

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока
имени Н.В. Рудницкого»

На правах рукописи



Назарова Янина Иордановна

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

03.02.08 – Экология (биология)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Широких Ирина Геннадьевна

Киров – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ КАК МЕЖДУНАРОДНАЯ АГРОЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОБЛЕМА XXI ВЕКА	11
1.1 Распространение ГМ растений в мировом сельскохозяйственном производстве	11
1.2 Экологические риски производства ГМ растений	16
1.3 Воздействие ГМ растений на микрофлору почвы.....	26
1.4 Роль актиномицетов в почве и ризосфере растений.....	41
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	49
2.1 Объекты исследования.....	49
2.2 Методы исследования.....	51
2.2.1 Учет, выделение и идентификация актиномицетов.....	53
2.2.2 Определение таксономической и функциональной структуры комплекса актиномицетов.....	57
ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАТИВНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АКТИНОМИЦЕТОВ С РАСТЕНИЯМИ СЕМЕЙСТВА SOLANACEAE (НА ПРИМЕРЕ КАРТОФЕЛЯ).....	63
3.1 Характеристика некоторых физиолого-биохимических свойств ризосферных изолятов актиномицетов.....	63
3.2 Таксономическое положение изолятов	64
3.3 Колонизация растений картофеля стрептомицетами.....	67
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ НЕЗАВИСИМЫХ ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЙ ТАБАКА И ТОМАТА	72
4.1 Оценка функциональной активности гетерологичного гена <i>Fe-SOD1</i> в вегетативном потомстве ГМР	72
4.1.1 Результаты проверки трансгенных линий томата.....	72
4.1.2 Результаты проверки трансгенных линий табака.....	77
ГЛАВА 5. ЧИСЛЕННОСТЬ, РАЗНООБРАЗИЕ И ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА РИЗОСФЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ АКТИНОМИЦЕТОВ.....	83

5.1 Численность и структура комплексов актиномицетов в ризосфере ГМ и исходных сортов томата.....	83
5.2 Численность и структура комплексов актиномицетов в ризосфере ГМ и исходных сортов табака.....	91
ГЛАВА 6. СРАВНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСОВ АКТИНОМИЦЕТОВ В РИЗОСФЕРЕ ГМ И ИСХОДНЫХ СОРТОВ ТОМАТА И ТАБАКА.....	98
6. 1 Целлюлозолитическая активность ризосферных изолятов.....	98
6.2 Антагонистическая активность ризосферных изолятов.....	102
6.3 Чувствительность к антибиотикам ризосферных изолятов.....	108
6.4 Синтез ауксинов ризосферными изолятами	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	122
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	124
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	152

ВВЕДЕНИЕ

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 растительных полимеров, в частности, 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-COD1* из *Arabidopsis thaliana*, 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-COD1* 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 гг.); «Экология родного края: проблемы и пути их решения» (Киров, 2016г.); Всероссийских молодежных научных конференциях «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2016г.); «Экология и почвы» (Пушино, 2014 г.); Всероссийском симпозиуме «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность» (Москва, 2016г.); Конкурсе «Молодежь в экологии» в рамках Форума «Эко-Киров» (Киров, 2017 г.); Международных научно-практических конференциях аспирантов и молодых ученых «Знания молодых: наука, практика и инновации» (Киров, 2015, 2016, 2017 г.); Международных научно-практических конференциях «Аграрная наука: развитие и перспективы» (Украина (Николаев), 2015, 2016 г.); «Роль почв в биосфере и жизни человека» (Москва, 2015 г.); «Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах» (Киров, 2015 г.); «Методы и технологии в селекции и растениеводстве (Киров, 2016г.); «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Уфа, 2018 г.); «Мелиорация почв для устойчивого развития сельского хозяйства» (Киров, 2019 г.).

Работа по теме диссертационного исследования была отмечена дипломами I степени за лучший доклад на XV Международной научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых «Знания молодых: наука, практика и инновации» (Киров, 2015 г.); за I место на Всероссийской

научно-практической конференции «Экология родного края: проблемы и пути их решения» (Киров, 2016 г.).

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.

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.б.н. Широких И.Г. за неоценимую помощь в подготовке диссертации. Искреннюю благодарность автор адресует к.б.н. Барановой Е.Н., к.б.н. Огородниковой С.Ю., д.б.н. Широких А.А., , д.б.н. Полежаевой Т.В., Сергушкиной М.И. за содействие на разных этапах выполнения работы, благодарит также сотрудников лаборатории биотехнологии растений и микроорганизмов ФГБНУ «ФАНЦ Северо-Востока» за дружескую поддержку.

ГЛАВА 1. ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ КАК МЕЖДУНАРОДНАЯ АГРОЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОБЛЕМА XXI ВЕКА

1.1 Распространение ГМ растений в мировом сельскохозяйственном производстве

Успехи молекулярной биологии воплотились в 20 веке в разработке новых генно-молекулярных технологий, которые первоначально сопровождались оптимизмом в отношении скорого разрешения многих вопросов, связанных с решением продовольственной проблемы. Генная инженерия представлялась областью науки, которая революционизирует мир, манипулируя генами живых организмов, с целью придания им желаемых признаков (Ren et al., 2017). Среди преимуществ, связанных с внедрением генетически модифицированных (ГМ) организмов в сельское хозяйство, называли:

- 1) повышение устойчивости к температурным стрессам, различному качеству почв, устойчивости к гербицидам, что приведет к увеличению урожайности;
- 2) улучшение вкусовых качеств;
- 3) снижение стоимости продукции, за счет экономии на средствах химической обработки почв и растений, экономии на сельхозтехнике;
- 4) снижение стоимости выращивания ГМ-культур за счет стабильного урожая;
- 5) включение в конечный продукт на уровне генов большого количества полезных человеку витаминов (Querci, 2006).

Несмотря на оптимистические ожидания, в настоящее время практических доказательств тому, что ГМО действительно будут основным решением проблемы нехватки продовольствия, нет (Гузырь, Горюнова,

2015). Однако продукты новых рекомбинантных технологий - генетически модифицированные сорта растений во многих странах уже вышли из лабораторий на поля и рекордными темпами завоевывают продовольственные и сельскохозяйственные рынки.

Коммерческое выращивание генетически модифицированных (ГМ) культур началось в 1996 году. С тех пор во всем мире было коммерциализировано 357 ГМ культур, относящихся к 27 видам (Clive, 2014). Это число постоянно увеличивается. С 1994 по 2017 год, в общей сложности в 40 странах, регулируемыми органами были приняты разрешительные документы на использование ГМ сельскохозяйственных культур в пищевых и кормовых целях, а также на выращивание ГМ культур в производственных масштабах (GM Approval Database...2018). Засеваемые ими площади непрерывно увеличиваются и составили в 2017 году уже около 189,8 миллионов гектаров. Ежегодно до 17 миллионов фермерских хозяйств выращивают ГМ культуры в 24 странах, причем 90% этих хозяйств приходится на развивающиеся страны (табл. 1).

Около 90% площади, засеваемой ГМ культурами (как пищевыми, так и кормовыми и техническими), принадлежит пяти странам (США, Бразилия, Аргентина, Канада и Индия). После США, Бразилия – второй по величине производитель ГМ культур (25% от мирового производства), на третьем месте – Аргентина, Канада заняла четвертое место, а на пятом месте находится Индия.

Посевные площади, занятые под трансгенными сортами сои, кукурузы, хлопчатника, сахарной свеклы, картофеля, рапса, льна увеличиваются примерно на 10% ежегодно. Основной ГМ культурой на настоящий момент является соя, после которой, по объему выращивания, следуют кукуруза, хлопчатник и рапс.

Таблица 1 – Общая площадь ГМ-культур в динамике по странам (по данным ISAAA (GM Approval Database, дата обращения март 2019))

№ п/п	Страна	Площадь (млн га)			Генетически модифицированные культуры
		2015г	2016г	2017г	
1	США	70,9	72,9	75,0	Кукуруза, соя хлопок, рапс, сахарная свекла, люцерна, папайя, тыква, картофель
2	Бразилия	44,2	49,1	50,2	Соя, кукуруза, хлопок
3	Аргентина	24,5	23,8	23,6	Соя, кукуруза, хлопок
4	Индия	11,6	10,8	11,4	Хлопок
5	Канада	11,0	11,6	13,1	Рапс, кукуруза, соя, сахарная свекла,
6	Китай	3,7	2,8	2,8	Хлопок, папайя, тополь
7	Парагвай	3,6	3,6	3,0	Соя, кукуруза, хлопок
8	Пакистан	2,9	2,9	3,0	Хлопок
9	ЮАР	2,7	2,7	2,7	Кукуруза, соя, хлопок
10	Уругвай	1,4	1,3	1,1	Соя, кукуруза
11	Боливия	1,1	1,2	1,3	Соя
12	Филиппины	0,7	0,8	0,6	Кукуруза
13	Австралия	0,7	0,9	0,9	Хлопок, рапс
14	Буркина-Фасо	0,4	-	-	Хлопок
15	Мьянма	0,3	0,3	0,3	Хлопок
16	Мексика	0,1	0,1	0,1	Хлопок, соя
17	Испания	0,1	0,1	0,1	Кукуруза
18	Колумбия	0,1	0,1	0,1	Хлопок, кукуруза
19	Судан	0,1	0,1	0,2	Хлопок
20	Гондурас	<0,1	<0,1	<0,1	Кукуруза
21	Чили	<0,1	<0,1	<0,1	Кукуруза, соя, рапс
22	Португалия	<0,1	<0,1	<0,1	Кукуруза
23	Вьетнам	<0,1	<0,1	<0,1	Кукуруза
24	Чешская Республика	<0,1	<0,1	-	Кукуруза
25	Словакия	<0,1	<0,1	-	Кукуруза
26	Коста-Рика	<0,1	<0,1	-	Хлопок, соя
27	Бангладеш	<0,1	<0,1	<0,1	Баклажан
28	Румыния	<0,1	-	<0,1	Кукуруза
	Всего	179,7	185,1	189,8	

Соя выращивается на 94,1 млн га, это 50% от общих площадей занятых под трансгенными культурами, по сравнению с 2016 г. произошло

увеличение этого показателя на 3%. Далее по объему выращивания следует кукуруза – 59,7 млн га, хлопок – 24,2 млн га, рапс – 10,2 млн га (рис.1).

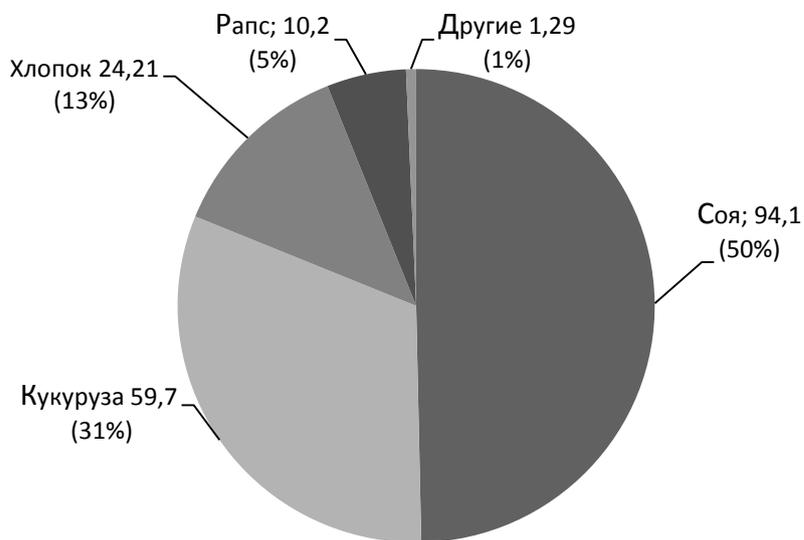


Рисунок 1 – Выращивание биотехнологических культур в 2017 г по площадям (млн га) (по данным ISAAA (GM Approval Database, дата обращения март 2019))

Из общего количества стран, выращивающих ГМ культуры в 2017 году, 19 были развивающимися, а 5 - развитые страны. До 2011 года развитые страны имели под ГМ растениями площади, большие, чем развивающиеся, а к 2011 году мировая площадь ГМ культур равномерно распределилась между развитыми и развивающимися странами. Начало 2012 года, характеризовалось последовательным увеличением площадей в развивающихся странах, а уже в 2017 году разница между развивающимися и развитыми странами составила 11,4 млн га в пользу развивающихся. Тенденция к увеличению доли ГМ культур в развивающихся странах, скорее всего, продолжится и в дальнейшем. Во-первых, из-за того, что большинство стран южного полушария приняли ГМ культуры, во-вторых, – принятие такой культуры, как рис, 90% из которого выращивается в развивающихся странах (Clive, 2018).

Первыми и наиболее популярными изменениями генома с помощью рекомбинантной ДНК стали такие признаки как устойчивость к гербицидам и защита от насекомых-вредителей (в том числе оба изменения сразу) (Lombardo, 2016). Предполагалось, что они способны повысить урожай и минимизировать наносимый ущерб окружающей среде: инсектицидные (Bt-защищенные культуры) – за счет снижения количества вносимых пестицидов, а устойчивые к гербицидам – за счет применения «экологически чистого» гербицида глифосата. Благодаря внедрению ГМ культур появилась возможность перехода от дорогостоящих комбинаций гербицидов к применению одного из средств широкого спектра, таких как глифосат и глюфосинат, имеющую меньшую токсичность, как для человека, так и для окружающей среды (Carroll, 2017). Кроме того, выращивание устойчивых к гербицидам ГМ культур часто облегчает переход к противоэрозийным методам обработки почвы, для предотвращения деградации почвенного покрова (Brimner et al., 2005, Duke, 2005). Именно «экологичность» трансгенных растений повлияла на активное внедрение их в производство, и, в первую очередь это произошло в развитых странах (Викторов, 2016).

Самые большие площади Bt-защищенных культур принадлежали Латинской Америке, где лидером является Бразилия, за которой следует Аргентина. В Азии кукурузу, устойчивую к гербицидам и вредителям впервые начал выращивать Вьетнам, а культивировать Bt-устойчивые баклажаны, «золотой» рис, картофель и хлопчатник начали в Бангладеш. В Бразилии утверждена для коммерческого использования с 2018 г. сахарная свекла, устойчивая к вредителям (Clive, 2017).

На Филиппинах на протяжении 16 лет успешно выращивают ГМ кукурузу. Китай получает существенную прибыль от выращивания Bt-устойчивого хлопчатника. Индия в 2015 году стала государством номер один

по производству хлопка в мире, в значительной степени — за счет Вt-устойчивых сортов (Clive, 2016).

Тщательный анализ из 147 исследований, проведенных за последние 20 лет, показал, что в среднем внедрение ГМ технологий привело к снижению количества вносимых химических пестицидов на 37%, увеличению урожайности на 22%, а прибыли фермеров – на 68% (Qaim et al., 2014). Эти данные подтверждены результатами других ежегодных исследований (Brookes и др., 2015; Clive, 2016, 2017).

1.2 Экологические риски производства ГМ растений

В связи со стократным увеличением во всем мире площадей (в 1996 году 1,7 млн га), занятых генетически модифицированными сельскохозяйственными культурами, необходима оценка экологических рисков их возможного негативного воздействия на окружающую среду. Считается, что употребление ГМО в пищу способно оказывать негативное действие на человека в силу различных факторов (Чемерис, 2014). Однако все эксперименты, направленные на определение безопасности ГМ продукции, не смогли представить доказательства ее вреда не только для жизни и здоровья потребителя, но и состояния окружающей среды. Для выявления и, в дальнейшем, минимизации возникающих угроз должны проводиться исследования нежелательных влияний ГМ-культур на окружающую среду. В их основу положено понимание влияния ГМ-культур на сокращение биоразнообразия, устойчивое развитие и эволюцию сообществ (Thomson, 2003). В результате оценки нецелевых эффектов модифицированных растений отмечают, что избежать нецелевых эффектов невозможно не только в генной инженерии, но и в обычной селекции (Ladics,

2015). Генетическим источником таких изменений могут быть вставки или удаление генов, связанных с производством рекомбинантного белка.

В то время как медико-биологическая безопасность ГМ-растений и продуктов из них стала предметом горячих дискуссий в международном сообществе (Hartung, Schiemann, 2014), вопросам потенциальных рисков трансгенов для окружающей среды и процессов эволюции до сих пор уделялось гораздо меньшее внимание. Медико-биологические и экологические последствия трансгенных растений проанализированы далеко не в одинаковой степени. Это связано с недостаточной изученностью большинства показателей экологических факторов, нарушения которых могут происходить в агроландшафте под воздействием трансгенных растений.

Распространение ГМО даже теоретически может представлять определенную опасность для окружающей среды и через нее — для человека и человечества в целом. По мнению противников трансгенной продукции, одна из опасностей может заключаться в неконтролируемом переносе генов, отвечающих за устойчивость к гербицидам, благодаря чему повышается вероятность появления на полях так называемых «суперсорняков», избавиться от которых будет чрезвычайно трудно. Кроме того, природные ресурсы оказываются под угрозой вследствие снижения чувствительности к глифосату насекомых и сорняков и как результат — увеличение количества применяемого глифосата (Brannon, 2016). Постоянное давление, оказываемое на биоту агроландшафта одним - двумя неизбирательными гербицидами и энтомотоксинами, рано или поздно приведет к сукцессии вредных видов, возникновению у них резистентности к средствам защиты, снижению разнообразия биоты и обеднению генофонда агроценоза. Для сдерживания естественного отбора устойчивых к гербицидам системного (неизбирательного) действия и энтомотоксинам (сорняков и вредителей)

необходимо создавать в посевах "острова безопасности", где выращивать либо нетрансгенные сорта, либо другие восприимчивые культуры.

Другая опасность генетически модифицированных растений, в особенности Bt-защищенных, может быть связана с тем, что продуцируемые ими токсины, с некоторой вероятностью, способны повлиять и на полезных насекомых.

Вызывают совершенно оправданные опасения непредсказуемость встраивания в геном растения чужеродного фрагмента ДНК, наличие во встраиваемом фрагменте ДНК генов устойчивости к антибиотикам, риски снижения сортового разнообразия сельскохозяйственных культур, неконтролируемый перенос конструкций ДНК, а также риски, связанные с поражением токсичными трансгенными белками нецелевых организмов – насекомых и почвенной микрофлоры, наконец – возможность создавать биологическое оружие.

Вполне вероятно, что массовое внедрение в агроценозы трансгенных растений, обладающих одним или несколькими полезными свойствами, может привести к резкому сокращению ассортимента сортов и видового разнообразия возделываемых культур вследствие их недостаточной конкурентоспособности с трансгенными формами. При этом возрастает вероятность загрязнения уникальных мировых коллекции растений, в результате непреднамеренного переопыления (Devos, 2009).

Проблема трансгенного "загрязнения" агроландшафтов уже вышла из области теоретических диспутов и стала причиной судебных разбирательств. Перенос пыльцы ГМ-растений к их диким сородичам ускорил процесс появления гербицидоустойчивых сорняков для перекрестно опыляемых видов (рис, рапс, подсолнечник, кукуруза, сахарная свекла) (Ермишин, 2013).

Беспокойство вызывает и неконтролируемое распространение генов устойчивости к антибиотикам, которые часто используются на разных этапах

трансформации растения (Гизбуллин, 2014). Эти опасения имеют право на существование, однако пока нет научных исследований, которые бы достаточно четко оценили действительную угрозу таких явлений.

Горизонтальная передача генов (ГПГ) играет важную роль в распространении большинства генетических признаков у прокариотов, особенно для адаптации бактерий к новым экологическим нишам (Syvanen, 2012; Lanza et al., 2015). Кроме того, ГПГ затрагивает проблему, касающуюся переносов генов от бактерий к эукариотам, так как подвижные генетические элементы прокариотов влияют не только на образ жизни бактерий, но и на эволюцию сложных эукариотических организмов (Lacroix, 2016). Работы по этой проблеме проводятся в рамках Международного проекта "Исследования безопасности горизонтального переноса генов от генетически модифицированных организмов в микрофлору пищевых цепей и кишечника человека". Предполагается, что перенос генов из растений в микроорганизмы, в том числе патогенные, может произойти в желудочно-кишечном тракте теплокровных или даже в ротовой полости (Ellstrand et al., 2003; Hoffman, 1990).

Проявление последствий ГПГ можно ожидать в регионах с перекрывающимися зонами произрастания или одновременно протекающими периодами цветения ГМ культур и традиционных сортов, близкородственных сорных или дикорастущих видов (Мирошниченко и др., 2012). Частота гибридизации может значительно изменяться в зависимости от линии ГМ растения и особенностей дикой популяции (Михайлова, Кулуев, 2013). Значительная часть имеющихся данных о переносе генов основана на результатах мелкомасштабных полевых экспериментов. Несмотря на то, что эти исследования предоставляют ценную информацию для регламентирования безопасных расстояний (изоляции) при проведении предварительных испытаний по выращиванию ГМ растений, неясно, в какой

степени эти результаты могут быть использованы при выращивании ГМ растений в производственном масштабе. Полученные данные свидетельствуют о том, что распространение пыльцы и миграция генов с сельскохозяйственных полей намного больше, чем наблюдаемые на опытных участках (Wilkinson et al., 1995).

В связи с широким спектром прогнозируемых последствий использования рекомбинантных технологий в сельскохозяйственном производстве закономерно встает вопрос о биобезопасности ГМ растений. Суть понятия биобезопасность сводится к комплексу мероприятий, направленных на предупреждение или уменьшение влияния биологических факторов, или других вредных воздействий, источником которых выступают объекты биологического происхождения, на организм человека и на окружающую среду (Фитюхина, 2012).

После публикации первого доклада об экологических рисках ГМО (Sharple, 1982) научное сообщество сосредоточило внимание на негативных последствиях и инструментах оценки такого воздействия. С помощью различных подходов к анализу оценки риска ГМО, подтверждена возможность возникновения рисков от посевов ГМ культур, о которых ранее не говорилось (Regal, 1986). В проведенных в США исследованиях установлена зависимость между выращиванием ГМ растений и использованием пестицидов. За восемь лет исследований возросли продажи активно используемых химикатов при выращивании устойчивых к гербицидам растений (Баранов, 2007). По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), каждый год в мире регистрируют порядка 1,5 млн отравлений пестицидами, причинами которых являются их небезопасное использование, хранение и утилизация (Окружающая среда..., 2017).

Получили подтверждения экологические риски при использовании устойчивых к гербициду сортов растений, в результате появились

суперсорняки с устойчивостью к гербицидам (Roy et al., 2003). Так, опубликованы данные о появлении нового вида сорняка – полевой ГМ горчицы с устойчивостью к гербициду глифосат. По мнению авторов, при выращивании ГМ масличного рапса (*Brassica napus*) с устойчивостью к глифосату, произошло спонтанное скрещивание ГМ рапса и дикорастущей полевой горчицы (*Brassica rapa*), в результате чего сорняку передалась устойчивость к гербициду (Warwick et al., 2008).

Кроме того, в местах, где ГМ культуры произрастали длительное время на больших площадях, отмечены факты появления растений того же вида, содержащие в геноме гетерологичные последовательности. Загрязнение распространяется и на регионы, где ГМ культуры не были официально разрешены (Price, 2014).

Следовательно, в течение последних трех десятилетий экологическая безопасность была предметом исследования, а оценка влияния ГМ культур на окружающую среду стала важной в разработке и развитии ГМО, а также в международном законодательном процессе (De Schrijver et al., 2015).

