 2, 8 и томата bn 4, 6, 34, 27 значительных количественных отличий от исходных сортов Самсун и Белый налив соответственно. Так, показатели общей численности актиномицетов, вырастающих при посеве на КГА, количество выявляемых при посевах родов и цветковых секций и серий, обилие и частота встречаемости отдельных представителей различались у сравниваемых генотипов незначительно.

5. С использованием селективных приемов из ризосферы исходных сортов и трансгенных линий томата и табака, выделено в чистую культуру в общей сложности 266 представителей мицелиальных прокариот, микроскопия которых выявила типичные для рода *Streptomyces* морфологические признаки. Выборочная идентификация выделенных штаммов, основанная на анализе фрагментов гена 16S рНК, подтвердила, что изоляты с данным морфотипом являются представителями рода *Streptomyces*, семейства *Streptomycetaceae*, порядка *Streptomyetales*, класса *Actinobacteria*. Сформирована рабочая коллекция стрептомицетов с фитостимулирующими и антагонистическими свойствами, продуцентов целлюлаз и фитогормонов.

6. В комплексах стрептомицетов, выделенных из ризосферы табака и томата, определена частота встречаемости культур, проявивших антагонистическую и целлюлозолитическую активность, способность к синтезу ауксинов, антибиотикорезистентность при лабораторном тестировании. Выявлены различия в функциональной структуре комплексов стрептомицетов, ассоциированных с корнями исходных сортов и полученных на их основе трансгенных линий, в одних и тех же условиях выращивания, в результате встройки в геном гетерологичной последовательности *Fe-SOD1*.

Перестройки в функциональной структуре актиномицетных комплексов растений-трансформантов, вызывают озабоченность, поскольку их следствием могут стать нарушения таких процессов, как биодеструкция в почве растительных полимеров и биоконтроль фитопатогенов в ризосфере растений.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, включенных в Перечень ВАК РФ:

1. Широких, И.Г. Трансформанты табака с геном *Fe-SOD1* как модель для изучения формирования алюмоустойчивости / И.Г. Широких, С.Ю. Огородникова, Е.Н. Баранова, **Я.И. Назарова**, А.А. Гулевич // *Агрохимия*. 2015. – № 2. – С.79-85.

2. Широких И.Г. Изменение структуры комплексов актиномицетов в ризосфере трансгенных по гену *Fe-SOD1* линий томата (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L., *SOLANACEAE*, *SOLANALES*) // И.Г. Широких, **Я.И. Назарова**, С.Ю. Огородникова, Е.Н. Баранова // *Поволжский экологический журнал*. – 2016. – № 3. – С.341-351.

3. Широких, И.Г. Оценка и мониторинг воздействия генетически модифицированных растений на почвенные микроорганизмы в агроэкосистемах /И.Г. Широких, **Я.И. Назарова**, А.В. Бакулина // *Теоретическая и прикладная экология*. - 2016. - № 3. – С.4-13.

Статьи в изданиях, включенных в мировую базу данных научного цитирования Scopus:

4. Shirokikh, I.G. Impact of the genetically engineered enhancement of the antioxidant protection of tobacco on the streptomycete complex in the rhizosphere of transformant plants / I.G. Shirokikh, **Y. I. Nasarova**, A.A. Shirokikh, S.Y. Ogorodnikova, E.V. Tovstik, E.N. Baranova // Contemporary problems of ecology. – 2015. – Т. 8. – V. 6. – P.798-803.

5. Широких И. Г. Сообщества актиномицетов в бурозёмах лесных экосистем с различным типом климата / И. Г. Широких, **Я. И. Назарова**, А. А. Широких, Т. Я. Ашихмина // Теоретическая и прикладная экология. – 2018. – № 1. – С. 80-87.

Статьи в других научных изданиях:

6. **Назарова, Я.И.** Изменчивость комплексов мицелиальных микроорганизмов в ризосфере трансгенного табака / Я.И. Назарова, И.Г. Широких, А.А. Широких // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем: Матер. XII Всеросс. науч.-практ. конф. (Киров, 2-3 дек. 2014 г.). – Киров: Изд-во ООО «Веси». – 2014. – С.284-289.

7. **Назарова, Я.И.** Оценка потенциальных рисков использования трансгенных растений для почвенной микробной системы / Я.И. Назарова, Е.В. Товстик, Р.И. Абубакирова, И.Г. Широких // Экология и почвы: Матер. XIX Всеросс. Школы «Экология и почвы» (Пушино, 14-16 окт. 2014 г.). – Том X. Пушино: ИФХиБПП РАН. – 2014. – С.28.