На сегодняшний день имеется ряд международных соглашений, регламентирующих обеспечение и сохранение высокого уровня защиты в области безопасной передачи и использования трансгенных растений. Основы регулирования отношений, связанных с производством и оборотом ГМО, на законодательном международном уровне были заложены еще до промышленного производства трансгенных продуктов, когда стала понятной их неизбежность. В Рио-де-Жанейро, в ходе Конференции Организации Объединенных Наций по окружающей среде и развитию в июне 1992 г. была принята Конвенция по биологическому разнообразию, которая предоставляет право правительствам разных стран самостоятельно решать вопрос о пользе или вреде трансгенной продукции (Доклад Конференции..., 1993). В 2000 г., в Монреале был принят Картахенский протокол по биобезопасности

(Картахенский протокол..., 2000), в документе прописан принцип предосторожности – если какой-либо вид деятельности несет в себе угрозу или вероятность нанесения вреда здоровью человека или окружающей среде, должны приниматься меры предосторожности, даже в случаях, когда причины до конца не исследованы, или научно не обоснованы. Применительно к проблеме ГМО это может звучать так: страна имеет право отказаться от импорта ГМО, опасаясь негативных последствий в отношении окружающей среды и здоровья людей (Алешков, 2017).

Национальные интересы России в сфере экологии заключаются в сохранении и оздоровлении окружающей среды. Мировой опыт в коммерческом использовании ГМ сортов растений в агропромышленном производстве, этому противоречит. По причине малой изученности возможных отрицательных воздействий ГМО на живые системы, экологические последствия коммерческого использования трансгенных растений, функционирование и стабильность природных и агробиоценозов остаются непредсказуемыми. Из опыта отечественных и зарубежных исследований, в настоящее время можно обсуждать следующие группы экологических рисков при использовании ГМО в коммерческих целях:

1. Неконтролируемое распространение чужеродных генов «горизонтальный перенос» в популяции культурных, традиционных сортов и дикорастущих растений может привести к нарушению равновесия в биоценозах и засорению традиционных сортов трансгенными вставками и, в дальнейшем, к снижению биоразнообразия или полному их уничтожению.

2. Риски неконтролируемого горизонтального переноса трансгенных конструкций в почвенную микробную систему. Первые данные по оценке рисков горизонтального переноса трансгенных конструкций от растений к почвенным бактериям опубликовали в 1994 г. (Smalla et al., 1994; Becker et al., 1994). Проанализировав результаты полевых испытаний, авторы

(Коттер, 2005) смогли привести ряд убедительных доказательств, что применяемые методики несовершенны. В доступности исследователей оказываются только 10% бактериальной флоры. В условиях эксперимента была продемонстрирована возможность переноса трансгенных конструкций от растений к бактериям (Nielsen et al., 1997; Gebhard, 1998).

3. Негативное влияние вырабатываемых трансгенными растениями токсичных белков на биоразнообразие нецелевых насекомых и почвенной микрофлоры, и как следствие, нарушение трофических цепей. Биоразнообразие живых почвенных организмов, при выращивании ГМ культур, за один сезон снижается в три раза, что приводит к деградации почвенного плодородия.

4. Быстрый отбор насекомых, невосприимчивых к энтомопатогенным токсинам, продуцируемым ГМ растениями. Уже существуют некоторые насекомые-вредители, которые образовали популяции устойчивые к действию Bt-токсина (Samuel, 2013). У насекомых изменяется тип питания, и они переходят на другие виды растений, что влечет замену одних вредителей на другие (Кашьяп, 1998). В обзорах, посвященных данной проблеме, отмечены факты негативного влияния Bt-токсинов, выделяемых трансгенными культурами, не только на насекомых, которые являются природными сельскохозяйственными вредителями, но и на другие нецелевые организмы (Dale et al., 2002; Tabashnik, 2003).

5. Появление новых патогенных штаммов фитовирусов, в результате генетической рекомбинации между трансгенами и генами природных вирусов.

6. Увеличение расхода в сельскохозяйственных посевах химических веществ, что ведет к обострению проблемы химического загрязнения окружающей среды.

Проблема регулирования экологических рисков стоит особенно остро. Современные национальные и международные законодательства учитывают только фактически подтвержденные негативные действия новых технологий на природу, что означает в отношении ГМО, необратимые изменения окружающей среды (Beckie et al., 2001).

В обеспечении биобезопасности современных биотехнологий по созданию трансгенных организмов, на первом месте стоит отбор известных, проверенных природных генов (Приложение) и их регуляторных генетических элементов, а так же создание на их основе векторов, которые обеспечивают трансгенам заданные свойства (Цаценко, 2016).

Разработка и постоянное применение эффективных методов мониторинга, прежде всего, за составом и свойствами белковых составляющих вновь созданных генотипов (Приложение), позволяет заранее, на этапе создания ГМО, выявлять опасные генотипы и контролировать их выпуск из лаборатории и применение в производстве.

Как известно, в мире неизменно растёт спрос на экологически чистую продукцию. Россия в этой области имеет большой потенциал, но в случае экспансии ГМО на сельскохозяйственный рынок России, способно навсегда исключить такую перспективу (Оденцева, 2016), поэтому уделяется особое внимание контролю ввоза, производства и использования в пищевой промышленности продуктов, полученных с помощью ГМО (Фирова, Глазов, 2015). Согласно постановлению Правительства РФ от 30 января 2017 года № 103 «О внесении изменения в положение о Федеральной службе по ветеринарному и фитосанитарному надзору» на Россельхознадзор возложены функции по контролю над ввозом в Россию ГМО и семян в пунктах пропуска через государственную границу (Постановление Правительства..., 2017).

Законодательство в области регулирования оборота ГМО в европейских странах основано на «принципе предосторожности», тогда как

США, Канада, КНР и другие страны, приняли концепцию существенной эквивалентности «substantial equivalence», разработанную Продовольственной и сельскохозяйственной организацией ООН, Всемирной Организацией Здравоохранения и Организацией экономического сотрудничества и развития вначале 1990-х гг. (Алешков, Каленик, 2015). Концепция существенной эквивалентности предлагает считать ГМ продукты питания такими же безопасными, как и не ГМ продукты, так как уровень изменчивости их основных свойств и погрешности в опытах сопоставимы. Поэтому в КНР производителей не обязывают маркировать соответствующим образом продукцию, содержащую ГМО — считается, что формально это – то же самое, что и обычная продукция, причем прошедшая жесткую процедуру допуска на рынок (Алешков, 2007).

Ситуация в России. В России регистрация трансгенных растений контролируется Межведомственной комиссией по проблемам генно-инженерной деятельности, созданная при Министерстве промышленности, науки и технологий РФ в 1997 году. Постановлением Правительства Российской Федерации № 839 от 23 сентября 2013 г. «О государственной регистрации ГМО, предназначенных для выпуска в окружающую среду, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы» (Постановление правительства..., 2013) (с изменениями на 16 июня 2014 г.) утверждены правила о государственной регистрации ГМО, а также продукции, полученной с применением ГМО, или содержащей такие ГМО (Постановление правительства..., 2014). С 01 июля 2017 г. документы должны были вступить в силу и разрешить применение в российском аграрном производстве ГМО. В связи с этим в стране поднялась волна критики, начала выступать общественность, поэтому, чтобы прекратить сложившуюся ситуацию, 3 июля 2016 г. был принят Федеральный закон № 358-ФЗ «О внесении изменений в отдельные

законодательные акты Российской Федерации, в части государственного регулирования в области генно-инженерной деятельности» (Федеральный закон..., 2016). Данный закон запрещает производство в России ГМ продукции, за исключением использования ГМО в научных исследованиях. Этот закон внес также дополнения в законы «О семеноводстве»; «Об охране окружающей среды» и в Кодекс Российской Федерации об административных правонарушениях (Федеральный закон..., 1997, 2002).

Современная методология медико-биологической оценки и ее инструментальное обеспечение позволяют получать данные по безопасности трансгенных растений и ГМИ пищи. В то время как сведения по агроэкологической и эколого-генетической оценке их производства носят большей частью вероятностный характер и нуждаются в дальнейшем подробном изучении. Экологическую опасность производства каждого вида трансгенных растений следует, по возможности, оценивать применительно ко всем нецелевым биологическим ресурсам (Соколов, 2013).

1.3 Воздействие ГМ растений на микрофлору почвы

Известно, что почвенные микробные системы сложны и неоднородны, (Amann et al., 1995). Представление о составе почвенных микробных сообществ позволяют дать последние методологические достижения, в частности, новые молекулярно-биологические методы (Head et al., 1998; Stephen, Kowalchuk, 2002), (Tiedj, 1999). Наибольшее влияние растения оказывают на микробные сообщества в ризосфере, куда поступает большое количество корневых экссудатов, представляющих для микробов источник питания. Сила этого влияния зависит от степени взаимодействия между конкретной микробной популяцией и растением (Kowalchuk, 2004). Почвенные микроорганизмы реагируют также на количество и качество

растительного опада (Priha, 1999). Поскольку растения играют определяющую роль в формировании численности и состава микробных сообществ, то растения, измененные введением в них нового чужеродного генетического материала, могут изменить эти эффекты. Иногда по поводу ГМ культур высказывают опасения, что они могут оказывать на почвенную микрофлору давление, благодаря выделениям в ризосферу специфических соединений, которые создают селективное преимущество тем микроорганизмам, которые способны их утилизировать (Tsafaris et al., 2000). Например, посевы Bt-защищенных культур (риса, картофеля, кукурузы) на протяжении всей вегетации продуцируют в ризосферу Bt-токсин. Выделяемые Cру-белки и низкомолекулярные соединения ГМ растений специфически воздействуют на ризосферные микроорганизмы, создавая преимущества микроорганизмам, усваивающим эти метаболиты (Saxena, Stotzky, 2001). Наряду с формированием новых хозяйственно ценных свойств, генно-инженерное вмешательство создает для растений вероятность приобретения новых качеств, обусловленных как свойствами самой встроенной конструкции, так и её плейотропным действием, в том числе её нестабильностью и регуляторным действием на соседние гены (Joset et al., 2007). Плейотропные эффекты, из-за нарушений в эндогенных путях первичного метаболизма, могут повлечь изменения в корневой экскреции трансгенных растений и, как следствие, – изменения в почвенной микробной системе (Turrini et al., 2015).

Также существует вероятность того, что гетерологичные гены из растений могут мигрировать в микроорганизмы (Kowalchuk и др., 2003). Рекомбинантная ДНК растений, остающаяся в почве после их гибели, может служить потенциальным донором генов для их переноса в почвенную микробиоту. В почве обмен генетическим материалом между микроорганизмами различных родов и видов происходит часто. Полагают,

что такому спонтанному трансгенезу могут быть подвержены как облигатные фитопатогены, так и почвенные грибы-микоризообразователи (Топчий, 2015).

Единичные факты свидетельствуют о возможности обратно направленного дрейфа генов от микроорганизмов в высшие растения.

Оценка влияния ГМ культур на почвенные микроорганизмы и их взаимодействие с растениями особенно важна, так как нарушение почвенных микробных сообществ может привести к утрате почвой экосистемных функций (Guana et al., 2016; Icoz, Stotzky, 2008).

Почвенные микробные сообщества осуществляют важнейшие биосферные функции, играя роль связующего звена биологического и геологического круговорота веществ на планете. В силу высокой скорости эволюции микроорганизмы наиболее оперативно реагируют на изменение окружающей среды, поэтому изучение природных микробных сообществ позволяет достаточно быстро оценить влияние изменений окружающей среды на сохранение биологического разнообразия (Добровольский и др., 2011). Особый интерес представляют микроорганизмы ризосферы – той части почвы, которая примыкает непосредственно к поверхности корня растения. С ризосферными микроорганизмами связаны, помимо их участия в круговороте питательных веществ, и другие важные функции, в частности, защита растения от фитопатогенов, антагонистические взаимодействия и фиторегуляторная активность, обеспечивающие, в конечном итоге, продуктивность сельскохозяйственных культур. Из-за сложности структуры и функционирования почвенной системы связями между растительным и микробным её компонентами часто пренебрегают. Однако в связи с широкомасштабным распространением в агроэкосистемах ГМ культур такие исследования приобретают в последние годы все большее значение.

В документах, регламентирующих безопасность производства и применения ГМР в производственных посевах, отмечается, что при оценке экологической безопасности необходимо проводить оценку риска поражения нецелевых организмов, в частности, выявлять нарушения численности и видового состава ризосферных микроорганизмов (Вельков и др., 2003). Несмотря на это, влияние ГМР на почвенные и ризосферные микроорганизмы остается одним из наименее изученных аспектов (Turrini et al., 2015; Bruinsma et al., 2003; Filion, 2008; Ki-Jong et al., 2012; Arango et al., 2014). Исследование ризосферных микробных комплексов представляет особый интерес, поскольку они играют важную роль не только в связи с процессами роста и развития растения, но и участвуют в поддержании почвенного гомеостаза в целом, обеспечивая реализацию почвой своих экологических функций. Сегодня предпринимаются попытки к выяснению того, существуют ли специфические ответы со стороны ризосферной микрофлоры на различные категории ГМ растений, разработанных на сегодняшний день, с учетом конкретной технологии и использованной генетической конструкции (Turrini et al., 2015).

Получение трансгенных сельскохозяйственных культур с устойчивостью к гербицидам, представляло собой радикально новый подход к управлению засоренностью посевов сорняками. Благодаря внедрению ГМ культур стало возможным перейти от дорогостоящих комбинаций гербицидов к использованию одного из средств широкого действия, таких как глифосат и глюфосинат, традиционно считающихся наименее токсичными как для человека, так и для окружающей среды.

Устойчивые к гербициду раундап (Roundup Ready или сокращённо RR) растения содержат ген энолпирувилшикиматфосфат-синтазы (EPSP-синтазы) из почвенной бактерии *Agrobacterium* sp. CP4. Глифосат ингибирует рост растения, блокируя работу фермента EPSP-синтазы,

участвующего в выработке некоторых аминокислот и других веществ. Повышенное в результате экспрессии гетерологичного гена количество EPSP-синтазы позволяет растению противостоять действию глифосата при обработке посевов для уничтожения сорняков (Funke et al., 2006). RR соя GTS_40-3-2 получила широкое распространение в сельском хозяйстве ряда стран Южной Америки.

В отличие от трансгенных, устойчивых к глифосату растений, почвенные микроорганизмы оказались к нему чувствительны. Кинг с соавт. (King et al., 2001), Редди и Заблотович (Zablotowicz, Reddy, 2004, 2007) показали, что применение глифосата задерживает образование клубеньков и фиксацию азота (N) у RR сои. Авторы связывают это с ингибирующим действием глифосата на симбиотические азотфиксирующие бактерии *Bradyrhizobium japonicum*. В тканях растений разлагается лишь незначительное количество глифосата, а большая его часть транслоцируется в клубеньки, корни и выделяется с корневыми экссудатами. В штате Миссури (США), после обработки глифосатом посевов RR сои и кукурузы, увеличилось, по сравнению с нетрансгенными растениями, поражение корней почвенными грибами родов *Pythium* и *Fusarium* (Meriles et al, 2006; Kremer, Means, 2009; Sanogo et al., 2000). Предполагают, что корневая экскреция глифосата стимулирует в ризосфере прорастание спор фитопатогенных грибов.

Экосистемные эффекты трансгенного растения в данном случае можно расценивать как косвенное воздействие, поскольку изменения в микробной системе, а также в устойчивости растений к фитопатогенам, происходили в силу изменения корневой экскреции, которая обеспечивала преимущество отдельным видам фитопатогенов или, наоборот, ингибировала развитие их антагонистов.

Поскольку глифосат способен ингибировать EPSP-синтазу не только в растениях, но и в различных микроорганизмах, высказывались опасения, что его применение может привести к изменениям состава и разнообразия ризосферных микробных сообществ в почвах, задействованных в сельском хозяйстве. Сравнение ризосферных сообществ трансгенной и нетрансгенной сои с помощью анализа нуклеотидных последовательностей 16S рибосомальной РНК показали, что бактериальное разнообразие на корнях RR сои не только не снизилось, но даже возросло после применения глифосата (Arango et al., 2014). В посевах трансгенной (BRS245) и нетрансгенной (BRS133) сои в Бразилии на протяжении двух вегетационных периодов (2011/2012 гг.) сравнивали базальное дыхание почвы, содержание углерода микробной биомассы почвы, количество спор эндомикоризных и прочих грибов, и оценивали бактериальную биомассу в почве с использованием эпифлуоресцентной микроскопии. После выращивания трансгенной сои с устойчивостью к имидазолиновому гербициду в почве повысилось содержание бактериальной биомассы по сравнению с контролем (Vilvert et al., 2014).

В целом, сверхэкспрессия в растениях гена EPSP-синтазы, по данным исследований, проведенных в крупнейших странах-производителях RR сои (Аргентина, Бразилия, Европейский союз), существенно не влияла на почвенные микроорганизмы и биологическую фиксацию азота. Фактором, достоверно определяющим варьирование этих показателей в почвах, являлось применение глифосата в посевах трансгенных культур (Bohm, Rombaldi, 2010).

При сравнении данных, полученных в двадцати полевых опытах, заложенных в шести Штатах и в Федеральном Округе Бразилии, было сделано заключение, что выращивание трансгенной сои с устойчивостью к гербицидам, не оказало никакого влияния на микробную биомассу и 16s

рНК-ДГГЭ-профили (Dunfield, Germida, 2004). Ранее эти же авторы сообщали, что микробные сообщества, связанные с ризосферой трансгенных растений отличаются от сообществ нетрансформированных растений, но эти изменения были кратковременными (Dunfield, Germida, 2003). Аналогичные выводы были сделаны в отношении устойчивой к гербициду глюфосинату кукурузы, в ризосфере которой бактериальные сообщества сравнивались с помощью секвенирования гена 16S рНК (Kowalchuk et al., 2003).

Существует еще ряд работ, посвященных изучению влияния устойчивых к гербицидам культур на состав и свойства ризосферных микроорганизмов, в которых эффекты ГМ культур часто имели место, но обычно они не перекрывали варьирование, обусловленное "нормальными" источниками вариации (Gyamfi et al., 2002; Bruinsma et al., 2003, Yong-Eok et al., 2015).

Другой группой трансгенных культур, получивших широкое распространение в аграрном производстве многих стран, стали Bt-защищенные от насекомых-вредителей растения. Инсектицидные растения были созданы введением в них гена дельта – эндотоксина *Bacillus thuringiensis* (Bt). Кроме преимуществ экологического характера, связанных со снижением побочных токсических эффектов и загрязнения пестицидами водных ресурсов, к числу преимуществ Bt-культур относят улучшение состояния здоровья рабочих ферм в развивающихся странах, обусловленное отказом от распыления на хлопковых полях химических инсектицидов. Однако есть мнение, что устойчивые к насекомым-вредителям ГМ культуры, экспрессирующие Сгу-белки, изначально принадлежащие бактериям, могут нанести ущерб каким-либо безвредным или даже полезным почвенным организмам. Bt-токсин попадает в почву преимущественно через корневые выделения и растительные остатки (Saxena et al., 1999; Saxena, Stoztky, 2000), где утилизируется микроорганизмами в качестве ростового субстрата

(Baumgarte, Tebbe, 2005). Это доказано и иммунологически, и тестированием токсического действия эксудатов на личинках чувствительных насекомых. Скорость деградации и инактивации Vt-токсина зависит от почвенно-климатических условий. Процесс деградации происходит достаточно быстро, но небольшое количество токсина (менее 2%) может сохраняться в почве по окончании вегетационного периода. Vt-токсин связывается с органо-минеральными коллоидами и илистыми частицами почвы, что защищает его от биodeградации. Однако в почве, даже после нескольких лет выращивания Vt-культур, аккумуляции токсина не происходит, благодаря активной микробной деградации (Valldor et al., 2015).

Ни лабораторные, ни полевые испытания не выявили летальных или сублетальных эффектов Vt-токсинов в отношении почвенной мезофауны: дождевых червей, ногохвосток, клещей, мокриц и нематод. Отмечены, однако, некоторые изменения в общем количестве и популяционной структуре почвенных микроорганизмов (Saxena, Stotzky, 2001). Сообщалось о влиянии Vt-хлопчатника на количественные показатели и разнообразие аборигенных популяции бактерий и микроскопических грибов в почве (Donegan et al., 1995). В то же время, Vt-защищенные растения кукурузы (Wei et al., 2004) и риса (Liu et al., 2008) не оказывали негативного воздействия на бактериальные и грибные сообщества почвы. В микробных комплексах ризосферы Vt-риса были обнаружены преходящие отличия от ризосферных сообществ изогенного нетрансгенного риса (Wu et al., 2004). Исследования микрофлоры почвы посредством физиологического профилирования (community level physiological profiling - CLPP) бактериальных и грибных сообществ под Vt-кукурузой выявили значимые различия между трансгенными и нетрансгенными растениями (Blackwood, Buyer, 2004).

Vt-защита растений может приводить к побочным биохимическим эффектам у растения-трансформанта, в частности вызывать увеличение

содержания в его органах гликоалкалоидов и повышать синтез лигнина (на 33-97%) у кукурузы, в результате чего интенсивность микробной биодegradации растительных остатков в почве будет затруднена, а общая метаболическая активность почвы существенно снизится (Вельков, Соколов, 2003). Кроме того, длительное присутствие в почве неразлагаемых остатков Bt-защищенной кукурузы будет способствовать селекции устойчивых к Bt-токсину форм нецелевых организмов (Saxena, Stotzky, 2001). Поэтому оценка функциональных характеристик почвы, определяющих ее плодородие, представляет еще одну важную задачу при определении регламента выпуска трансгенных растений в агросферу.

В ряде регионов Китая в течение многих лет широко применяется устойчивый к насекомым-вредителям трансгенный хлопчатник SGK321, несущий гены CryIAc и CPТI. В двухлетних полевых исследованиях на Севере Китая изучали его воздействие на дегидрогеназную, уреазную и фосфатазную активность в ризосферной почве. Показано, что в различные фазы развития растений имелись существенные различия в активности ферментов. Однако метод главных компонент не выявил значимых различий между исходным сортом и трансгенной формой SGK321. Таким образом, по сравнению с межфазной изменчивостью активности дегидрогеназы, уреазы и фосфатазы, трансгенный хлопчатник не оказал заметного влияния на изменение активности этих ферментов в ризосфере хлопчатника (Zhang et al., 2014).

Структуру микробных сообществ в ризосфере Bt-хлопчатника Монсанто NC 33В мониторировали в полевых условиях с помощью метода PCR-DGGE. Результаты трехлетних полевых наблюдений показали, что на количество и таксономическую структуру эубактерий, грибов и актиномицетов в ризосферной почве заметно влияют естественные изменения в окружающей среде, связанные с фазами развития хлопчатника.

В то же время, не было обнаружено никаких существенных различий между линией NC 33В и его изогенной нетрансгенной формой (Zhang et al., 2015).

Для сравнения генетической изменчивости в популяциях бактерий, изолированных из ризосферы генетически модифицированной кукурузы MON810, несущей ген *cry1Ab*, и контрольными растениями, проведены исследования образцов ризосферы, собранных в Словакии в течение двух лет. Различий в количестве терминальных рестрикционных фрагментов между контролем и ГМ-гибридами кукурузы не обнаружено (Ondreičková, et al., 2014).

Генетическая модификация баклажана, в связи с масштабным поражением этой культуры многими вредными насекомыми, особенно *Leucinoides orbonalis*, не оказала значительного влияния на грибные сообщества ризосферы Bt-защищенных растений, несмотря на имеющиеся различия в численности и характере распределения микромицетов. Изменчивость, связанная с ростом и развитием растений, оказалась более значимой, по сравнению с изменчивостью, обусловленной генетической модификацией (Singh et al., 2014).

Таким образом, многочисленными исследованиями Bt-защищенных культур показано, что корневая экскреция трансгенного белка Cry1Ac, хотя и вызывает определенные сдвиги в количественном и качественном составе, физиологической активности почвенной и ризосферной микрофлоры, эти изменения не стабильны и пренебрежимо малы, по сравнению с изменчивостью, несвязанной с наличием в растительном геноме гетерологичной вставки. Размер и структура популяций почвенных микроорганизмов сильно подвержены как сезонным изменениям, так и колебаниям, связанным с типом почвы, фазами развития и генотипами растений. Согласно исследованиям, эффекты генетической модификации растений на почвенные микробные сообщества, нестабильны. В разных

частях одного и того же поля ризосферные микробные сообщества могут изменяться по-разному и в разной степени, также эти изменения неодинаковы в разные сезоны (Conner et al., 2003).

Создание растений с повышенной защитой от фитопатогенов стало новой актуальной задачей генной инженерии. При этом предполагается получение устойчивых сортов с измененной экспрессией собственных защитных генов или же перенесение чужеродных генов из растений и даже фагов (Clausen et al., 2000). Так, были получены трансгенные растения картофеля, экспрессирующие ген лизоцима фага T4, который обеспечивал устойчивость растений к фитопатогенным энтеробактериям, в частности *Erwinia carotovora*. Методом флуоресцентной микроскопии было показано, что лизоцим высвобождается из клеток эпидермы и активно участвует в создании жидкой пленки на поверхности корней ГМ картофеля (Serrano et al., 2000). Трансгенный картофель, синтезирующий лизоцим бактериофага T4, тщательно проверяли в двух независимых лабораторных и полевых исследованиях на способность поражать ризосферные бактерии *Pseudomonas putida* QC14-3-8 и *Serratia grimesii* L16-3-3. Разницы в составе и численности популяций ризобактерий трансгенных и контрольных растений не выявлено (Heuer et al., 2002).

Сверхэкспрессия гена MCM6, придающего растениям табака солеустойчивость, не сопровождалась изменениями в микробных популяциях почвы, её ферментативной активности (дегидрогеназ и кислых фосфатаз) или функциональном разнообразии микробного сообщества ризосферной почвы как при солевом стрессе, так и в обычных условиях (Chaudhry et al., 2012).

Иногда по поводу ГМ-культур высказывают опасения, что они могут оказывать на почвенную микрофлору селективное давление, благодаря продукции в ризосферу специфических соединений, которые создадут селективное преимущество способным их утилизировать микроорганизмам.

Действительно, лядвенец рогатый, продуцирующий низкомолекулярные опины, синтез которых кодируется Ti-плазмидами *Agrobacterium tumefaciens*, оказывал существенное влияние на конкурентные отношения двух ризосферных штаммов *Pseudomonas fluorescens*. Способный катаболизировать опины штамм вытеснял из ризосферы штамм, к этому не способный. Это указывает на то, что ТР может обеспечивать селективное преимущество тем микроорганизмам, которые способны утилизировать продукты, синтез которых вызван трансгенами (Oger et al., 2000; Mondy et al., 2014).

Иногда неожиданные эффекты ГМ культур бывают обусловлены явлением плейотропии. Вставка чужеродных генов в геномный контекст может приводить, например, к увеличению или уменьшению содержания продуктов вторичного метаболизма в растении, изменению его химии, не связанных напрямую с конкретным введенным геном, но которые могут повлиять, прямо или косвенно, на микробиоту почвы (Firn, Jones, 1999; Poerschmann et al., 2005).

Итак, за редким исключением, результаты приведенных работ показывают, что трансгенные растения не вызывают изменений ни в микробном разнообразии почвы, ни в физиологической активности микробного сообщества. По этой причине, оценка экологических рисков ГМ культур далее сосредоточилась в основном на возможности горизонтального переноса генов (horizontal gene transfer-HGT) (Nielsen et al., 2001). Было высказано предположение, что ризосфера генетически трансформированных растений может изменяться благодаря дрейфу генов от ГМ-растений к аборигенным почвенным микроорганизмам (Lynch et al., 2004). Особую озабоченность Всемирной организации здравоохранения вызывает в связи с этим возможность утечки в окружающую среду генов устойчивости к антибиотикам (ВНО..., 1993). Попав в ризосферу растений, они могут

передаться от ризобактерий патогенным видам бактерий, что повлечет повышение резистентности к антибиотикам возбудителей инфекций человека и животных (Cytryn, 2013).

Перенос генов от бактерий растениям хорошо известен, многократно описан и используется на практике для получения ТР путем их трансформации Ti-плазмидами *Agrobacterium tumefaciens*. Осуществить обратный перенос ДНК из растений в геном бактерий пока экспериментально не удалось, хотя в природных условиях этот процесс, по-видимому, происходит. Теоретически это возможно, если ДНК, высвободившаяся в почве из остатков ТР, будет способна к трансформации почвенных бактерий, и если бактерии в почве будут, в свою очередь, пребывать в компетентном для трансформации состоянии. Во многих работах показано, что ДНК может находиться в почве в стабильном, способном к трансформации состоянии. Например, при мониторинге физической и биологической деградации ДНК внутри тканей разлагающихся растений ГМ табака, прямая визуализация ДНК на агарозном геле, указывала на то, что большая часть ДНК остается внутри растительных клеток. Вместе с тем, некоторая доля сохранившейся ДНК ГМ-растений поступала в почву и, следовательно, была способна к трансформации находящихся в ней бактерий (Ceccherini et al., 2003). Изучена стабильность ДНК в листовом опаде трансгенных растений сахарной свеклы, устойчивых к ризомании, и возможность горизонтального переноса ДНК от растений к бактериям. Трансгенные растения несли NPTII и bar гены. Показана длительная сохранность растительной ДНК в почве (Вельков и др., 2003). Почвенные бактерии в реальных природных условиях могут находиться в состоянии компетентности к поглощению чужеродной ДНК довольно в редких случаях. Исследовали возможность переноса генов от RR-сои к *Bradyrhizobium japonicum* в моделируемых условиях, воспроизводящих реальные условия фермерского хозяйства. Как и следовало ожидать,

присутствие трансгенной EPSPS-синтазы было обнаружено в клубеньках, тогда как в бактериоидах, которые были выделены из клубеньков, а затем культивировались в течение нескольких пассажей в присутствии высоких концентраций глифосата, ген EPSPS не был обнаружен. Сделан вывод об отсутствии стабильной передачи гена *EPSPS* в полевых условиях (Wagner et al., 2008).

В другой работе была определена частота возможной трансформации почвенной бактерии *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 ДНК трансгенных растений с геном *nptII*. Бактериальные трансформанты при использовании ДНК трансгенных растений не обнаружены, что предполагает частоту трансформации ниже 10^{-13} трансформантов на реципиент в оптимальных условиях. В условиях почвы, при снижении концентрации ДНК, доступной бактериям, эта частота может снизиться до 10^{-16} . Учитывая данные об ограниченном времени сохранения хромосомной ДНК и невозможности определения детектируемой компетентности клеток *A. calcoaceticus* в почвенных условиях, авторы делают вывод о неопределяемой частоте возможного поглощения растительной ДНК этим почвенным микроорганизмом в естественных условиях (de Vries, Wackernagel, 2002). Авторы отмечают, что особый интерес в отношении горизонтального переноса генов представляют бактерии из семейства Rhizobiaceae, потому что природная трансформация растений происходит благодаря Ti-плазмидам из *Agrobacterium* sp. и они могут перемещаться обратно, используя механизмы гомологичной рекомбинации.

Таким образом, в настоящее время прогнозировать вероятность такого события, как передача генов от растения в бактериальный геном, не представляется возможным, но можно предполагать, что она очень мала (Lynch et al., 2004). Несмотря на это, масштабы промышленного производства ГМ-культур уже делают такие риски правдоподобными.

Переносу генов в условиях природной среды способствует много различных видов векторов, включая вирусы. Разнообразие путей передачи и векторов, а также большое число геномов, которые могли бы служить в качестве временного или постоянного места локализации для трансгенов (или их части), дают основание полагать, что приведенные здесь умозрительные расчеты малой вероятности горизонтального переноса генов, весьма консервативны (Heinemann, Traavik, 2004). Известно, что очень редкие события могут иметь самые тяжкие последствия. В данном случае, в результате захвата бактериями функциональных трансгенов ТР может произойти повышение конкурентоспособности бактериальных трансформантов и благодаря реализации нового свойства, появиться способность к колонизации новых экологических ниш, возникнуть негативные экологические последствия в результате взаимодействия генно-модифицированных бактерий с организмами-консортиями (Вельков и др., 2003). Попадание чужеродных генетических конструкций в природные микробные сообщества — так называемый горизонтальный перенос генов, неминуемо приведет к существенному ускорению эволюции микроорганизмов, появлению новых форм с новыми генетическими признаками.

Необходимо срочно разрабатывать новые и совершенствовать имеющиеся подходы и методы для применения в области мониторинга окружающей среды с целью определения масштаба распространения трансгенных организмов. В дополнение к традиционным методам количественного определения микробной биомассы, методы, основанные на ДНК-технологиях, принесли значительные успехи в изучении микробной экологии. Среди этих методов важное значение имеет оценка микробного сообщества по данным денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ) после профилирования амплифицированных рибосомальных генов

при выделении тотальной почвенной ДНК. 16s рДНК-ДГГЭ является эффективным способом диагностирования изменений в ризосфере и может быть применен в исследованиях и мониторинге экологических рисков, связанных с распространением трансгенных культур (Ki-Jong et al., 2012).

Большинство эффектов генно-модифицированных культур для агроэкосистем носят не прямой, а косвенный характер и являются результатом индуцируемых изменений в стратегии межорганизменных взаимодействий, а не следствием прямого влияния специфических черт ГМ растений. Вместе с тем, нельзя сбрасывать со счетов возможность негативного влияния последствий плейотропных эффектов генно-инженерных манипуляций с растительным геномом на почвенные микробные сообщества.

Поскольку выращивание ГМ-культур связано с определенными экологическими рисками для почвы, то перед внедрением в производство новых ГМ-культур должна быть проведена их экологическая оценка по ряду критериев, а также проведено исследование их влияния на основные функции почвенного здоровья, таких как, самоочищающая способность и супрессирующая активность (Соколов и др., 2017).

1.4 Роль актиномицетов в почве и ризосфере растений

Актиномицеты играют ключевую роль в поддержании почвенного гомеостаза (Strohl, 2004). Благодаря своей способности продуцировать гидролитические ферменты (протеазы, целлюлазы, ксиланазы, лигноцеллюлазы и хитиназы) актиномицеты активно участвуют в утилизации растительных полимеров и минерализуют мономеры, тем самым создавая растениям благоприятные условия для существования в почвах.

В прикорневой зоне растений, в зависимости от его вида или культуры,

численность актиномицетов варьирует от сотен тысяч до миллионов КОЕ/г. Применение селективных приемов (среда с пропионатом натрия, введение антибиотиков, прогревание образцов при 100 °С в течение 1 часа) для выделения актиномицетов из прикорневой зоны позволяет обнаружить в этом микролокусе представителей родов *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium* и олигоспоровых актиномицетов (Звягинцев, Зенова, 2001; Широких, Широких и др., 2004).

Выявлены специфические особенности организации актиномицетных комплексов прикорневой зоны различных сельскохозяйственных культур. Так, для растений озимой ржи, по сравнению с клевером, овсом и неризосферной почвой, отмечены наиболее высокая численность (до миллионов КОЕ/г), частота доминирования (до 60%) и доля представителей рода *Micromonospora* (до 70%) в ризосферном комплексе актиномицетов (Широких, Мерзаева, 2005). В прикорневой зоне овса по показателям численности (сотни тысяч КОЕ/г), долевого участия (до 87%), частоты доминирования (до 100%) преимущественное положение в комплексе занимают актиномицеты рода *Streptomyces*.

Особенностью клевера лугового, по сравнению с зерновыми злаками, является более высокая встречаемость (до 90%) в прикорневой зоне актиномицетов — антагонистов фитопатогенных грибов (Широких и др., 2007; Мерзаева, Широких, 2006, 2010).

Почвенные актиномицеты, способные заселять корни растений, могут оказывать на него непосредственное влияние, снабжая его продуктами своего биосинтеза. В первую очередь, это антибиотики, противодействующие поражению растений фитопатогенами, а также другие соединения, включая фунгициды, сидерофоры, сигнальные молекулы, модуляторы иммунного ответа и регуляторы роста растений (Tarkka, Hampp, 2008; Chater et al., 2010). Среди важнейших аспектов взаимодействия мицелиальных прокариот с

растением можно выделить такие, как роль актиномицетов в питании растений, регуляция численности и состава его микрофлоры (контроль фитопатогенов), увеличение способности растений выдерживать разнообразные абиотические стрессы (засуха, засоление, загрязненность почв тяжелыми металлами и пр.).

Обеспечение растений доступным азотом у актиномицетов связано с симбиотической азотфиксацией представителей рода *Frankia*, способных проникать в корневую систему большинства небобовых (актиноризных) растений, вызывая формирование клубеньков и активно фиксируя атмосферный азот. В основе такого симбиоза лежит снабжение актиномицетами растений связанным азотом в обмен на получаемые продукты фотосинтеза. С 1980-х годов активно изучаются актиноризные взаимодействия и уже имеются практические результаты на обширных площадях во многие тысячи гектаров на многих континентах, а так же в различных природно-климатических зонах (Калакуцкий, Шарая, 1990).

По результатам последних лет, отдельные представители рода *Streptomyces* в ризосфере растений имеют способность глубоко влиять на взаимодействие партнеров в рамках таких симбиозов, как бобово-ризобиальный и микоризный (Tokala et al., 2002; Schrey et al., 2007). К положительным эффектам, обусловленным присутствием в том или ином микробно-растительном симбиозе третьего – стрептомицетного компонента относятся: стимулирование образования клубеньков бобовыми и актиноризными растениями, увеличение активности азотфиксации в клубеньках, стимуляция роста мицелия и прорастания спор гриба-микоризообразователя, повышение активности кислой и щелочной фосфатаз в корневой системе и усвоение фосфора.

Прямое влияние актиномицетов на рост растений проявляется в виде продукции фитогормонов – ауксинов, гиббереллинов и цитокининов. В

литературе встречаются сообщения о находках среди эндофитных актиномицетов культурных растений активных продуцентов ауксинов. Есть сообщения, что эндофитные актинобактерии способствуют повышению устойчивости растений к экологическим стрессам (Shimizu, 2011). Например, штаммы *S. coelicolor* DE07, *S. olivaceus* DE10 и *S. geysiriensis* DE27, выделенные из сельскохозяйственных растений засушливых районов Индии, проявляли способность к биосинтезу ИУК, при инокуляции пшеницы не только стимулировали рост проростков, но и способствовали адаптации их к снижению (-0,05 до -0,73 МПа) водному потенциалу (Yandigeri et al., 2012). В результате проведенной инокуляции семян и интродукции в почву выделенного из ризосферы пшеницы *Streptomyces* sp. значительно улучшались биохимические и морфометрические показатели растений, выращенных в условиях искусственного засоления (NaCl). Данный штамм рекомендован к использованию в западном регионе Саудовской Аравии на засоленной почве как биоудобрение, он также обладал способностью продуцировать в среде ИУК (Aly et al., 2012).

Большинство обитающих в ризосфере растений актиномицетов проявляют в лабораторных условиях свойства, типичные для PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) бактерий, т.е. способны минерализовать труднодоступные растениям соединения фосфора, фиксировать атмосферный азот, быть продуцентом сидерофоров, увеличивая потребление растением дефицитного железа в условиях нейтрально-щелочной реакции среды. В то же время, актиномицеты, выделенные из техногенно загрязнённых почв, могут развивать специальные стратегии, что позволяет им успешно справляться с загрязнением. Поэтому выделенные из таких сильно загрязнённых локусов штаммы стрептомицетов, устойчивые к свинцу и цинку, могут быть использованы в проектах по биоремедиации почв (Schütze, Kothe, 2012), в результате чего улучшаются условия для жизни растений.

Важный фактор биоконтрольного действия актиномицетов представляет собой антибиоз. Самая большая группа биоактивных вторичных метаболитов актиномицетов состоит из антибиотиков с антибактериальной, противогрибковой, антипротозойной и противовирусной активностью. Стрептомицетам в защите растений от фитопатогенов отводится особая роль. Они продуцируют широкий спектр антибиотических веществ, являются наиболее вездесущими, активно колонизируют покровы и внутренние ткани растений. Для биологического контроля фузариозных заболеваний большинства сельскохозяйственных растений используют различные виды стрептомицетов или синтезированные ими метаболиты (Getha, Vikineswary, 2002). Много работ о подавлении стрептомицетами таких фитопатогенов как *Alternaria* spp., *Rhizoctonia* spp., *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Stemphylium lycopersici*, *Pythium ultimum*, *Rhizopus stolonifer* и многих других (Shanmuganathan et al., 2001; Xiao et al., 2002; Chung et al., 2005).

Помимо регуляции микробных сообществ посредством антибиозиса, актиномицеты продуцируют хитиназы и зачастую выступают гиперпаразитами фитопатогенных грибов. Также способность противостоять инфекциям у растений может быть обусловлена индукцией неспецифической или системной устойчивости у самих же растений. Так, обработка семян норвежской сосны культурой *Streptomyces* sp. GB 4-2 при заражении гетеробазидиальной гнилью оказала на саженцы иммунизирующее влияние. Также отмечено повышение невосприимчивости *Arabidopsis thaliana* к фитопатогену *Alternaria brassicicola* под воздействием этого штамма (Tarkka, Hampp, 2008).

Начальные знания в отношении биологии стрептомицетов были накоплены благодаря использованию их антибиотического потенциала в медицине. Появление и развитие технологий секвенирования позволили

выяснить, что доля генома, детерминирующая продукцию вторичных метаболитов у стрептомицетов, более высокая (~ от 5 до 10 %), чем у других бактерий (Challis, Hopwood, 2003). В современной информационной базе данных по метаболитам стрептомицетов насчитывается более 10 тыс. биологически активных соединений (Martinez et al., 2017; Dewi et al., 2017). В геномах *Streptomyces* spp. содержатся множественные кластеры генов, контролирующие продукцию вторичных метаболитов. Среди них важное место занимают кластеры генов, которые кодируют нерибосомные пептидсинтетазы (НРПС) и поликетидсинтазы (ПКС), связанные с продукцией антибиотиков (Challis, Hopwood, 2003; Doroghazi, Metcalf, 2013). Некоторые штаммы несут до 30 различных генов PKS и NRPS, но большинство из них в обычных условиях лабораторного культивирования не имеют транскрипционной активности (Weber et al., 2015). Определение их биологических функций в природе и путей активации способствует ускорению разработки штаммов, представляющих интерес для применения в защите растений (Shrivastava, Kumar, 2018).

Стрептомицеты способны непосредственно воздействовать на фитопатогены, продуцируя сидерофоры (Wang et al., 2014), гидролитические (Hoster et al., 2005; Chater et al., 2010) или детоксицирующие ферменты (Horlacher et al., 2013). Антифунгальная активность актиномицетов часто обусловлена механизмом синтеза одновременно нескольких метаболитов, что препятствует формированию устойчивости в популяциях фитопатогенных организмов (Schrey, Tarkka, 2008). Повышению сопротивляемости растений к болезням также может способствовать индуцированная (ISR) и/или приобретенная (SAR) системная устойчивость, обусловленная стрептомицетами (Kurth et al., 2014).

Могут стрептомицеты, как и другие актиномицеты, поддерживать рост растений-хозяев, благодаря синтезу фитогормонов или конкурировать с

фитопатогенами в борьбе за доступные питательные элементы и сайты связывания на корнях растений (Hamedi, Mohammadipannah, 2015; Shrivastava, Kumar, 2018). В качестве биоконтрольных агентов актиномицеты отличаются высокой колонизирующей способностью, устойчивостью спор к высушиванию и излучениям, непостоянному наличию питательных веществ (Новикова, 2016). Количество препаратов на основе актиномицетов для защиты растений, несмотря на очевидные преимущества, остаётся до сих пор ограниченным. Всего лишь четыре штамма стрептомицетов (*S. lydicus* WYEC108, *S. saraceticus* KH400, *S. violaceusniger* YCED9, *S. griseoviridis* K61) сегодня используются в защите растений (Palaniyandi et al., 2013; Rey, Dumas, 2017).

Активность стрептомицетов к фитопатогенам обусловлена синтезом соответствующих метаболитов и широкой продукцией хитиназ и глюканаз. Такие препараты, как Actinovate® (*S. lydicus* WYEC 108) и Mycostop® (*S. griseoviridis* K61) вносятся непосредственно в почву, Micro108® (*S. lydicus* WYEC108) — применяется для обработки семян (Owen et al., 2015). Ряд синтезируемых *Streptomyces* sp. метаболитов применяются для обработки растений по вегетации, включая такие препараты как полиоксин Д, стрептомицин и касугамицин (Hamedi, Mohammadipannah, 2015).

Например, *Streptomyces* sp., продуцент летучих цианидов, подавлял рост *Rhizoctonia bataticola* и *Fusarium oxysporum* — возбудителей, которые вызывают болезни сорго (Gopalakrishnan et al., 2011). Касугомицин из *Streptomyces kasugaensis* (Law et al., 2017) и коммерческий препарат Endorse® (Dernoeden, 2001) соответственно, были успешно использованы для защиты риса от болезней, вызываемых грибами *Pyricularia oryzae* и *Rhizoctonia solani*. Другие же штаммы стрептомицетов оказывали ростстимулирующий эффект в посевах риса (Gopalakrishnan et al., 2013, 2014).

Таким образом, продукция актиномицетами вторичных метаболитов, по данным современной литературы, способствует экологической адаптации связанных с ними растений. Получение новых результатов будет играть важную роль в практическом использовании актиномицетов в экологически безопасных технологиях аграрного производства.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Растительные объекты. В экспериментальной работе были использованы полученные во Всероссийском научно-исследовательском институте сельскохозяйственной биотехнологии (ВНИИСХБ) растения томата (*Solanum lycopersicum* L.) сорта Белый налив и табака обыкновенного (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Самсун, с гетерологичным геном *Fe*-супероксиддисмутазы (*Fe-SOD1*) из *Arabidopsis thaliana* L., придающим устойчивость к повреждающему действию окислительного стресса. Пробирочные трансгенные растения были получены методом агробактериальной трансформации с применением штамма *Agrobacterium tumefaciens* AGL0. В качестве вектора была использована плаزمида pBI-FeSOD несущая целевой ген *Fe-SOD1*, кодирующий цитоплазматическую супероксиддисмутазу *Arabidopsis thaliana*, в присутствии маркерного гена - неомицинофосфотрансферазы (*npt II*), придающего устойчивость подвергшихся трансформации клеток к антибиотику канамицину (Баранова, Гулевич, 2006).

В работе использовали четыре независимые трансгенные линии табака Самсун (Ttrf 2, Ttrf 8, Ttrf 3, Ttrf 13) и четыре линии томата Белый налив (bn 4, bn 6, bn 27, bn 34), для которых ранее было подтверждено встраивание гетерологичного гена *Fe-SOD1* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Нодельман, 2014). Контролем служили исходные линии табака и томата тех же сортов, не подвергавшиеся трансформации.

Выращивание растений в условиях *in vitro* и *ex vitro*. Клональное микроразмножение пробирочных растений исходных сортов и полученных

на их основе трансгенных линий, проводили на среде Мурасиге и Скуга (МС) (Murashig, Skoog, 1962), без добавления фитогормонов.

Для приготовления питательной среды МС изначально готовили маточные (концентрированные) растворы макросолей, микросолей и витаминов. Компонентный состав среды МС приведен в таблице 2.