8. **Назарова, Я.И.** Сравнение исходного сорта и генетически модифицированной линии томата по показателям перекисного гомеостаза и структуре ризосферного комплекса микроорганизмов / **Я.И. Назарова**, С.Ю. Огородникова, Р.И. Абубакирова, И.Г. Широких // Знания молодых: наука, практика и инновации: сб. науч. трудов XV Междунар. науч.-практ. конф. Ч.2. Агронимические, биологические, ветеринарные науки. – Киров: ВГСХА. 2015. – С.50-54.

9. Широких, А.А. Особенности структуры комплекса микроскопических грибов в ризосфере трансгенного табака / А.А. Широких, **Я.И. Назарова**, О.В. Рябова, И.Г. Широких // Современная микология в России. Матер. III Междунар. микол. форума. – Москва. 14 – 15 апр. 2015г. М.: Нац. акад. микол. 2015. Том 5. – С.146-147.

10. **Назарова, Я.И.** Сравнение функциональной активности актиномицетов в ризосфере томата исходного сорта и генетически модифицированной линии // Я.И. Назарова, И.Г. Широких, Е.Н. Баранова // Роль почв в биосфере и жизни человека: Междунар. науч. конф.: К 100 летию со дня рождения академика Г.В. Добровольского, Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова, 5-7 окт. 2015г.: Матер. докл. – М.: МАКС Пресс. 2015. – С.217-218.

11. Товстик, Е.В. Скрининг среди стрептомицетов штаммов-продуцентов аукусинов / Е. В. Товстик, **Я. И. Назарова**, И. Г. Широких // Матер. II Межд. науч.-практ. конф. «Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах». 19-23 окт. 2015 г. – Киров: ВГСХА. 2015. – 264-267.

12. **Назарова, Я.И.** Поиск штаммов стрептомицетов, перспективных для создания биопрепаратов с комплексным фиторегуляторным действием / Я.И. Назарова, И.Г. Широких // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем: Матер. XIII Всеросс. науч.-практич. конф. (Киров, 1-2 дек. 2015 г.). – Киров: Изд-во «Веси». – 2015. – С.287-289.

13. **Назарова, Я.И.** Оценка потенциальных рисков использования генетически модифицированных растений для почвенной микробной системы / Я.И. Назарова, И.Г. Широких // Знания молодых: наука, практика и инновации: Сб. науч. трудов XVI Междунар. науч.-практ. конф. Ч.1. Агронимические, биологические, ветеринарные науки. – Киров: ВГСХА. – 2016. – С. 44-49.

14. **Назарова, Я.И.** Сравнительная оценка ризосферных микробных комплексов табака и томата при генетической модификации растений / Я.И. Назарова // Актуальные проблемы биологии и экологии: Матер. докл. XXIII Всеросс. молод. науч. конф. Сыктывкар. – 2016. – С.198-200.