Таблица 2 – Компонентный состав среды МС

Компонент среды (на 1л)	МС
NH ₄ NO ₃ , г	1,65
KNO ₃ , г	1,9
KH ₂ PO ₄ , г	0,21
MgSO ₄ ·7H ₂ O, г	0,37
CaCl ₂ , мг	332
FeSO ₄ ·7H ₂ O, мг	27,8
Na ₂ ЭДТА·2H ₂ O, мг	37,3
KI, мг	0,83
H ₃ BO ₃ , мг	6,2
MnSO ₄ ·5H ₂ O, мг	24,1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O, мг	10,6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O, мг	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O, мг	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O, мг	0,025
Мезоинозит, г	100
Аспарагин, мг	200
Глутамин, мг	400
Тиамина гидрохлорид, мг	10
Пиридоксина гидрохлорид, мг	1
Никотиновая кислота, мг	1
Сахароза, г	20/25
Агар, г	7
pH	5,6-5,8

Расплавленную питательную среду разливали в пробирки на 1/3 объема, закрывали их фольгой и помещали в металлические штативы. Штативы с пробирками автоклавировали в течение 20 мин при давлении 1,0 атм. Все работы по микроклональному размножению проводили асептически

в ламинарном боксе, при скорости потока воздуха 4 м/сек. Пробирочные растения культивировали при температуре 16–18°C днем/14°C ночью, фотопериоде 16 час, освещенность 7-10 кЛк.

После того, как у пробирочных растений формировалась развитая корневая система, её отмывали от остатков питательной среды и растения высаживали в вегетационные сосуды с почвой и выращивали в условиях искусственного климата при освещенности 4 тыс. кЛк, фотопериоде 16 час, температуре 25/18°C день/ночь, влажности воздуха 80%. Растения томатов выращивали до получения семенного потомства, растения табака - до фазы цветения.

Каждая из сравниваемых линий, включая исходные генотипы, была представлена не менее чем тремя выращенными в почве индивидуальными растениями.

2.2 Методы исследования

Для проверки функциональной активности встроенного гена отбирали средние пробы листьев у трансгенных и контрольных растений. В каждом варианте отбирали пробы (3-й лист верхнего яруса) с трех индивидуальных растений в двух повторениях. Отбор проб для анализа проводили в сроки, когда у растений томатов были сформированы 1) пять настоящих листьев, 2) первая цветочная кисть и 3) в период образования завязи. У табака смешанные пробы листьев отбирали по фазам развития: 1) укоренение рассады, 2) формирование растений и 3) цветение. Временные промежутки между отбором проб составляли в среднем две недели.

Для тестирования у растений симптомов окислительного стресса определяли суммарную активность СОД и интенсивность перекисного

окисления липидов по накоплению малонового диальдегида (МДА), содержание в листьях пластидных пигментов.

Для определения активности СОД навески сегментов средней части листьев гомогенизировали в ступке в присутствии холода с добавлением 5 мл Na-фосфатного буфера, затем переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали (при 15000 g в течение 20 мин), надосадочная жидкость служила ферментативным экстрактом. Активность СОД определяли методом, основанном на способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление n-нитротетразолиевого синего (NBT). В присутствии рибофлавина и метионина, генерирующих супероксидные анион-радикалы, NBT восстанавливается до синего формазана с максимумом поглощения при 560 нм (Beauchamp, Fridovich, 1971). Реакционная смесь (3 мл) содержала: 1,3 мкМ рибофлавин, 13 мМ метионин, 63 мкМ NBT в 0,05 М Na-фосфатный буфер с 0,10 мМ EDTA, pH 7,8 и 0,1 мл ферментативного экстракта. Образцы освещали в течение 6 мин. Измерения проводили на спектрофотометре «Sprekol 1200» (Германия). За единицу активности СОД принимали объем ферментативного экстракта, который вызывал 50% ингибирование фотовосстановления NBT. Определение активности СОД проводили в трех повторениях. Активность СОД рассчитывали на грамм сырой массы.

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) в листьях растений анализировали по содержанию малонового диальдегида (МДА), определённого в реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Навеску растительной ткани массой 0,6 г гомогенизировали в 10 мл 0,1 моль/л ТРИС-HCl буфера с pH 7,6, содержащего 0,35 моль/л NaCl. К 3 мл гомогената добавляли 2 мл 0,5% ТБК в 20% ТХУ. Полученную смесь нагревали при 100°C в течение 30 мин, быстро охлаждали и фильтровали (Лукаткин, 2002). Измеряли оптическую плотность фильтратов при 532 нм. Концентрацию МДА рассчитывали, используя

коэффициент молярной экстинкции, равный $1,56 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Анализ проводили в трех повторениях.

Для определения содержания пластидных пигментов сегменты из средней части листьев (0,15 г) фиксировали кипящим 100% ацетоном (2-3 мл) и растирали с добавлением CaCO_3 (для нейтрализации кислот клеточного сока) и Na_2CO_3 (для обезвоживания пробы от воды, содержащейся в растительной клетке). Гомогенат фильтровали, и объём доводили ацетоном до 25 мл (Шлык, 1971). В ацетоновой вытяжке определяли содержание хлорофиллов *a* и *b* на спектрофотометре «Spesol 1200» (Германия) при длинах волн 662, 644 (хлорофиллы) и 440,5 нм (каротиноиды).

Для выяснения сохранности встроенного гена при семенном размножении у прошедших тестирование на канамицине растений томата (T_2) и контрольных растений исходного сорта, после адаптирования к почве, определяли морфометрические показатели, характеризующие общий габитус и структуру продуктивности.

Проведение микробиологического анализа в ризосфере растений. В качестве модельной группы почвенных микроорганизмов в ризосфере растений были выбраны мицелиальные бактерии – актиномицеты, ввиду их важной роли в метаболических взаимодействиях с растениями, а так же наиболее простой, в сравнении с другими группами прокариот, видовой идентификацией.

2.2.1 Учет, выделение и идентификация актиномицетов

Актиномицеты учитывали и выделяли из прикорневой зоны растений, используя метод посева из разведений гомогенатов корней на среду с пропионатом натрия (для описания родовой структуры) и казеин-

глицериновый агар (для описания видовой структуры комплекса). Состав сред приведен в таблице 3.

Для микробиологического анализа растения извлекали из почвы вместе с корневой системой, высушивали корни с почвой, оставшейся после отряхивания, при комнатной температуре. Перед посевом, в качестве селективного приема, для ограничения роста немикцелиальных бактерий, воздушно-сухие образцы выдерживали при температуре 70°C в течение четырех часов (Звягинцев и др., 2005). Из каждого образца брали по пять навесок (1.0 г) корней с прилипшей к ним почвой, которую отмывали в колбах со 100 мл стерильной воды (считали это ризосферой). Корни после отмывания растирали в ступке и переносили в другую колбу со 100 мл стерильной воды (считали это ризопланой). Готовили серию десятикратных разведений почвенных суспензий и гомогенатов корней, которые высевали поверхностно на плотные среды с соблюдением всех правил асептики. Инкубировали чашки с посевом в термостате при 27°C в течение двух недель, далее вынимали чашки из термостата и выдерживали при комнатной температуре до трех недель. Выросшие колонии учитывали дифференцированно по морфологическим типам, используя микроскоп Leica DM-2500.

Среднее количество колониобразующих единиц (КОЕ) на один грамм субстрата рассчитывали по формуле (Зенова, Кураков, 1988).

$$a = \frac{b \cdot v \cdot z}{d}, \quad 1)$$

где a – среднее число КОЕ в 1 г воздушно-сухой навески;

b – среднее количество колоний на чашке;

v – разведение, из которого был сделан посев;

z – количество капель в 1 см³ суспензии;

d – вес навески, взятый для анализа.

Доминирующие на чашках колонии выделяли в чистую культуру (не менее 15 изолятов с каждого растения). Каждый штамм нумеровали и

фиксируют его принадлежность к определенному растительному образцу, что необходимо для дальнейшей обработки данных. Полученная в результате коллекции составила 266 штаммов.

Исследование таксономической принадлежности культур проводили в соответствии с определителями (Определитель бактерий Берджи..., 1997; Гаузе и др., 1983). Актиномицеты, имеющие одиночные споры на субстратном мицелии, лишенные или со слабым развитием стерильного воздушного мицелия, с не фрагментированным мицелием предварительно идентифицировали как представителей рода *Micromonospora*. Культуры, принадлежащие к роду *Streptosporangium*, определяли по наличию ветвящегося, не фрагментированного субстратного мицелия, не несущего споры, и воздушных гиф с цепочками спор и спорангиями. Актиномицеты, образующие одиночные споры на воздушном мицелии, либо короткие цепочки более крупных, чем стрептомицетные, спор на ветках воздушного и/или субстратного мицелия объединяли в группу олигоспоровых актиномицетов. Принадлежность выделенных культур актиномицетов к роду *Streptomyces* определяли на основании характерных морфологических признаков: нефрагментированный мицелий, длинные цепочки спор на воздушном и отсутствие спор на субстратном мицелии (Определитель бактерий Берджи..., 1997). Для видовой идентификации актиномицетов рода *Streptomyces* использовали культуральные и морфологические признаки (Гаузе и др., 1983): форма цепочек спор, цвет воздушного и субстратного мицелия, наличие растворимых и меланоидных пигментов на диагностических средах, состав которых приведен в таблице 3.

Для уточнения таксономического положения выделенных культур выборочно проводили анализ фрагментов 16S рРНК в НПК «Синтол» (Москва). Полученную нуклеотидную последовательность сопоставляли с материалом, депонированным в генбанке NCBI с использованием пакета

Таблица 3 – Состав использованных в работе питательных сред, (г/л)

Компонент среды	Питательная среда									
	1	2	3*	4*	5	6	7	8	9	10
K ₂ HPO ₄ , г	2,0				1,0		0,5	1,0	1,0	0,5
KH ₂ PO ₄ , г		0,5								
Na ₂ HPO ₄ , г		0,7								
Na ₂ MoO ₄ , мг										0,002
KNO ₃ , г	2,0	0,1					1,0			
KCl, г					0,5				0,5	
NaCl, г	2,0	0,3		5,0			0,5	0,1		0,1
NaNO ₃ , г					2,0			2,5	2,0	
MgSO ₄ , г					0,5		0,5	0,3		0,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O, г	0,05	0,1							0,5	
CaCO ₃ , г	0,02	0,02								
CaCl ₂ , г								0,1		0,02
FeSO ₄ ·7H ₂ O, мг	10	0,2								
FeSO ₄ , г					0,01		0,01		0,01	
FeCl ₃ , г								0,01		
MnSO ₄ ·7H ₂ O, мг		0,02								
(NH ₄) ₂ SO ₄ , мг										0,5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O, мг		0,18								
Цитрат железа, г						0,5				
Пропионат натрия, г		0,2								
Глицерин	10,0				30,0					
Гидролизат казеина, г	0,3									
Овсяная крупа, г			20,0							
Глюкоза, г				10,0						2,0
Бульон Хоттингера				30см ³						
Пептон, г				5,0		10,0				1,0
Дрожжевой экстракт, г						1,0				1,0
Крахмал							20,0			
Сахароза, г									30,0	2,0
КМЦ, г								10,0		
Агар, г	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
pH	7,15	7,0-7,2	7,2	7,0-7,2	7,2	7,0-7,2	7,2-7,4	7,2-7,3	4,5	7,0

Примечания:

1) «*» - для приготовления используется водопроводная вода;

2) 1 - Казеин-глицериновая (Гаузе и др., 1983); 2 - Среда с пропионатом натрия (Rowbotham, 1977); 3 - Овсяная среда (Waksman, 1961); 4 - Органический агар 2 (Гаузе и др., 1983); 5 - Глицерин-нитратная среда (Гаузе и др., 1983); 6 - Пептоно-дрожжевая среда с железом (Shirling, Gottlieb, 1966); 7 - Минеральный агар 1 (Гаузе 1) (Гаузе и др., 1983); 8 - Среда Гетчинсона (Семенов, 1990); 9 - Среда Чапека-Докса (Сэги, 1983); 10 - Среда RHM (Belimov et al., 1998).

программ BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей и построение филогенетического дерева осуществляли с помощью программы MEGA-X (<https://www.megasoftware.net/>). Для построения дерева использовали метод наибольшего правдоподобия – maximum likelihood. Штамм *Rhodococcus rhodochrous* DSM43274T был выбран как референсный организм, не принадлежащий к роду *Streptomyces*.

2.2.2 Определение таксономической и функциональной структуры комплекса актиномицетов

Структуру комплекса актиномицетов в ризосфере растений исходных сортов и полученных на их основе трансгенных линий характеризовали на основании расчёта показателей частоты встречаемости и долевого участия отдельных представителей: типичные доминирующие ($\geq 90\%$), типичные частые ($\geq 70\%$), типичные редкие ($\geq 10\%$) и случайные ($< 10\%$) (Звягинцев, Зенова, 2002). За частоту встречаемости (ЧВ) принимали отношение числа образцов, в которых представитель встречается, к общему числу проанализированных образцов. Долевое участие видов и родов актиномицетов определяли как процентное содержание колоний одного таксона по отношению к общему числу колоний, вырастающих при посевах суспензий на плотные питательные среды.

Оценку видового и родового разнообразия актиномицетов осуществляли с помощью индекса Шеннона (Мэггаран, 1992)

Характеризуя функциональную структуру комплексов микроорганизмов, ассоциированных с корнями, использовали также индекс обилия (долевое участие в комплексе, %) и частоту встречаемости в комплексах стрептомицетов-антагонистов, целлюлозолитиков и продуцентов ауксиновых соединений с фиторегуляторной активностью.

Определение антагонистической активности. Для выявления в

ризосферных комплексах антагонистически активных стрептомицетов, ассоциированных с корнями исходных и трансгенных растений, применяли метод диффузии в агар (Егоров, 1979). В качестве тест-культур использовали фитопатогенные микромицеты: *Fusarium oxysporum* U1, *F. culmorum* T-8, *F. avenaceum* 7/2, *Bipolaris sorokiniana*; и бактерии: *Pseudomonas putida*, *Erwinia rhapontici*, *Erwinia herbicola*, *Arthrobacter simplex* (из коллекции лаборатории биотехнологии растений и микроорганизмов ФГБНУ ФАНЦ Северо-Востока).

В чашки Петри с овсяным агаром сплошным газоном засеивали исследуемые культуры стрептомицетов, посеы инкубировали в термостате при 27° С в течение 7-10 суток. Далее из газонных культур вырезали блочки, используя стерильное пробочное сверло диаметром 6 мм, и помещали их на свежий посев тест-культур. Тест-культуры микромицетов выращивали в жидкой питательной среде Чапека – Докса (табл. 3), на качалке в течение 7-10 суток, затем по 1 мл жидких культур каждого микромицета вносили на дно чашки и заливали расплавленным агаром Чапека – Докса. После застывания на поверхность питательной среды помещали блочки стрептомицетов, ориентируя их субстратным мицелием вниз (по 4 блочка на чашку). Тест-культуры бактерий выращивали на среде РНМ (табл. 3) и использовали, в отличие от грибов, поверхностный посев на агаризованную среду, после чего раскладывали на нее блочки с ростом исследуемых стрептомицетов. Антагонистическую активность штаммов стрептомицетов оценивали по размеру зоны подавления роста тест-культур на 3-5 сутки инкубации при 27° С. Все исследуемые штаммы разделяли, в зависимости от величины зоны подавления роста тест-культур, на группы со слабой (тест-зона не более 10 мм), умеренной (тест-зона изменяется от 11 до 20 мм) и сильной (тест-зона более 21 мм) антагонистической активностью.

Определение целлюлозолитической активности. Для определения

целлюлозолитической активности штаммы стрептомицетов засеивали полоской (1 штамм на чашку) на питательную среду Гетчинсона с добавлением КМЦ (карбоксиметилцеллюлозы) в количестве 10 г на 1 литр, в качестве единственного источника углерода. Чашки инкубировали при 27° С в течение 10 суток. Затем в чашки с выросшими колониями стрептомицетов наливали 0,1 % водный раствор Конго красного, по истечению 15 минут раствор сливали и заливали в чашки 1М раствор NaCl, экспонировали чашки в течение 10 минут. Судили о целлюлозолитической активности, измеряя зону деструкции (просветления) около тестируемого штамма стрептомицета, так как продукты разрушения целлюлозы не окрашиваются данным красителем (Teather, Wood, 1982). Все исследуемые штаммы разделяли, в зависимости от величины зоны разрушения целлюлозы, на группы со слабой (тест-зона не более 14 мм), умеренной (тест-зона изменяется от 15 до 24 мм) и сильной (тест-зона более 25 мм) целлюлозолитической активностью.

Определение способности стрептомицетов продуцировать фитогормоны. Количественное определение ауксинов проводили в культуральной жидкости, полученной в результате выращивания культур стрептомицетов в жидкой модифицированной среде Чапека – Докса (табл. 3) с добавлением 200 мкг/мл L-триптофана в качестве предшественника для синтеза индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). Культуры выращивали на качалке при температуре 20-25°С в течение 72 час. Жидкие культуры центрифугировали (при 6000 g в течение 10 мин), отделяли надосадочную жидкость, приливали к ней реактив Сальковского в соотношении 1:2, который готовили следующим образом: к 1 мл 0,5М FeCl₃ добавляли 50 мл 35% хлорной кислоты (Libbert, Rich, 1969). Количество индольных соединений определяли колориметрически при длине волны 540 нм. Для построения калибровочной шкалы готовили растворы индолил – 3 – уксусной кислоты (Fluka, Sigma-Aldrich) в концентрациях от 1 до 100 мг/л.

Определение ауксинов проводили в трех повторениях.

Определение чувствительности стрептомицетов к антибиотикам. Для определения резистентности выделенных культур стрептомицетов использовали диски индикаторные ДИ-ПЛС-50-01 по ТУ 9398-001-39484474-2000 (НИЦФ, Россия, СПб) с антибиотиками в следующих концентрациях: цефотоксим с концентрацией 30 мкг, канамицин 30 мкг, цефтриаксон 30 мкг, гентамицин 120 мкг, триметоприм сульфат 30 мкг, азтреонам 30 мкг, оксацилин 120 мкг, амикацин 30 мкг. Штаммы засеивали сплошным газоном на овсяный агар, сверху накладывали диски, пропитанные антибиотиками. Чашки инкубировали при 27° С в течение 3-5 суток. Интерпретацию результата проводили в соответствии с инструкцией на конкретную тест-систему. Тестировали не менее 15 природных изолятов из ризосферы каждого генотипа.

Изучение способности стрептомицетов образовывать лектины. Штаммы стрептомицетов выращивали в жидкой среде Чапека-Докса (табл. 3) на качалке при температуре 20-25 °С в течении 96 час. Для определения гемагглютинирующей активности использовали надосадочную жидкость, полученную центрифугированием (при 6000 g в течение 10 мин) жидких культур стрептомицетов. Для индукции агглютинации эритроцитов использовали нативный супернатант культуральной жидкости (СКЖ) и серию разведений СКЖ 1:10, 1:25, 1:50, 1:75, 1:100. На плоскость с помощью стеклянных глазных пипеток наносили три капли: 1) раствор Кребса 2) гепаринизированную кровь здоровых женщин – добровольцев в возрасте 25-40 лет; 3) индуктор агглютинации - СКЖ стрептомицетов различной степени разведения. В течение 10 сек смешивали первую и вторую каплю, затем примешивали к этой смеси индуктор (Способ оценки..., 2013), и при появлении агглютинатов фиксировали положительный результат, который дает основание предположить в исследуемых

субстанциях наличие лектинов.

Изучение колонизирующей способности стрептомицетов.

Объектом для инокуляции служили пробирочные растения меристемного картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Пранса. Микрочеренкование растений осуществляли на среде Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962) без гормонов, с добавлением 20 г/л сахарозы. Культуры стрептомицетов выращивали в течение 4 сут в жидкой овсяной среде на качалке (120 об/мин). Титры инокулятов для штаммов ТК-5 и Т-2-20 составили 10^7 - 10^9 и 10^6 - 10^7 КОЕ/мл соответственно. Поскольку освоение благоприятных зон у стрептомицетов связано с мицелиальным ростом и в меньшей степени, чем для немиецелиальных бактерий, зависит от начальной численности популяции (Полянская, 1996), титры инокулятов для разных штаммов сочли возможным не выравнять. Инокуляцию осуществляли в ходе микрочеренкования, капельно нанося на лист картофеля по 10 мкл инокулята. Контролем служили микрочеренки того же сорта и возраста без инокуляции.

Пробирочные растения картофеля выращивали при следующем режиме: фотопериод 16 ч, освещенность 4 кЛк, температура воздуха $23 \pm 1^\circ\text{C}/16 \pm 1^\circ\text{C}$ (день/ночь). Морфометрические показатели у 15 растений в каждом варианте определяли в возрасте 20, 30 и 60 сут.

Для определения численности бактерий, колонизирующих отдельные органы, объединяли по отдельности корни, стебли и листья (за исключением инокулированного листа) от десяти растений в каждом из вариантов опыта и асептически растирали их в ступке. Разведения гомогенатов высевали на овсяный агар. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) учитывали через 7 сут, выражая его на 1 г в.-с. массы субстрата. Для выяснения способности штаммов проникать внутрь тканей посев проводили с добавлением этапа отмывания растительного материала в стерильной

дистиллированной воде. Для анализа использовали растения картофеля в возрасте 35 и 60 сут.

Для электронной микроскопии отделяли от корешков фрагменты длиной 4-5 мм и фиксировали в Na-фосфатном буфере (pH 7,2) с добавлением 2,5 % глутарового альдегида в течение 10 сут при +4 °С. Фиксатор отмывали буфером и обезвоживали образцы в водных растворах этанола в повышающихся концентрациях 30% - 50% - 70%. После двухкратной промывки абсолютным этанолом образцы помещали в прибор Hitachi HSP2 (Япония) для высушивания в атмосфере CO₂. Высушенные препараты крепили на скотч и производили напыление золотом (толщиной 15-20 нм) в атмосфере аргона. Для анализа расположения объектов на поверхности корня использовали микроскоп JSM-6380LA (Jeol, Япония), при ускоряющем напряжении 20 кВ в режиме SE (регистрации вторичных электронов). В работе использовали материалы и оборудование лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Для оценки влияния стрептомицетов на продуктивность картофеля пробирочные растения высаживали в сосуды с почвой, и выращивали в условиях естественного освещения и влажности. Количество, массу и размеры миниклубней учитывали по окончании вегетации (95 сут) растений.

Статистическую обработку данных проводили стандартными методами (Лакин, 1990) с использованием пакета программ Microsoft Excel 2007. Достоверность различий рассчитывали методом средних арифметических двух независимых совокупностей, с разными дисперсиями (Дмитриев, 1972).

Вклад факторов в общее варьирование показателя оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа, используя программу STATGRAFICS Plus for Windows.

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАТИВНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АКТИНОМИЦЕТОВ С РАСТЕНИЯМИ СЕМЕЙСТВА SOLANACEAE (НА ПРИМЕРЕ КАРТОФЕЛЯ)

3.1 Характеристика некоторых физиолого-биохимических свойств ризосферных изолятов актиномицетов

Для изучения особенностей ассоциативного взаимодействия актиномицетов с растениями картофеля использовали природные изоляты стрептомицетов ТК-5 и Т-2-20, выделенные с корней других представителей семейства Solanaceae: томата сорта Белый налив и табака сорта Самсун соответственно. Выбор данных культур был обусловлен тем, что в предварительных исследованиях они проявили полезные для ассоциативного взаимодействия с растением свойства. Так, у изолята ТК-5 была установлена способность к синтезу индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) в присутствии 200 мг/л триптофана (Назарова, Широких, 2015), он подавлял рост двух из шести тест-культур фитопатогенов, отличался образованием лектинов, которые были обнаружены реакцией гемагглютинации в супернатанте культуральной жидкости (СКЖ) и разведениях СКЖ 1:10 и 1:25 (табл. 4). Изолят Т-2-20 характеризовался более широким (против пяти тест-культур) спектром антагонистического действия, но меньшей продукцией ауксинов. СКЖ данного штамма не оказывал на эритроциты агглютинирующего действия, что говорит об отсутствии у штамма Т-2-20 лектинов.

Таблица 4 – Сравнительная характеристика метаболической активности исследуемых изолятов стрептомицетов

Показатели	Изоляты	
	ТК-5	Т-2-20
Зоны подавления роста тест-культур, мм <i>Fusarium avenaceum</i>	0	18
<i>F. culmorum</i>	24	20
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0	25
<i>Erwinia herbicola</i>	0	21
<i>Arthrobacter simlex</i>	0	21
<i>Pseudomonas putida</i>	25	0
Продукция ИУК, мг/мл	52,0	9,3
Гемагглютинирующая активность СКЖ в разведениях		
1:10	+	-
1:25	+	-
1:50	-	-

3.2 Таксономическое положение изолятов

Таксономическая идентификация изолятов, основанная на анализе фрагментов генов 16S рРНК, показала, что культуры ТК-5 и Т-2-20 являются представителями рода *Streptomyces*, семейства *Streptomycetaceae*, порядка Actinomycetales, класса Actinobacteria. Поисковым сервисом BLAST в качестве наиболее близкого (98,59% сходства) по последовательности 16S рРНК к исследуемому изоляту ТК-5 был предложен депонированный в NCBI штамм *S. flavogriseus* CBS 101.34 (NR 028988.1). Достоверность кластеризации стрептомицета ТК-5 с *S. flavogriseus* CBS 101.34 (NR 028988.1) составила 98% (рис. 2).

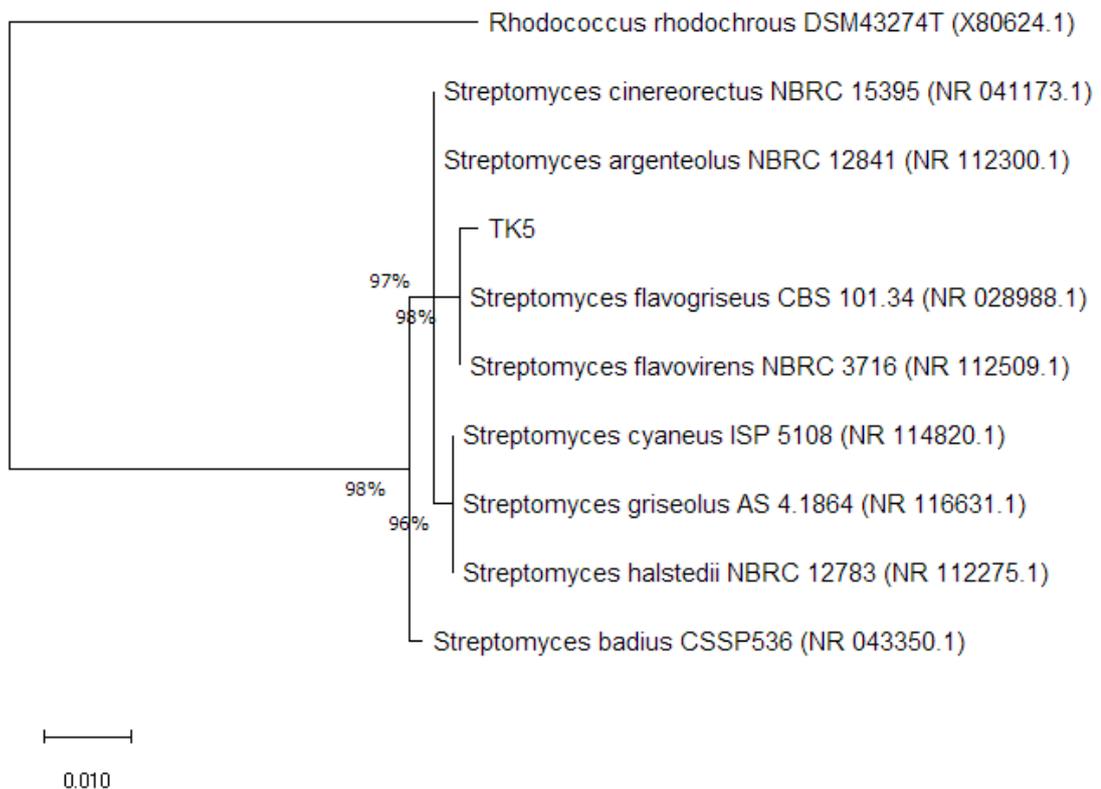


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево, полученное на основании анализа последовательностей фрагмента гена 16S рРНК штамма ТК-5 и его ближайших родственников, найденных сервисом BLAST. Масштаб соответствует одной нуклеотидной замене на 100 нуклеотидов

В качестве наиболее близких к изоляту Т-2-20 из имеющихся в ГенБанке по последовательностям 16S рРНК поисковый сервер предложил два штамма – *S. pratensis* ch 24 (NR 125616.1) (98,77% сходства) и *S. anulatus* NBRC (NR 112527.1) (98,77% сходства). Достоверность кластеризации стрептомицета Т-2-20 с тем и другим составила 92% (рис. 3). Генетические данные были сопоставлены с ранее полученной информацией об их фенотипических свойствах, согласно ключу Гаузе (Гаузе, Преображенская et al., 1983). В данном определителе нет описания морфологических и культуральных признаков вида *S. anulatus*, но в отношении его базинима *S.*

chrysomallus subsp. *fumigates* Frommer 1959 (Lanoot, Vancanneyt, et al., 2005) сказано, что данный вид можно отнести к серии *Cinereus Aureus* (С. 76).

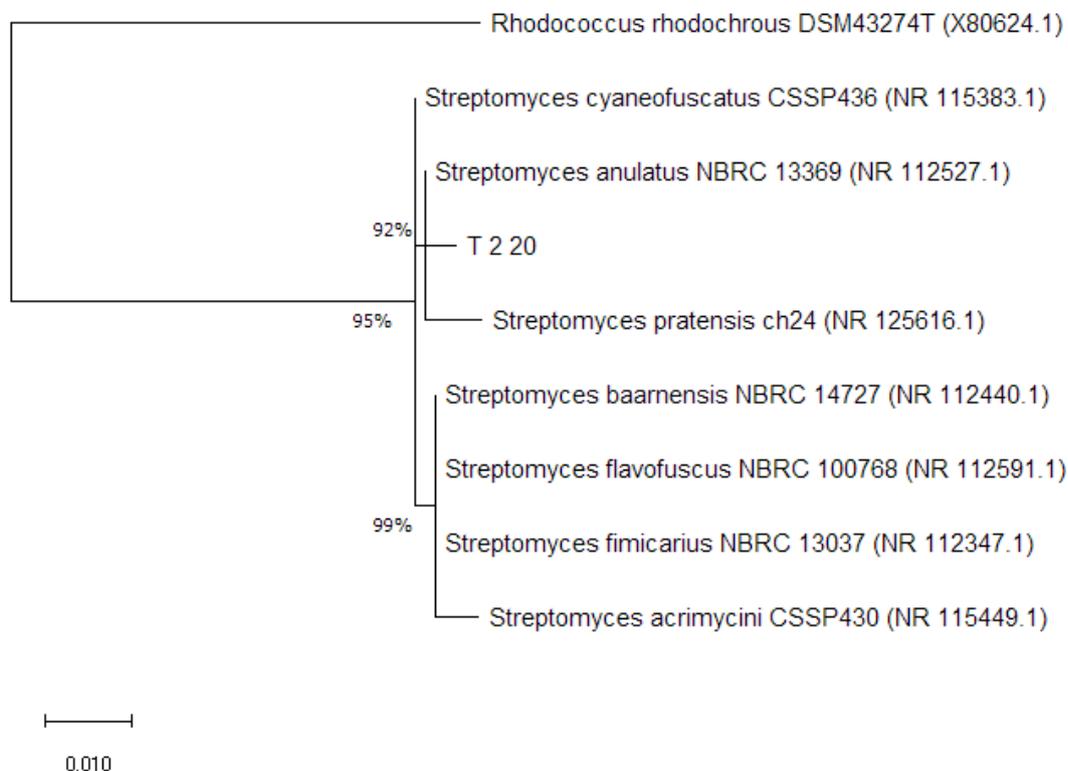


Рисунок 3 – Филогенетическое дерево, полученное на основании анализа последовательностей фрагмента гена 16S рРНК штамма Т-2-20 и его ближайших родственников, найденных сервисом BLAST. Масштаб соответствует одной нуклеотидной замене на 100 нуклеотидов

Таким образом, из двух предложенных для стрептомицета Т-2-20 была выбрана последовательность, принадлежащая штамму *S. anulatus* NBRC (NR 112527.1), как наиболее соответствующая фенотипически. Выявление у *S. anulatus* Т-2-20 широкого спектра антагонистической активности хорошо согласуется с ранее описанным синтезом различными представителями этого вида таких антибиотиков, как актиномицин, эндофеназины А, В и С, тубермицин В, эпокарбазолин и эпокарбазолин В, актиномицин С, а также

фермента декстраназы и ингибитора теломеразы – теломестатина (Saleh, Flinspach et al., 2012).

3.3 Колонизация растений картофеля стрептомицетами

Отобранные стрептомицеты использовали для изучения процессов колонизации пробирочных растений меристемного картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Пранса. Инокуляцию осуществляли в ходе микрочеренкования растений, капельно нанося на лист картофеля по 10 мкл инокулята. Контролем служили микрочеренки того же сорта и возраста без инокуляции.

Изучение колонизирующей активности ризосферных изолятов *S. flavogriseus* ТК-5 и *S. anulatus* Т-2-20 показало, что с инокулированного листа стрептомицеты активно распространялись по растительным тканям и, спустя 35 сут после инокуляции, методом посева *S. flavogriseus* ТК-5 обнаруживался практически во всех органах, а *S. anulatus* Т-2-20 – в стеблях и корнях меристемного картофеля (рис. 4). Между штаммами были установлены различия в активности колонизации отдельных органов. Так, численность *S. flavogriseus* ТК-5 в корнях $(6,05 \pm 0,79) \times 10^6$ КОЕ/г) на три порядка превысила таковую в листьях $((6,3 \pm 1,4) \times 10^3$ КОЕ/г) и стеблях $((1,3 \pm 0,02) \times 10^3$ КОЕ/г), тогда как *S. anulatus* Т-2-20 в большем количестве обнаруживался в стеблях $((7,8 \pm 2,8) \times 10^5$ КОЕ/г), в меньшем – в корнях $((6,5 \pm 2,8) \times 10^4$ КОЕ/г), а в листьях не обнаруживался вовсе. Большое сродство штамма ТК-5 к корням, чем к листьям колонизируемых растений, а также более высокая в сравнении со штаммом Т-2-20 колонизирующая активность, могут быть связаны со способностью ТК-5 продуцировать ауксины и лектины.

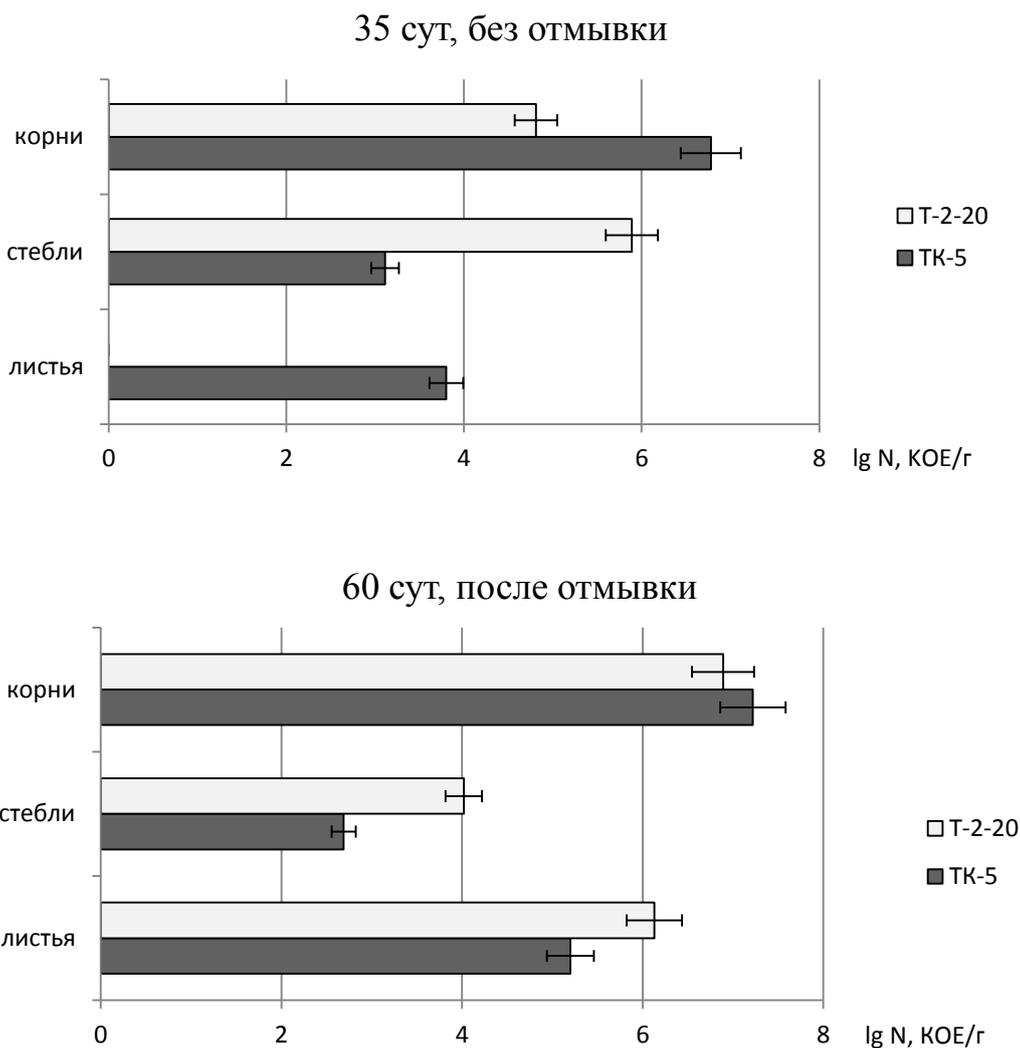


Рисунок 4 – Численность ($\lg N$, КОЕ/г) стрептомицетов в различных органах меристемного картофеля в зависимости от исследуемого штамма и возраста растения.

Лектины представляют собой гликопротеины, способные обратимо и избирательно связывать углеводы и углеводные детерминанты биополимеров без изменения их структуры. Это свойство лежит в основе многочисленных биологических функций лектинов, и на нём основана их способность агглютинировать эритроциты. Среди почвенных стрептомицетов ранее гемагглютинирующая активность была обнаружена у антагонистов фитопатогенов (Белявская, Коваленко и др., 2014) и

устойчивых к тяжёлым металлам штаммов (Valagurova, Iutinskaya et al., 1996). На основании полученных результатов мы предполагаем возможную связь лектинов ризосферных стрептомицетов с колонизацией растительных тканей.

Результаты определения численности стрептомицетов при посеве из разведений тканевых гомогенатов были дополнены результатами электронной сканирующей микроскопии, которая позволила визуализировать результаты инокуляции листьев микрочеренков штаммами ТК-5 и Т-2-20 – колонизацию стрептомицетным мицелием корней пробирочных растений картофеля (рис. 5).

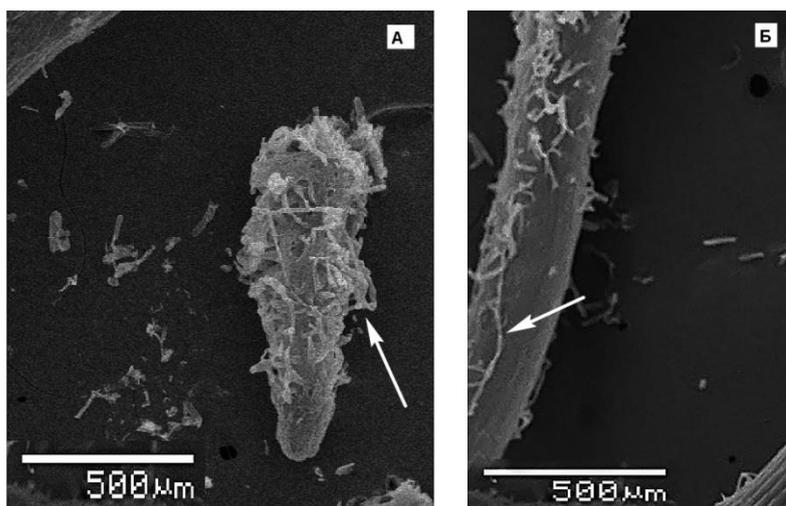


Рисунок 5 – Колонизация корней меристемных пробирочных растений картофеля Пранса мицелием *S. flavogriseus* ТК-5 (А) и *S. anulatus* Т-2-20 (Б). Возраст растений – 60 сут.

Различия в колонизации разными штаммами стали менее явными, когда микрорастения картофеля достигли возраста 60 сут (рис. 5). По результатам посева, наиболее высокую концентрацию пропагул наблюдали в корнях $((7,81 \pm 1,49) \times 10^6$ и $(1,68 \pm 0,85) \times 10^7$ КОЕ/г)) и в листьях –

$((1,35 \pm 0,37) \times 10^6$ и $(1,6 \pm 1,02) \times 10^5$ КОЕ/г соответственно для Т-2-20 и ТК-5). Плотность заселения стеблей была достоверно ниже – от $(4,9 \pm 1,21) \times 10^2$ КОЕ/г у штамма ТК-5 до $(1,06 \pm 0,13) \times 10^4$ КОЕ/г у штамма Т-2-20. При этом плотность заселения корней и листьев штаммом Т-2-20 различалась в пределах одного порядка, а для продуцирующего лектины штамма ТК-5 различия достигали двух порядков. Приведенные количественные характеристики по колонизации картофеля стрептомицетами получены после проведения процедуры предварительной отмывки поверхности растений водой, что свидетельствует о способности мицелиальных бактерий проникать внутрь растительных тканей, а не только распространяться на их поверхности.

Подвергнутые инокуляции растения внешне не отличались от контрольных. Сравнение контрольных и колонизированных растений по морфометрическим показателям показало, что негативного влияния на рост и развитие картофеля *in vitro* заселение растений мицелиальными прокариотами не оказывает (табл. 5).

Таблица 5 – Морфометрические показатели пробирочных растений картофеля *in vitro*

Вариант	Длительность культивирования, сут	Длина стебля, мм	Кол-во междоузлий, шт	Кол-во листьев, шт
контроль	20	33±14,1	2,9±1,19	3,3±1,75
ТК-5		22±11,8	1,6±0,88	1,8±1,09
Т-2-20		35±11,9	2,5±0,92	3,3±1,03
контроль	30	49±22,0	3,6±1,76	5,4±2,16
ТК-5		47±16,2	3,3±0,82	5,2±1,17
Т-2-20		52±14,7	3,7±0,73	5,1±1,29
контроль	60	66±20,1	4,1±1,10	10,6±3,03
ТК-5		67±10,2	6,0±1,15	11,0±1,79
Т-2-20		77±12,1	6,3±1,11	12,5±1,61

Между контрольными и колонизированными растениями также не было достоверных различий, при последующем их выращивании в почве. В

качестве тенденции отмечено, что инокуляция картофеля *S. anulatus* T-2-20 способствовала в первом клубневом поколении увеличению в два раза доли средней фракции (20-40 мм), при одновременном снижении на 18% доли мелкой фракции (менее 20 мм) в сравнении с контролем (табл. 6).

Таблица 6 – Показатели продуктивности картофеля Пранса в первом клубневом поколении

Вариант	Количество клубней с растения, шт	Масса клубней с растения, г*	Количество миниклубней по фракциям, %		
			≤ 20 мм	20-40 мм	≥40 мм
Контроль	6,7 ± 2,3	<u>19,2</u> 0,5 - 78,5	65	20	15
ТК-5	7,0 ± 2,4	<u>16,8</u> 1,0 - 58,6	67	21	12
T-2-20	5,0 ± 1,5	<u>26,2</u> 1,6 - 105,4	47	40	13

* Числитель – среднее значение, знаменатель – минимальное и максимальное значения

Таким образом, изучение колонизирующей активности мицелиальных бактерий *S. flavogriseus* ТК-5 и *S. anulatus* T-2-20, выделенных соответственно из ризосферы табака и томата, показало их способность успешно заселять поверхность различных органов и проникать в ткани меристемных растений картофеля. При искусственной бактеризации популяционная плотность мицелиальных прокариот в надземных органах картофеля может достигать 10^2 - 10^6 КОЕ/г, а в корнях – 10^6 - 10^7 КОЕ/г, в зависимости от штамма.

Сравнительный анализ морфометрических показателей растений показал, что колонизация стрептомицетами не оказала негативного влияния на рост и развитие картофеля *in vitro* и *ex vitro*. Полученные результаты дают основание к использованию стрептомицетов в качестве модельной группы микроорганизмов для биоиндикационных оценок в ризосфере растений семейства Solonasea.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ НЕЗАВИСИМЫХ ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЙ ТАБАКА И ТОМАТА

4.1 Оценка функциональной активности гетерологичного гена *Fe-SOD1* в вегетативном потомстве ГМР

До проведения исследований по выявлению изменений в структуре микробных комплексов в ризосфере генетически модифицированных растений необходимо было убедиться, что в вегетативном потомстве линий - трансформантов гетерологичный ген *Fe-SOD1* не только сохранился, но и экспрессируется, о чем можно судить по его функциональной активности. Поэтому следующим этапом работы явилась проверка функциональной активности встроенного для усиления антиоксидантной защиты растений гена *Fe-SOD1* у клонов трансгенных линий табака и томата.

4.1.1 Результаты проверки трансгенных линий томата

При выращивании растений томата в условиях закрытого грунта было показано, 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. 6). При этом величина накопления в листьях МДА, отражающая интенсивность перекисного окисления липидов, в начальный период развития растений в листьях растений исходного сорта была существенно выше, чем у растений, получивших гетерологичный ген *Fe-SOD1*.

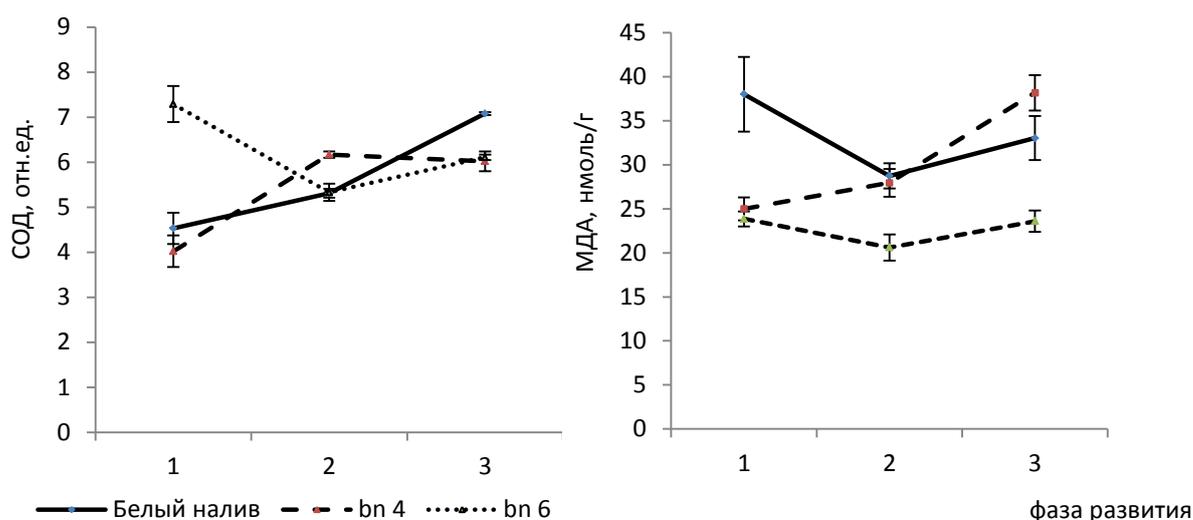


Рисунок 6 – Динамика общей активности СОД и перекисного окисления липидов в листьях различных генотипов томата по фазам развития: 1) пять настоящих листьев, 2) первая цветочная кисть, 3) образование завязи.