15. Бакулина, А.В. Культивирование и агробактериальная трансформация картофеля сортов Беллароза и Пранса / А.В. Бакулина, **Я.И. Назарова** // Методы и технологии в селекции растений и растениеводстве: Киров: НИИСХ Северо-Востока. – 2016. – С.20-24.
16. Широких, И.Г. Комплекс актиномицетов в ризосфере *Nicotiana tabacum* с неустойчивой экспрессией гетерологичного гена *Fe-SOD1* / И.Г. Широких, **Я.И. Назарова** // Методы и технологии в селекции растений и растениеводстве. Киров: НИИСХ Северо-Востока. – 2016. – С.295-299.
17. **Назарова, Я.И.** Свойства изолятов стрептомицетов из ризосферы трансгенного табака (*Nicotiana tabacum*) / Я.И. Назарова, И.Г. Широких // Экология родного края: проблемы и пути их решения: Сб. матер. Всеросс. науч.-практич. конф. Книга 1. (28-29 апр. 2016 г.). Киров: Изд-во «Радуга-ПРЕСС». 2016. – С.161-164.
18. **Назарова, Я.И.** Оценка функциональной активности гетерологичного гена *Fe-SOD1* у *Solanum lycopersicum* L. В T2 / Я.И. Назарова, С.Ю. Огородникова, И.Г. Широких // «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность»: сборн. статей по матер. VI Всеросс. симпозиума (16-21 нояб. 2016 г.). Москва: ИФР РАН. – 2016. – С. 140-143.
19. **Назарова, Я.И.** Скрининг стрептомицетов-антагонистов фитопатогенных грибов для биологической защиты растений / Я.И. Назарова, Т.К. Шешегова, Л.М. Шеклеина, И.Г. Широких // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем: Матер. XIV Всеросс. науч.-практич. конф. (Киров, 5-8 дек. 2016 г.). – Киров: ООО Изд-во «Радуга-ПРЕСС». – 2016. – С.350-354.
20. **Назарова, Я.И.** Сравнение микробных комплексов на корнях томата исходного генотипа и трансформантов по гену *FeSOD1* в поколении T2 / Я.И. Назарова, И.Г. Широких // Матер. междунар. науч.-практич. конф. «Современные проблемы инновационного развития сельского хозяйства и научные пути технологической модернизации АПК». 20–23 дек. 2016г. Махачкала. – 2016. – С. 68-73.
21. **Назарова, Я. И.** Реакция проростков пшеницы на инокуляцию мицелиальными микроорганизмами / Я.И. Назарова // Матер. XV Междунар. студенч. науч. конф.: Сб. науч. трудов. В 4 ч. Ч.1. Агрономические, биологические, ветеринарные науки. – Киров: ФГБОУ ВО Вятская ГСХА. – 2017. – С. 45-46.
22. **Назарова, Я. И.** Поиск перспективных штаммов стрептомицетов с биоконтрольным действием. / Я. И. Назарова, И. Г. Широких // Сб. науч. докл. XX Междунар. науч.-практ. конф. «Аграрная наука – сельскохозяйственному производству Сибири, Казахстана, Монголии, Беларуси и Болгарии» (4-6 окт. 2017 г.). Новосибирск. – 2017. – С. 25-28.
23. **Назарова, Я.И.** Оценка экологической безопасности трансгенных растений / Я.И. Назарова, И.Г. Широких // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем: Матер. XV Всеросс. науч.-практич. конф. с междунар. уч. Книга 2. (Киров, 4-6 дек. 2017 г.). – Киров: ВятГУ. – 2017. – С. 67-71.
24. Широких, И. Г. Актиномицеты в почве и ризосфере: подходы к формированию почвенной супрессивности / И.Г. Широких, **Я.И. Назарова** // Матер. IV Междунар. науч.-практич. конф. «Методы и технологии в селекции растений и растениеводстве». Киров: ФАНЦ Северо-Востока. – 2018. – С.313-317.
25. Бакулина, А. В. Анализ мирового производства генетически модифицированных сортов растений / А. В. Бакулина, **Я. И. Назарова**, И. Г. Широких // Экология родного края: проблемы и пути их решения: Матер. XIII Всеросс. науч.-практич. конф. с междунар. уч. Книга 2. (Киров, 23-24 апр.2018 г.). Киров: ВятГУ. – 2018. – С. 104-107.
26. **Назарова, Я.И.** Синтез ауксинов культурами актиномицетов из различных субстратов / Я. И. Назарова // Сб. докладов 2-й Всеросс. интернет-конф. молодых ученых и специалистов с междунар. участием, «НИИСХ Юго-Востока» (26-28 февр. 2018 г.). Саратов: «Научная книга». – 2018. – С. 235-239.

27. **Назарова, Я.И.** Гемагглютинирующая способность стрептомицетов из ризосферы некоторых представителей *Solanaceae* / Я.И. Назарова, А.В. Бакулина, О.М. Безмельцева, М.И. Сергушкина, И.Г. Широких // Сб. тезисов Межд. науч. конф. PLAMIC 2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего». Уфа. – 2018. – С. 206.

28. Бакулина А.В. Изучение колонизирующей способности двух штаммов стрептомицетов / А.В. Бакулина, **Я.И. Назарова**, И.Г. Широких // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем: Матер. XV Всеросс. науч.-практ. конф. с междунар. уч. Книга 1. (Киров, 3-5 дек. 2018 г.). – Киров: ВятГУ. – 2018. – С. 221-225.

29. **Назарова Я.И.** Изучение влияния ризосферного штамма *Streptomyces sp.* ТК-5 на рост меристемного картофеля / Я.И. Назарова, А.В. Бакулина, И.Г. Широких // Матер. Межд. науч.-практич. конф., посв. 100-летию со дня рождения А.Ф.Тимофеева. Ч.2. – Киров: ВГСХА. – 2019. – С. 192-196.