Более низкий, в сравнении с исходным сортом, уровень окислительной деструкции у линии bn 6 сохранялся в течение всего периода наблюдений, а у линии bn 4 – только в начальный период онтогенеза растений, что могло быть связано с неустойчивой экспрессией встроенного гена.

Проверка функциональной активности встроенного гена *Fe-SOD1* в листьях томата другой трансгенной линии bn 34 показала, что существенных различий между трансформантом линии bn 34 и исходным сортом по общей активности супероксиддисмутазы не было, как у пробирочных растений, так и у растений, выращенных в почве (табл. 7).

Таблица 7 – Показатели перекисного гомеостаза растений томата

Среда	МДА, нмоль/г сырой массы		СОД, ед./г сырой массы	
	in vitro	in vivo	in vitro	in vivo
Исходная форма	28,3±2,9	17,32±0,49	1,04±0,28	5,17±0,17
bn 34	27,53±3,8	12,84±0,13	1,06±0,20	5,10±0,20

В то же время, накопление МДА – продукта перекисного окисления липидов – в листьях высаженных в почву растений-трансформантов было на 26% ниже, чем у исходного сорта. Это свидетельствует в пользу функциональной активности гетерологичного гена и обеспечения более устойчивого состояния перекисного гомеостаза у трансформантов, чем у обычных растений. Вместе с тем, вставка чужеродного гена сопровождалась некоторыми перестройками в комплексе фотосинтетических пигментов в листьях томата. Так, по сравнению с исходным сортом, в листьях трансформантов было на 17% ниже содержание суммарного хлорофилла и на 26% выше содержание каротиноидов (табл. 8).

Таблица 8 – Содержание пластидных пигментов в листьях томата

Генотип	Хлорофиллы, мг/г			Каротиноиды, мг/г	Соотношение	
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a+b</i>		хлорофиллов <i>a/b</i>	хлорофиллы/ каротиноиды
Исходная форма	6,5±0,22	2,86±0,05	9,36±0,77	0,83±0,13	2,3	11,3
bn 34	6,00±0,0	1,82±0,13	7,82±0,02	1,05±0,01	3,3	7,4

Выявленные различия в биохимических показателях могли сопровождаться различиями и в корневой экскреции трансформанта и исходного сорта.

Сравнительный анализ морфометрических показателей растений во втором семенном поколении (T2), показал, что в результате генно-инженерного вмешательства линейные размеры (высота растения, длина листьев и междоузлий) у линий bn 27 и bn 34 изменились по сравнению с растениями исходного сорта, в основном, незначительно (табл. 9).

Однако на уровне тенденции можно отметить более короткие, чем у исходного сорта, междоузлия и низкорослость в целом линии bn 34, тогда как

линия bn 27 по высоте растений, наоборот, в среднем на 7% превосходила исходный сорт.

Таблица 9 – Морфометрические показатели томатов исходного сорта и трансгенных линий

Показатель	Исходный сорт Белый налив	Трансгенные линии	
		bn 27	bn 34
Высота растения, см	95,9±14,7	102,5±17,8	66,8±21,6
Длина междоузлия, см	8,2±1,9	7,5±3,1	5,2±1,8
Количество листьев до первой цветочной кисти, шт	6,9±1,2	6,3±0,7	6,6±0,5
Длина второго подфлагового листа, см	25,8±3,4	24,6±4,4	25,4±5,0
Количество цветков верхней кисти, шт	4,6±0,7	3,8±1,2	4,1±1,8
Количество плодов с растения, шт,	10,8±1,1	9,7±1,1	6,4±1,1
Масса плода, г	16,8±7,9	14,2±8,3	22,9±15,0
Количество семенных камер плода, шт,	3-4	4-5	5
Продуктивность растения, г	180,0±16,0	136,0±83,0	147,0±6,0

У трансформированных растений отмечены также тенденция к уменьшению на 5-9% количества листьев до первой цветочной кисти и более поздние, особенно у линии bn 34, сроки формирования первой завязи, чем у сорта Белый налив.

Продуктивные признаки растений трансгенных линий, возможно, в связи с увеличением продолжительности их вегетационного периода, в ряде случаев уступали исходному сорту. Так, у растений линии bn 34, при одновременном у всех генотипов определении показателей, наблюдали значительно меньшие значения по таким продуктивным признакам, как количество цветков в кисти (на 12%), количество плодов с растения (на 69%),

продуктивность растения (на 22%), Вместе с тем, растения этой линии отличались от других сравниваемых генотипов крупноплодностью. Средняя масса плода у растений линии bn 34 превосходила на 36% сорт Белый налив и на 61% линию bn 27. Снижение по сравнению с исходным сортом продуктивных признаков у растений линии bn 27 оценивалось как статистически недостоверное.

Определение показателей перекисного гомеостаза в листьях показало, что растения T2 трансгенных линий bn 27 и bn 34 характеризовались близкими значениями общей активности СОД, но исходный сорт достоверно (на 24%) превысила только линия bn 27 (табл. 10).

Таблица 10 – Активность СОД и ПОЛ в листьях растений томата

Показатель	Исходный сорт Белый налив	Трансгенные линии	
		Bn 27	Bn 34
СОД, ед/г сырой массы	5,45±0,39	6,76±0,92*	6,42±0,74
МДА, нмоль/г сырой массы	29,56±4,98	14,03±2,94*	11,49±2,77*

Примечание: * отличие от исходного сорта достоверно при $P \geq 0,05$

Накопление МДА – продукта ПОЛ – в листьях обеих трансгенных линий томата было ниже по сравнению с исходной формой в 2,1-2,5 раза, что может свидетельствовать о большей сбалансированности окислительно-восстановительных процессов у T2 растений, снабженных гетерологичной вставкой *Fe-SOD1*.

Сравнительное изучение независимых трансгенных по гену *Fe-SOD1* линий томата bn 27 и bn 34 не выявило существенных различий между ними и исходным сортом Белый налив в поколении T2 по большинству морфометрических показателей. Однако линия bn 34 отличалась от исходного сорта более низкой продуктивностью, связанной, по-видимому, с

увеличением продолжительности фаз развития, по сравнению с растениями исходного сорта.

4.1.2 Результаты проверки трансгенных линий табака

Проверку функциональной активности встроенного гена у растений табака осуществляли в условиях моделируемого эдафического стресса, обусловленного токсичностью алюминия в кислых почвах. В обычных условиях у трансформантов Ttrf 13 и Ttrf 3 показатели суммарной активности СОД достоверно выше, чем в листьях исходного сорта Самсун, что может говорить о суперэкспрессии встроенного гена антиоксидантного фермента Fe-SOD1 и о более высоком уровне антиоксидантной защиты у трансгенных линий табака. Различия с контролем по активности СОД, несущественные у трансформированных растений в фазу укоренения рассады, усиливались в процессе онтогенеза растений (рис. 7). На фоне окислительного стресса, обусловленного токсичностью алюминия в кислой почве, преимущество перед исходным сортом проявила только линия Ttrf 13, тогда как у трансформантов линии Ttrf 3 суммарная активность СОД в листьях значительно уступала показателям сорта Самсун 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*.

Проверку функциональной активности встроенного гена у растений табака другой линии Ttrf 2 осуществляли так же в условиях моделируемого эдафического стресса, обусловленного токсичностью алюминия в кислых почвах. В листьях подвергнутых стрессу растений табака исходного сорта Самсун наблюдали резкое сокращение количества пластидных пигментов в

сравнении с контрольными растениями, выращенными на почве без алюминия.

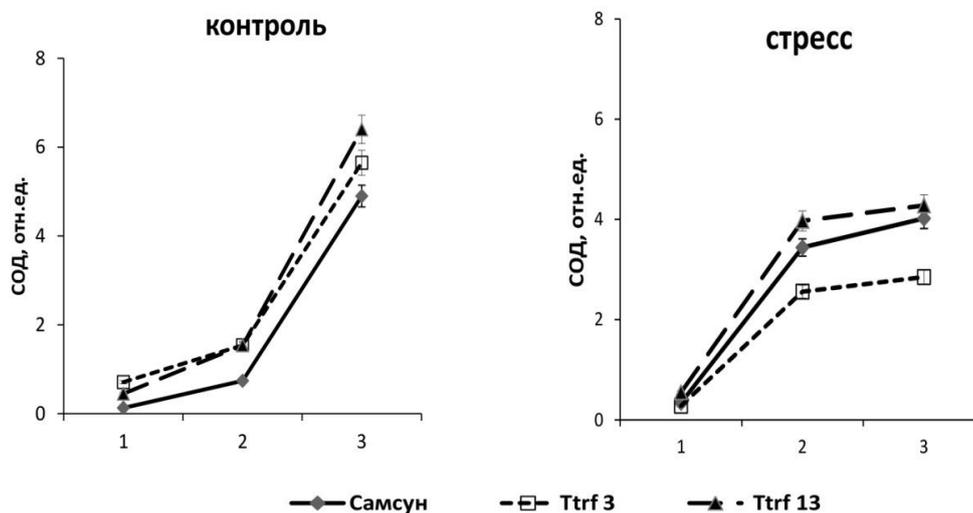


Рисунок 7 – Динамика общей активности СОД в листьях различных генотипов табака по фазам развития: укоренение рассады (1), формирование растений (2), цветение (3). На контрольном и провокационном фоне

Так, содержание хлорофиллов *a* и *b*, каротиноидов было ниже в фазу формирования растений соответственно на 33, 36 и 34%, а в фазу цветения – на 44, 42 и 33%, чем в контроле без алюминия (рис. 8). Линии табака, экспрессирующие ген *Fe-SOD1* из *Arabidopsis thaliana*, существенно различались между собой по реакции на алюминий. Так, линия Ttrf 2 под воздействием алюминия характеризовалась снижением количества фотосинтетических пигментов в листьях, в особенности – хлорофиллов.

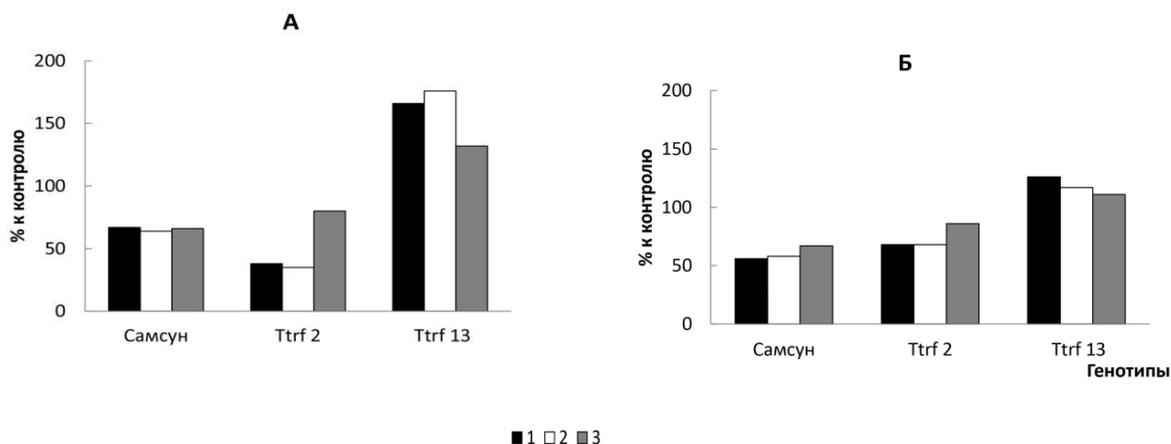


Рисунок 8 – Содержание хлорофилла *a* (1), *b* (2) и каротиноидов (3) в листьях табака на кислой почве с алюминием в фазе формирования растений (А) и цветения (Б).

У линии Ttrf 13, напротив, содержание пластидных пигментов на фоне вызванного алюминием стресса было выше, чем в обычных условиях. Суммарное содержание хлорофиллов в листьях Ttrf 13 на кислом фоне с алюминием превысило уровень контрольных растений на 70% в фазу формирования и на 23% в фазу цветения растений. По содержанию каротиноидов в листьях Ttrf 13 наблюдаемое при стрессе превышение контроля составило 11-32% в зависимости от фазы развития. В начальный период развития – в фазу укоренения – различия по количеству фотосинтетических пигментов между исходным сортом и линиями трансформантов на фоне стресса и в контроле оценивались как недостоверные.

Преимущество трансформанта Ttrf 13 перед исходным сортом заключалось в способности увеличивать в условиях стресса количество пластидных пигментов, тогда как у исходного сорта на фоне алюминия, их содержание, напротив, снижалось. Увеличение содержания

фотосинтетических пигментов в листьях растений-трансформантов Ttrf 13 на фоне стресса свидетельствует в пользу их большей устойчивости к алюминию. Это может объясняться изменениями в перекисном гомеостазе растений, вследствие суперэкспрессии гена антиоксидантного фермента Fe-SOD1, придающего растениям устойчивость к повреждающему действию окислительного стресса.

Сравнение в листьях табака исходного сорта Самсун и исследуемых линий трансформантов показателей суммарной активности СОД и МДА – продукта перекисного окисления липидов – подтвердило это предположение. Несмотря на то, что накопление МДА в листьях трансформанта Ttrf 13, выращенного в обычных условиях, было выше, чем у исходного сорта на протяжении всего периода наблюдений, интенсивность ПОЛ на кислой почве с алюминием (от $2,09 \pm 0,55$ до $39,13 \pm 3,69$ н/моль/г) не превышала аналогичный показатель контрольных растений (от $9,85 \pm 1,62$ до $47,23 \pm 4,47$ н/моль/г). Активность же антиоксидантного фермента СОД, напротив, в листьях Ttrf 13 была достоверно выше, чем в листьях исходного сорта Самсун, как при выращивании в обычных (в 1,3-3,5 раза в зависимости от фазы), так и в стрессовых (в 1,1-1,6 раза в зависимости от фазы) условиях. Повышение суммарной активности СОД, обусловленное вставкой чужеродного гена *Fe-SOD1*, очевидно, и оказало защитное действие на фотосинтетический аппарат в условиях вызванного алюминием стресса и обеспечило более высокий уровень пластидных пигментов в листьях трансформанта Ttrf 13 (рис. 8). У трансгенной линии Ttrf 2, отличающейся низкой сохранностью пластидных пигментов под воздействием алюминия, интенсивность процессов ПОЛ, в отличие от Ttrf 13, при стрессе увеличивалась в 1,6 – 2,2 раза в зависимости от фазы развития (рис. 9).

Суммарная активность СОД в листьях трансформантов Ttrf 2, выращенных в стрессовых условиях, тоже возрастала в начальный (в 12 раз) и завершающий (в 1,5 раза) периоды наблюдений, однако в фазу «формирование растений» активность СОД в контроле ($1,57 \pm 0,16$ усл. ед) и на фоне стресса ($1,46 \pm 0,15$ усл. ед.) имела близкие значения. На фоне обусловленного алюминием стресса отсутствию значимых изменений в активности антиоксидантного фермента СОД в листьях Ttrf 2 соответствовало крайне низкое содержание хлорофилла *a* ($1,97 \pm 0,17$ мг/г), хлорофилла *b* ($0,96 \pm 0,07$ мг/г), каротиноидов ($0,59 \pm 0,04$ мг/г) и максимальное накопление продукта пероксидации мембранных липидов - МДА ($45,05 \pm 4,34$ нмоль/г). Это указывает на отсутствие в листьях Ttrf 2 стабильной экспрессии и функциональной активности встроенного гена *Fe-SOD1*.

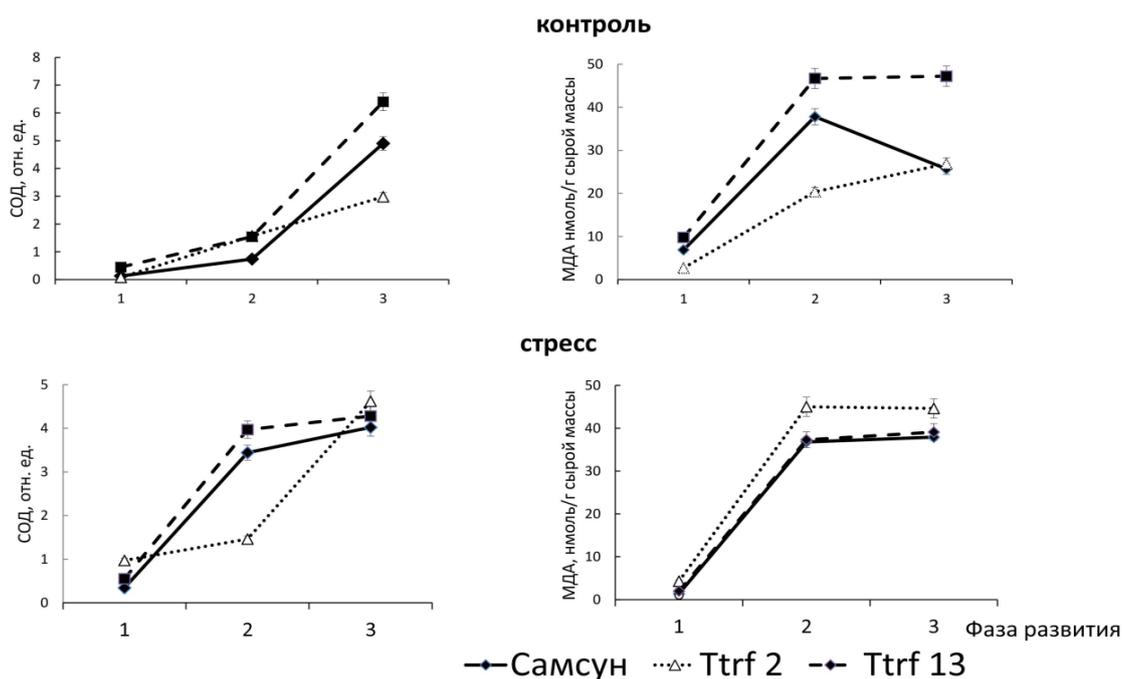


Рисунок 9 – Динамика общей активности СОД и ПОЛ в листьях различных генотипов табака по фазам развития: укоренение рассады (1), формирование растений (2), цветение (3). На контрольном и провокационном фоне

Трансгенные растения табака Самсун линии Ttrf 8 по содержанию каротиноидов и хлорофиллов отличались от исходного сорта небольшим

снижением хлорофилла а и хлорофилла б, в то время, как на провокационном фоне изменения были более существенны, и сопровождалось снижением содержания пигментов у растений исходного сорта Самсун (рис. 10).

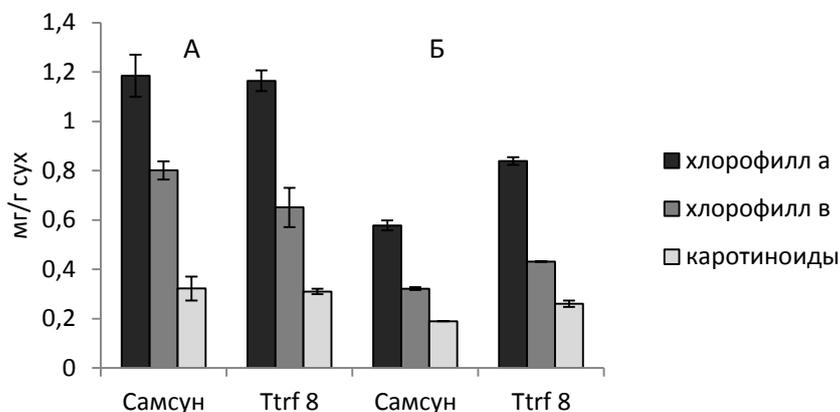


Рисунок 10 – Содержание хлорофилла а, б и каротиноидов в листьях табака на контрольном (А) и провокационном (Б) фоне.

По содержанию МДА так же видно, что в стрессовых условиях провокационного по почвенной кислотности и токсичности алюминия фона, встроенный ген *Fe-SOD1* препятствует накоплению в клетках растений продуктов перекисного окисления мембран (рис. 11).

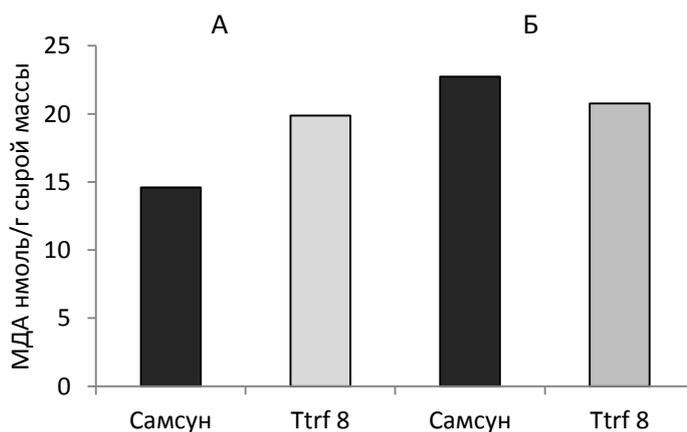


Рисунок 11 – Общая активность ПОЛ в листьях табака на контрольном (А) и провокационном (Б) фоне

ГЛАВА 5. ЧИСЛЕННОСТЬ, РАЗНООБРАЗИЕ И ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА РИЗОСФЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ АКТИНОМИЦЕТОВ

5.1 Численность и структура комплексов актиномицетов в ризосфере ГМ и исходных сортов томата

Сравнительное изучение структуры комплексов актиномицетов в ризосфере томата выявило у растений с генно-инженерным усилением антиоксидантной защиты ряд отличий от исходного сорта Белый налив. Ризосферный комплекс линии bn 6 отличался более низкими значениями абсолютной (266 тыс, КОЕ/г) и относительной (2,8%) численности, но более высоким родовым и видовым разнообразием мицелиальных прокариот (табл. 11). Индекс Шеннона, рассчитанный для линии bn 6 ($H=0,822$) 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 bn 6 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 в комплексе стрептомицетов (84%), традиционно считающихся видами-убиквистами. Актиномицетный комплекс линии bn 6 включал в качестве минорного компонента представителей рода *Streptosporangium* (2,9%), не выявленных в ризосфере исходного сорта.

Таблица 11 – 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
Относительное обилие в комплексе представителей родов, % :			
<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 bn 6 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. 12).

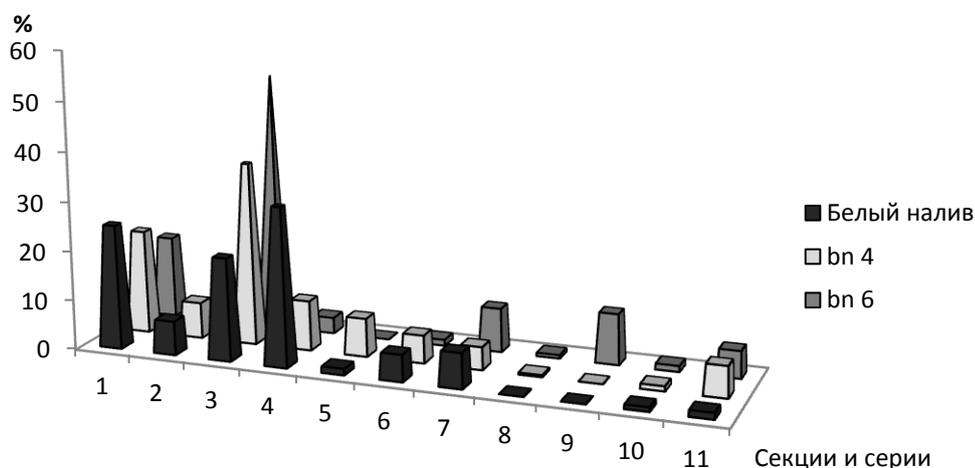


Рисунок 12 – Частота встречаемости в ризосфере различных генотипов томата видов из секций и серий: 1 – Albus Albus, 2– Albus Albocoloratus, 3 – Cinereus Achromogenes, 4 – Cinereus Chromogenes, 5 – Cinereus Aureus, 6 – Cinereus Violaceus, 7 – Helvolo-Flavus, 8 – Azureus, 9 – Roseus, 10 – Imperfectus, 11 – род *Micromonospora*

В стрептомицетном комплексе линии bn 6 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. 13).

Комплекс актиномицетов в ризосфере трансгенной линии bn 4 отличался от комплекса исходного сорта в меньшей степени, чем комплекс линии bn 6. Менее выраженными были изменения в численности и разнообразии актиномицетов, относительном обилии выделяемых родов (см. табл. 11). Однако общие тенденции, заключающиеся в более низкой заселенности актиномицетами ризосферы трансформанта при увеличении их разнообразия, прослеживались и в этом случае.

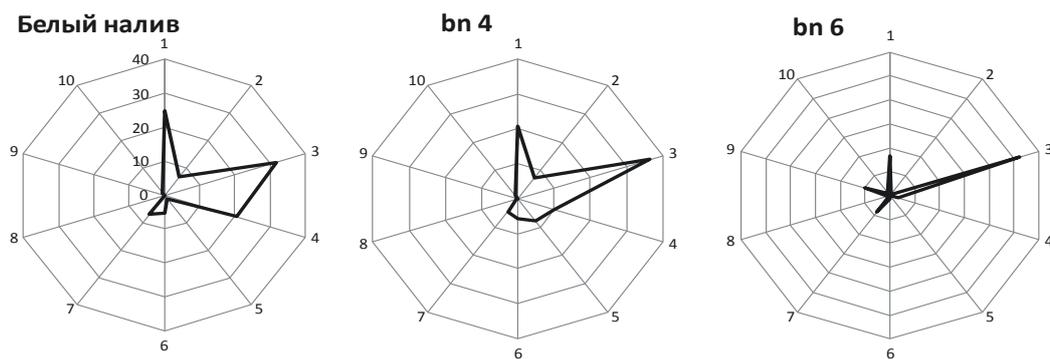


Рисунок 13 – Долевое участие (%) в ризосферных комплексах различных генотипов томата видов из секций и серий: 1 – *Albus Albus*, 2 – *Albus Albocoloratus*, 3 – *Cinereus Achromogenes*, 4 – *Cinereus Chromogenes*, 5 – *Cinereus Aureus*, 6 – *Cinereus Violaceus*, 7 – *Helvolo-Flavus*, 8 – *Azureus*, 9 – *Roseus*, 10 – *Imperfectus*

Спектр доминирующих секций и серий в ризосфере линии bn 4 расширился с 6 до 7, за счет видов из серии *Cinereus Aureus* (см. рис. 11), при этом долевое участие в комплексе видов серии *Cinereus Chromogenes* сократилось вдвое (см. рис. 13). Других значительных изменений по сравнению с комплексом стрептомицетов исходного сорта в ризосфере линии bn 4 не выявлено.

У трансгенной линии bn 34 численность ассоциированных с корнями мицелиальных прокариот составила сотни тысяч КОЕ/г и существенно не различалась у растений исходного сорта и трансформантов. Увеличилась в два раза доля актиномицетов от общей численности прокариот в ризосфере трансформированных растений. В таксономической же структуре, напротив, выявлены значимые отличия: ризосферный комплекс исходного сорта был представлен родами *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Streptoverticillium* и олигоспоровыми формами актиномицетов, тогда как комплекс трансформантов включал представителей только родов *Streptomyces*, *Micromonospora* и олигоспор (табл. 12).

Таблица 12 – Численность и структура комплексов актиномицетов в ризосфере томата в зависимости от генотипа растения

Показатель	Генотип растения	
	Белый налив	bn 34
Общая численность прокариот, вырастающих на КГА, тыс, КОЕ/г	873,3	651.2,0
Доля актиномицетов в прокариотном комплексе, %	7,8	15,2
Количество секций и серий рода <i>Streptomyces</i>	7,0	6,0
Количество родов, выделяемых на среде с пропионатом натрия	4,0	2,0
Относительное обилие в комплексе представителей родов, % :		
<i>Streptomyces</i>	88,2	56,2
<i>Micromonospora</i>	2,3	33,1
олигоспоровые формы	7,9	10,7
<i>Streptosporangium</i>	1,5	0
<i>Streptoverticillium</i>	0,1	0

На видовом уровне сократилась на корнях трансформантов представленность стрептомицетов: не обнаружены в составе комплекса виды секций и серий *Albus Albus*, *Cinereus Achromogenes*, *Helvolo-Flavus*, *Roseus* и *Imperfectus*, зато появились виды серии *Cinereus Aureus* (рис. 14). По доле участию актиномицетов в комплексе, трансгенная линия bn 34 превосходила контрольные растения, за счет снижения разнообразия видов секций и серий (рис. 15). Если контрольные растения были представлены восемью видами секций и серий, то линия bn 34 только лишь тремя.

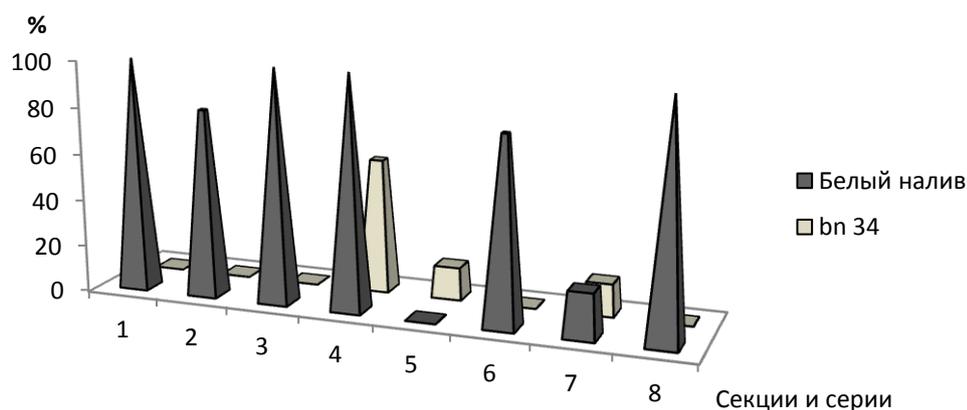


Рисунок 14 – Частота встречаемости в ризосфере различных генотипов томата видов из секций и серий: 1 – Albus Albus, 2– Albus Albocoloratus, 3 – Cinereus Achromogenes, 4 – Cinereus Chromogenes, 5 – Cinereus Aureus, 6 – Helvolo-Flavus, 7 – Roseus, 8 – Imperfectus.

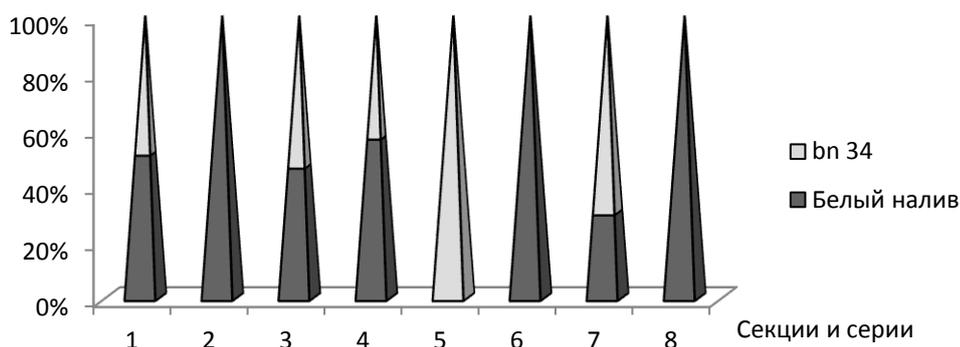


Рисунок 15 – Долевое участие (%) в ризосферных комплексах различных генотипов томата видов из секций и серий: 1 – Albus Albus, 2– Albus Albocoloratus, 3 – Cinereus Achromogenes, 4 – Cinereus Chromogenes, 5 – Cinereus Aureus, 6 – Helvolo-Flavus, 7 – Roseus, 8 – Imperfectus.

Анализ таксономической структуры комплексов актиномицетов в ризосфере томата Белый налив и его трансгенных линий bn 27 и bn 34 второго поколения (T2), несущих гетерологичную вставку *Fe-SOD1*, показал следующее: у трансгенных линий увеличилась на 40% по сравнению с исходным сортом частота встречаемости в комплексах представителей рода

Micromonospora, появились виды *Streptosporangium*, но исчезли виды рода *Streptoverticillium*, снизилось относительное обилие стрептомицетов, особенно в ризосфере линии bn 34 (на 35%), и олигоспоровых форм. При этом общая численность актиномицетов, вырастающих на среде с пропионатом натрия, в ризосфере томата трансгенных линий была существенно выше, чем у сорта Белый налив (табл. 13).

Таблица 13 – Численность и структура комплексов актиномицетов в ризосфере томата в зависимости от генотипа растения

Показатель	Генотип растения (Т2)		
	Белый налив	bn 27	bn 34
Общая численность прокариот, вырастающих на КГА, тыс, КОЕ/г	618,9	367,2	518,8
Доля актиномицетов в прокариотном комплексе, %	0,1	3,5	1,4
Количество секций и серий рода <i>Streptomyces</i>	5,0	9,0	6,0
Количество родов, выделяемых на среде с пропионатом натрия	4,0	5,0	5,0
Относительное обилие в комплексе представителей родов, % :			
<i>Streptomyces</i>	89,4	81,3	54,4
<i>Micromonospora</i>	4,4	14,2	42,7
олигоспоровые формы	3,9	0,8	2,5
<i>Streptosporangium</i>	0	3,7	0,4
<i>Streptoverticillium</i>	2,3	0	0

Изучение видовой структуры рода *Streptomyces* в ризосфере сравниваемых генотипов позволило установить изменения состава доминантов. Так, у исходного сорта на корнях доминировали представители

неокрашенных секций и серий *Albus* (доля участия 58,6%) и *Cinereus Achromogenes* (доля участия 17,4%) (рис. 15), тогда как в ризосфере трансгенных линий возрастали частота встречаемости и доля участия в комплексе видов из окрашенных секций и серий *Cinereus Violaceus*, *Cinereus Chromogenes* и *Helvolus* (рис. 16, 17).

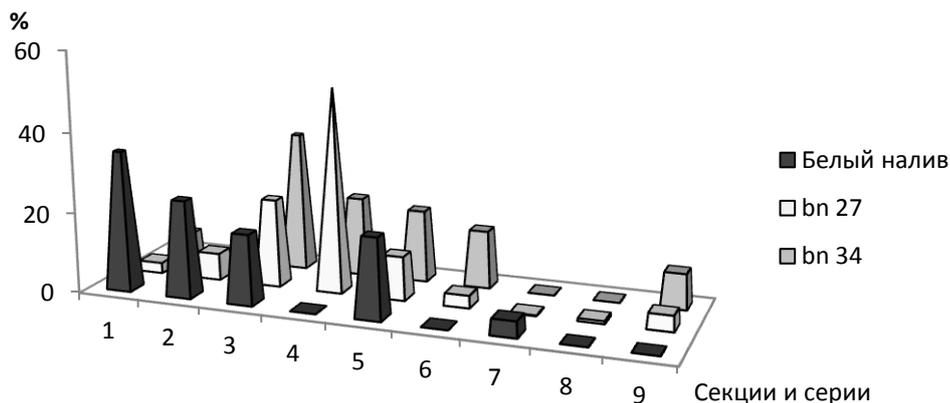


Рисунок 16 – Частота встречаемости в ризосфере различных генотипов томата видов из секций и серий: 1 – *Albus Albus*, 2– *Albus Albocoloratus*, 3 – *Cinereus Achromogenes*, 4 – *Cinereus Chromogenes*, 5 – *Cinereus Violaceus*, 6 – *Helvolo-Flavus*, 7 – *Roseus*, 8 – *Imperfectus*, 9 – род *Micromonospora*

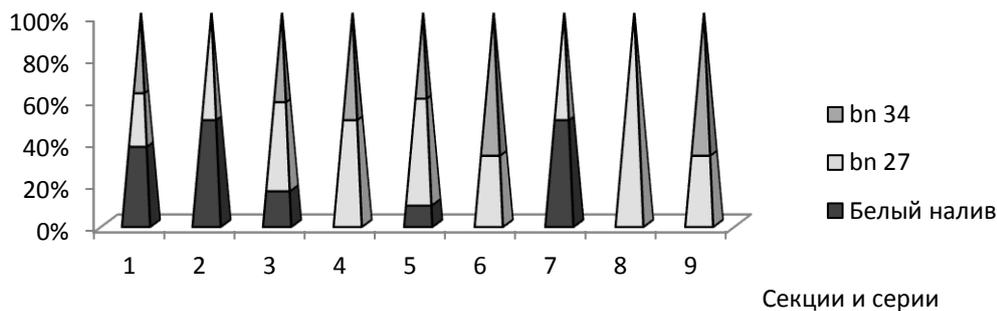


Рисунок 17 – Долевое участие (%) в ризосферных комплексах различных генотипов томата видов из секций и серий: 1 – *Albus Albus*, 2 – *Albus Albocoloratus*, 3 – *Cinereus Achromogenes*, 4 – *Cinereus Chromogenes*, 5 – *Cinereus Violaceus*, 6 – *Helvolo-Flavus*, 7 – *Roseus*, 8 – *Imperfectus*, 9 – род *Micromonospora*

Полученные результаты показывают, что генно-инженерное усиление антиоксидантной защиты томата может приводить к изменению сообществ микроорганизмов, ассоциированных с корнями растений-трансформантов. Выявленные различия в таксономической структуре прикорневых комплексов актиномицетов исходного сорта и трансформантов свидетельствуют о том, что вставка в геном томата гетерологичного гена *Fe-SOD1* из *Arabidopsis thaliana*, по-видимому, сопровождалась плейотропными эффектами и повлекла определенные изменения в составе или количестве корневых выделений, что послужило причиной структурных перестроек в составе прикорневой микрофлоры. Однако наиболее существенные отличия от исходного генотипа в численности, разнообразии, родовой и видовой структуре актиномицетного комплекса выявлены в ризосфере линии bn 6, характеризующейся более стабильной экспрессией гетерологичного гена *Fe-SOD 1*, чем другие независимые трансгенные линии томата, полученные на основе исходного сорта Белый налив.

5.2 Численность и структура комплексов актиномицетов в ризосфере ГМ и исходных сортов табака

Сравнительное изучение численности и видовой структуры рода *Streptomyces* в прикорневой почве растений табака проводили с выделением микролокусов 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 Ttrf 13 ($3,7 \times 10^5$ КОЕ/г) в обычных условиях и Ttrf 3 ($5,9 \times 10^5$ КОЕ/г) на кислом фоне с алюминием.

Исходный сорт и трансгенные линии табака различались по видовой представленности стрептомицетов в ризосфере. 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 Ttrf 13, 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 Ttrf 3 (*Cinereus Achromogenes*) и Ttrf 13 (*Cinereus Aureus*) представители различных секций и серий (рис. 18).

Сравнение с исходным сортом ризосферного комплекса актиномицетов другой независимой трансгенной линии Ttrf 2 позволило установить, что по доле представленности актиномицетов в прокариотном комплексе (10,1%) она превосходила ризосферу исходного сорта Самсун (4,8%) более чем в два раза (табл. 14). Актиномицеты на корнях растений трансгенной линии Ttrf 2 характеризовалась достоверно

большим ($H=0,781$), по сравнению с исходным сортом ($H=0,709$), видовым разнообразием, измеренным с помощью индексов Шеннона.

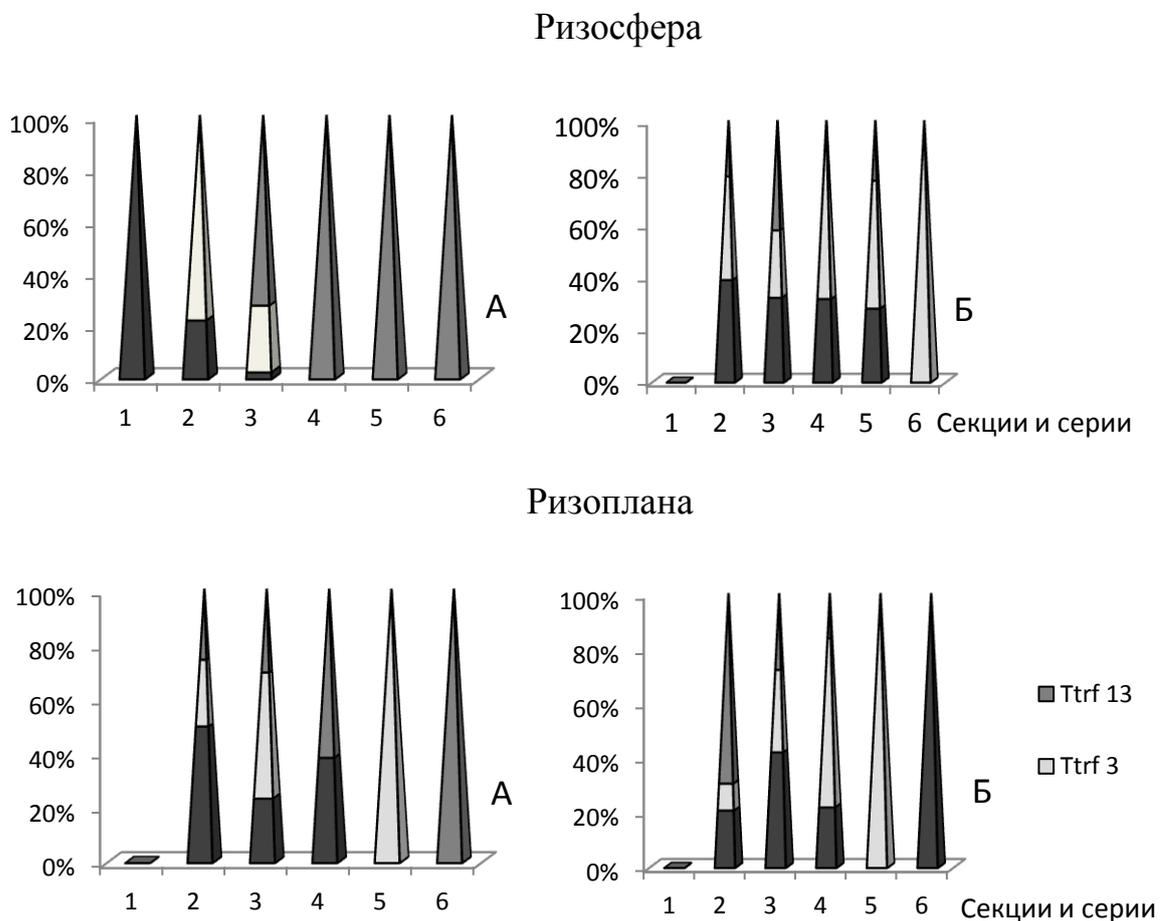


Рисунок 18 – Долевое участие (%) в ризосфере и ризоплане различных генотипов табака на контрольном (А) и провокационном (Б) фоне видов из секций и серий: 1 – *Albus Albus*, 2 – *Cinereus Achromogenes*, 3 – *Cinereus Chromogenes*, 4 – *Cinereus Aureus* 5 – *Cinereus Violaceus*, 6 – *Imperfectus*.

Это согласуется с более высоким (в полтора раза), чем у исходного сорта (10,8%) показателем относительного обилия представителей олигоспоровых видов актиномицетов (15,8%) в ризосферном комплексе.

Если в количественном отношении заселенность стрептомицетами корней исходного сорта Самсун и его трансгенной линии Ttrf 2 различалась

незначительно, то разница в частоте встречаемости (рис. 19) и доле участия в комплексе (рис. 20) стрептомицетов отдельных секций и серий между сравниваемыми генотипами табака была более существенной.

Таблица 14 – Численность и структура комплексов актиномицетов в ризосфере табака

Показатель	Генотип растения	
	Самсун	Ttrf 2
Общая численность прокариот, вырастающих на КГА, тыс, КОЕ/г	394,0	310,0
Доля актиномицетов в прокариотном комплексе, %	4,6	10,1
Количество секций и серий рода <i>Streptomyces</i>	5,0	6,0
Количество родов, выделяемых на среде с пропионатом натрия	5,0	5,0
Индекс Шеннона (H)	0,709	0,781
Относительное обилие в комплексе представителей родов, % :		
<i>Streptomyces</i>	84,7	81,4
<i>Micromonospora</i>	3,8	2,5
олигоспоровые формы	10,8	15,8
<i>Streptosporangium</i>	0,4	0,1
<i>Streptoverticillium</i>	0,3	0,2

Основные различия касались представителей доминантных в ризосфере исходного сорта секций Imperfectus и Helvolo-Flavus, выпавшие из комплекса трансгенной линии Ttrf 2. Вместе с тем, отмеченные в составе ризосферного

комплекса трансформанта виды серии *Albus Albocoloratus* не встречались на корнях исходного сорта.

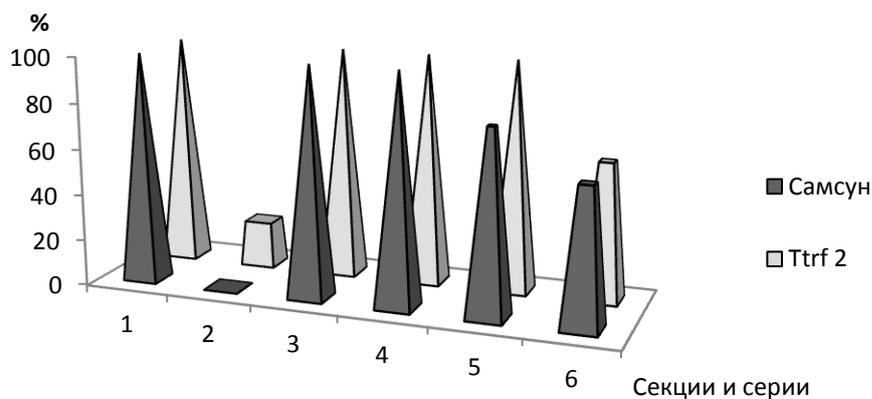


Рисунок 19 – Частота встречаемости в ризосфере различных генотипов табака видов из секций и серий: 1 – *Albus Albus*, 2– *Albus Albocoloratus*, 3 – *Cinereus Achromogenes*, 4 – *Cinereus Chromogenes*, 5 – *Imperfectus*, 6 – *Helvolo-Flavus*.

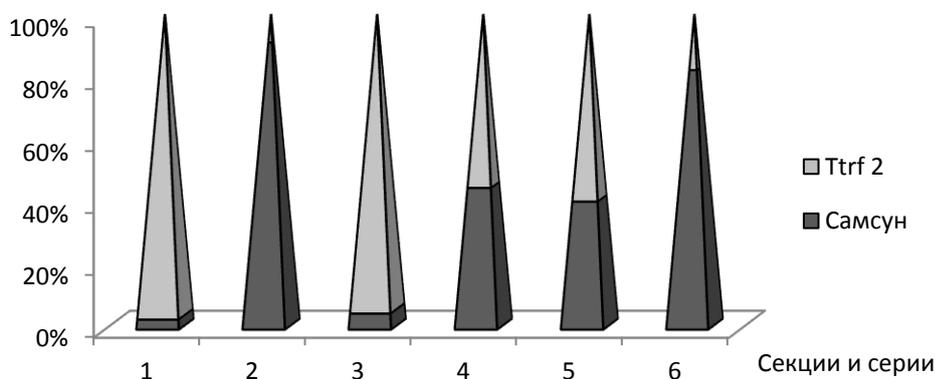


Рисунок 20 – Долевое участие (%) видов из секций и серий: 1 – *Albus Albus*, 2– *Albus Albocoloratus*, 3 – *Cinereus Achromogenes*, 4 – *Cinereus Chromogenes*, 5 – *Imperfectus*, 6 – *Helvolo-Flavus* в ризосферных комплексах табака различных генотипов.

При изучении структуры комплексов актиномицетов в ризосфере табака линии Ttrf 8, также обнаружен ряд отличий от исходного сорта (табл. 15). Так, ризосферный комплекс Ttrf 8 отличался более низкими значениями

абсолютной (158,8 тыс. КОЕ/г) численности микроорганизмов, чем ризосферный комплекс исходной формы (217,3 тыс. КОЕ/г).

Таблица 15 – Численность и структура комплексов актиномицетов в ризосфере табака в зависимости от генотипа растения

Показатель	Генотип растения		
	Самсун	Ttrf 8	
Общая численность прокариот, вырастающих на КГА, тыс, КОЕ/г	217,3	158,8	
Доля актиномицетов в прокариотном комплексе, %	0,3	0,3	
Количество секций и серий рода <i>Streptomyces</i>	6,0	3,0	
Количество родов, выделяемых на среде с пропионатом натрия	4,0	4,0	
Относительное обилие в комплексе представителей родов, % :	<i>Streptomyces</i>	83,3	61,1
	<i>Micromonospora</i>	7,4	14,3
	олигоспоровые формы	8,3	20,5
	<i>Streptosporangium</i>	1,0	4,2

В структуре комплекса актиномицетов трансгенной линии Ttrf 8 произошли существенные изменения, выражаемые в сокращении доли стрептомицетов и в увеличении доли редких родов актиномицетов (табл. 15). Например, по сравнению с исходным сортом Самсун существенно возросла доля представителей рода *Micromonospora* (14%) и олигоспоровых актиномицетов (21%). Подобная перестройка структуры комплекса, вероятно, связана с изменениями в спектре корневых выделений, а именно в

сокращении доли легкогидролизуемых соединений (углеводов, белков). Известно, что микромоноспоры и олигоспоровые актиномицеты доминируют в почве на поздних стадиях сукцессии и способны к разложению трудно гидролизуемых соединений (целлюлозы, фенолов, фульвокислот и т.д.).

Трансгенный сорт характеризуется усиленным ростом корней и, как следствие, накоплением в почве отмерших корневых остатков, которые и являются источником перечисленных выше веществ.

В стрептомицетном комплексе линии Trtf 8 также произошли структурные перестройки, ещё более выраженные, чем в родовой структуре актиномицетов. Произошло существенное снижение видового разнообразия, исчезли представители секций и серий *Cinereus Chromogenes*, *Albus Albocoloratus*, *Imperfectus* и *Roseus*. При посеве на казеин-глицериновый агар появились не отмеченные в ризосфере исходного сорта представители рода *Micromonospora*, составив до 50% от общего количества колоний актиномицетов, вырастающих на этой среде (рис. 21).

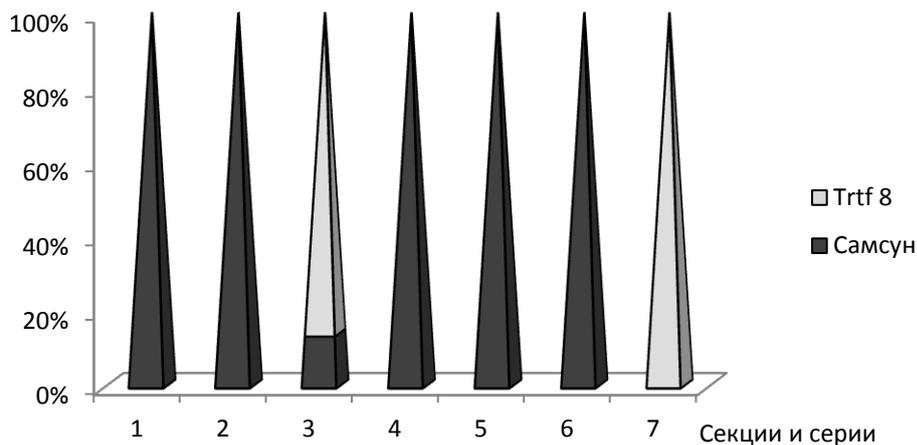


Рисунок 21 — Долевое участие (%) в ризосферных комплексах различных генотипов табака видов из секций и серий: 1 – *Albus Albus*, 2 – *Albus Albocoloratus*, 3 – *Cinereus Violaceus*, 4 – *Cinereus Chromogenes*, 5 – *Imperfectus*, 6 – *Roseus*, 7 – род *Micromonospora*

ГЛАВА 6. СРАВНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСОВ АКТИНОМИЦЕТОВ В РИЗОСФЕРЕ ГМ 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 мицелиальных прокариот. Для этого из ризосферы растений исходных сортов и каждой из полученных на их основе трансгенных линий выделяли в чистую культуру не менее 15 изолятов стрептомицетов. 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. В выборках равного объема определяли долю участия (встречаемость, %) представителей, реализующих целлюлозолитическую, антагонистическую активность, устойчивых к антибиотикам и способных к синтезу ауксинов.

6.1 Целлюлозолитическая активность ризосферных изолятов

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 (КМЦ) в качестве единственного источника углерода (рис. 22).

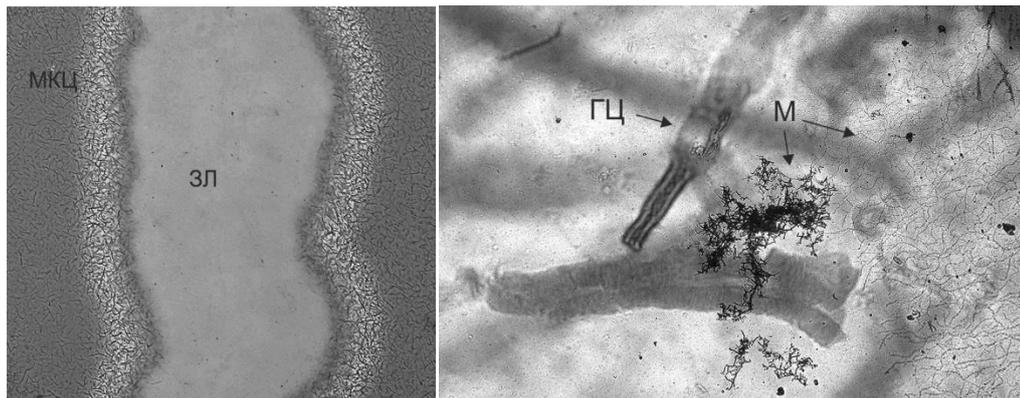


Рисунок 22 – Образование зоны разрушения КМЦ вокруг *Streptomyces* sp., на среде с КМЦ (слева) и микроскопическая картина: рост мицелия *Streptomyces* sp., на КМЦ и ее разрушение (справа). Обозначения: МКЦ – микрокристаллы целлюлозы, ЗЛ – зона разрушения (тест-зона), М – субстратный и воздушный бактериальный мицелий, ГЦ – гидролизованная целлюлоза.

В зависимости от величины зоны разрушения полимера, все ризосферные изоляты стрептомицетов были разделены 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.

В ризосфере томата трансформанты линий bn 6 и bn 4 отличались по долевого участию представителей каждой группы от исходного сорта Белый налив (рис. 23).

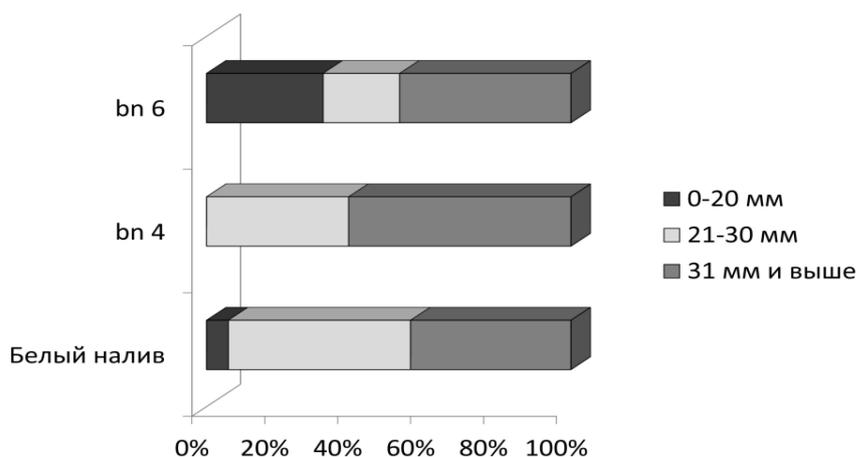


Рисунок 23 – Долевое участие (%) в ризосферных комплексах томата стрептомицетов с различной целлюлозолитической активностью

Если в ризосфере томата Белый налив преобладали стрептомицеты с целлюлозолитической активностью от умеренной (50%) до сильной (44%), то в ризосферном комплексе линии bn 6, наряду с активными целлюлозолитиками (47%), значительную долю составили стрептомицеты со слабой активностью разложения целлюлозы (32%). Ризосферный комплекс линии bn 4 отличался от исходного сорта, напротив, более высокой представленностью стрептомицетов с высокой (61%) целлюлозолитической активностью.

Трансгенная линия bn 34 характеризовалась повышением встречаемости культур стрептомицетов, способных активно разлагать целлюлозу по сравнению с исходным сортом на 40%, но в тоже время с более низким диаметром зоны разложения целлюлозы – до 17 мм, по сравнению с исходным сортом – до 25 мм в диаметре (рис. 24).

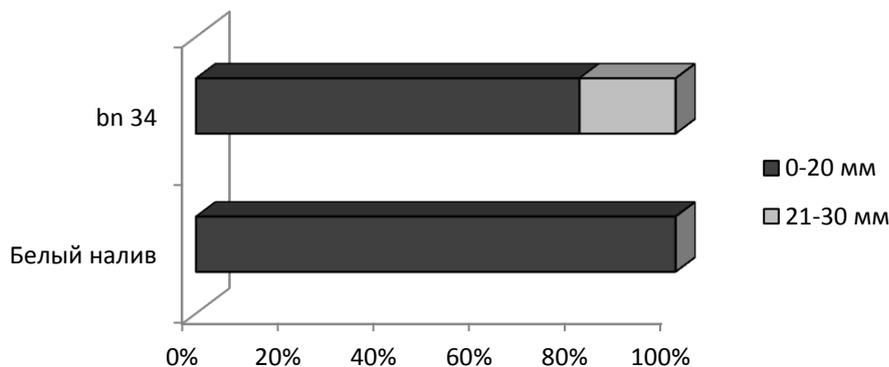


Рисунок 24 – Долевое участие (%) в ризосферных комплексах томата стрептомицетов с разной целлюлозолитической активностью

Так, определение способности изолятов из ризосферы растений томатов T2 линий bn 27 и bn 34 сравниваемых генотипов утилизировать целлюлозу показало, что частота встречаемости активных (зона деструкции КМЦ ≥ 31 мм) целлюлозолитиков на корнях трансгенных линий bn 27 и bn 34 была на 17-25% выше, чем у исходного сорта Белый налив (рис. 25).

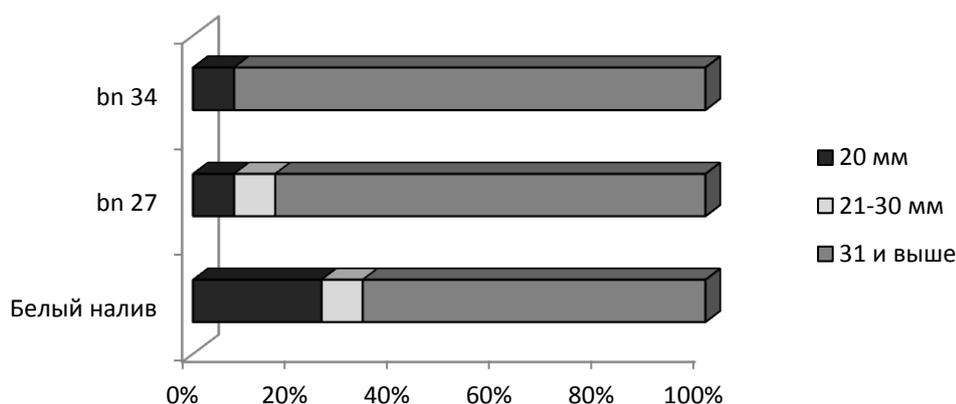


Рисунок 25 – Долевое участие (%) в ризосферных комплексах томата стрептомицетов с разной целлюлозолитической активностью

Тестирование изолятов стрептомицетов из ризосферы табака также выявило изменение частоты встречаемости видов каждой выделенной группы у трансформантов по сравнению с ризосферой исходного сорта Самсун. Линия Ttrf 3 характеризовалась достоверным снижением, а линия Ttrf 13, напротив, – повышением встречаемости культур с сильной целлюлозолитической активностью, в сравнении с исходным сортом (рис. 26).

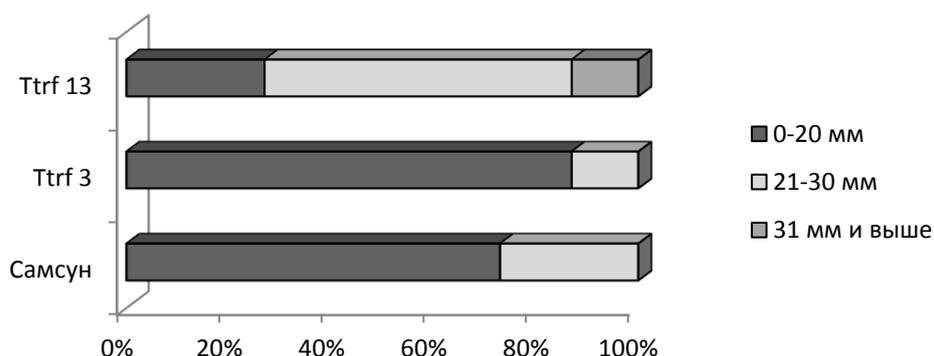


Рисунок 26 – Долевое участие (%) в ризосферных комплексах табака стрептомицетов с разной целлюлозолитической активностью

Среди ризосферных изолятов линии Ttrf 2 частота встречаемости представителей с высокой целлюлозолитической активностью (более 31 мм в реакции с Конго красным на среде с КМЦ) увеличилась с 40% в ризосфере исходного сорта Самсун до 76% в ризосфере трансгенной линии (рис. 27).

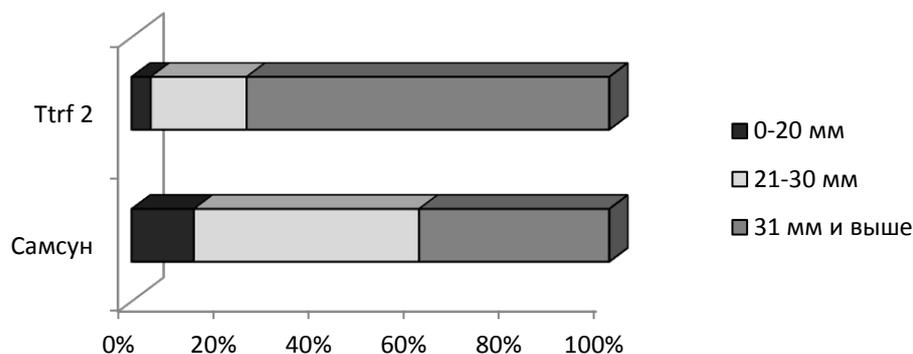


Рисунок 27 – Долевое участие (%) в ризосферных комплексах табака стрептомицетов с разной целлюлозолитической активностью

Таким образом, было установлено, что у растений табака и томата с гетерологичной вставкой *FeSOD1* в ризосфере происходят изменения, по сравнению с растениями исходных сортов, в соотношении стрептомицетов, реализующих слабую, умеренную и сильную целлюлозолитическую активность. Полученные результаты в отношении изменения частоты встречаемости и относительного обилия в ризосферных комплексах представителей с различной целлюлозолитической активностью позволяют говорить о возможных нарушениях в экосистемном цикле углерода, что может оказывать влияние на процессы трансформации в почве растительного опада и требует своей специальной оценки.

6.2 Антагонистическая активность ризосферных изолятов

Особенностью вторичного метаболизма многих видов стрептомицетов является продукция антибиотиков, благодаря чему они могут ограничивать

численность фитопатогенов на корнях растений. Тестирование ризосферных изолятов стрептомицетов 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. 28).

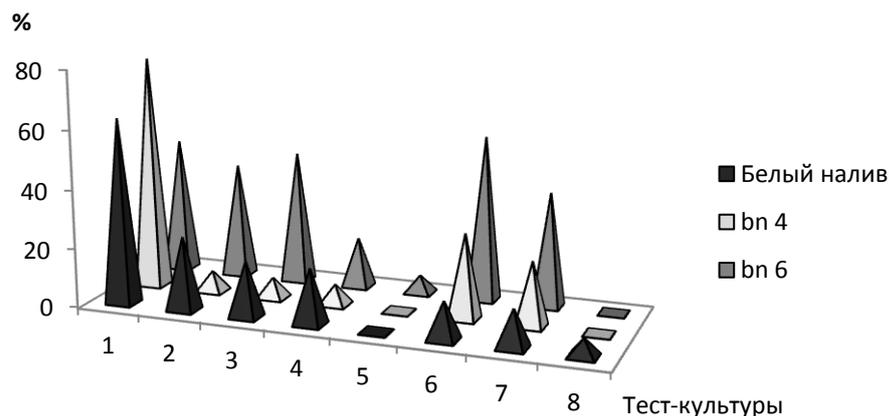


Рисунок 28 – Частота встречаемости (%) в ризосфере различных генотипов томата стрептомицетов, ингибирующих рост тест-культур грибов: 1 – *Trichoderma* sp., 2 – *Fusarium culmorum*, 3 – *F. avenaceum*, 4 – *F. oxysporum*, 5 – *Alternaria* sp. и бактерий: 6 – *Arthrobacter simplex*, 7 – *Erwinia herbicola*, 8 – *E. rhapontici*

В ризосфере линии томата bn 6 спектр антагонистов расширился за счет стрептомицетов, активных против гриба *Alternaria* sp, увеличились также частоты встречаемости антагонистов *Fusarium culmorum* и *F. avenaceum*, *Arthrobacter 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 ризосферном комплексе трансгенной линии томата bn 34 были отмечены изменения антагонистической активности, которые выразились возрастанием частоты встречаемости культур, антагонистически активных в

отношении бактерий *Arthrobacter simplex* на 60% и *E. herbicola* на 30% (рис. 29), по сравнению с исходным сортом. Представители трансформантной линии bn 34 проявили себя возрастанием частоты встречаемости культур, как антагонистически активных в отношении грибов рода *F. oxysporum* и *Bipolaris sorokiniana*, так и отсутствием антагонистически активных штаммов к *F. culmorum*.

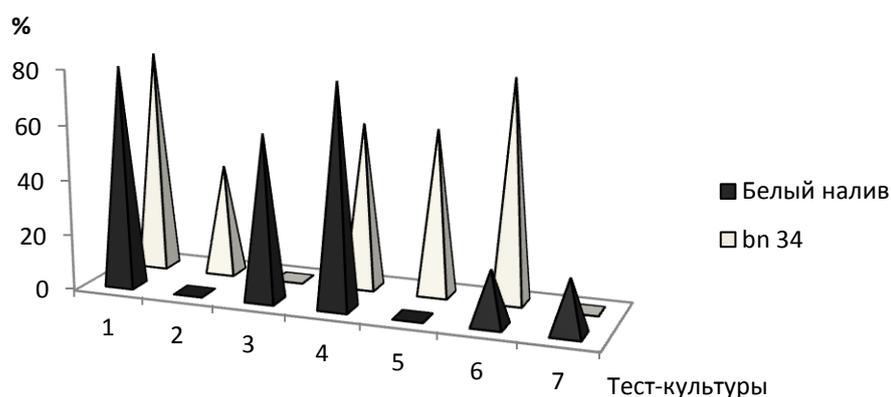


Рисунок 29 – Частота встречаемости (%) в ризосфере различных генотипов томата стрептомицетов, ингибирующих рост тест-культур грибов: 1 – *F. avenaceum*, 2 – *F. oxysporum*, 3 – *F. culmorum*, 4 – *Bipolaris sorokiniana*, и бактерий: 5 – *Arthrobacter simplex*, 6 – *Erwinia herbicola*, 7 – *Pseudomonas putida*

Частота встречаемости изолированных с корней трансгенных томатов T2 линий bn 27 и bn 34 стрептомицетов-антагонистов в отношении бактерий *Erwinia herbicola*, *E. rhapontici*, *Arthrobacter simplex*, *Pseudomonas putida* оказалась почти вдвое ниже (17%), чем в комплексе растений исходного сорта (33%) (рис. 30).

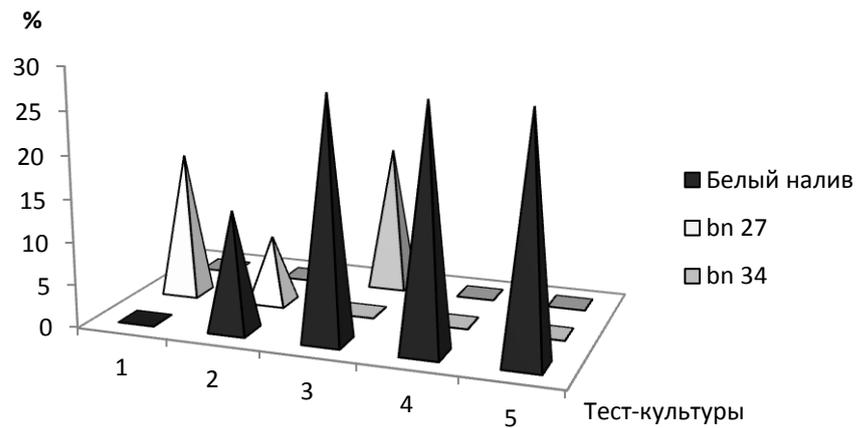


Рисунок 30 – Частота встречаемости (%) в ризосфере различных генотипов томата стрептомицетов, ингибирующих рост тест-культур грибов: 1 – *F. avenaceum*, 2 – *F. oxysporum*, и бактерий: 3 – *Erwinia herbicola*, 4 – *Arthrobacter simplex*, 5 – *E. rhapontici*

В комплексе стрептомицетов, ассоциированных с корнями табака Самсун, присутствовали виды - антагонисты фитопатогенных грибов рода *Fusarium* и антагонисты грамположительной и грамотрицательной тест-бактерий (рис. 31). В тех же условиях ризосферный комплекс трансгенной линии Ttrf 3 отличался от исходного сорта более низкой частотой встречаемости на корнях антагонистов грамположительной бактерии *Arthrobacter simplex* и отсутствием в комплексе антагонистов гриба *F. avenaceum*. Среди стрептомицетов, ассоциированных с корнями другой трансгенной линии Ttrf 13, также отмечены изменения антагонистической активности, которые выразились, с одной стороны, возрастанием частоты встречаемости видов, антагонистически активных в отношении бактерий, а с другой – снижением встречаемости в комплексе представителей с антифунгальной активностью.

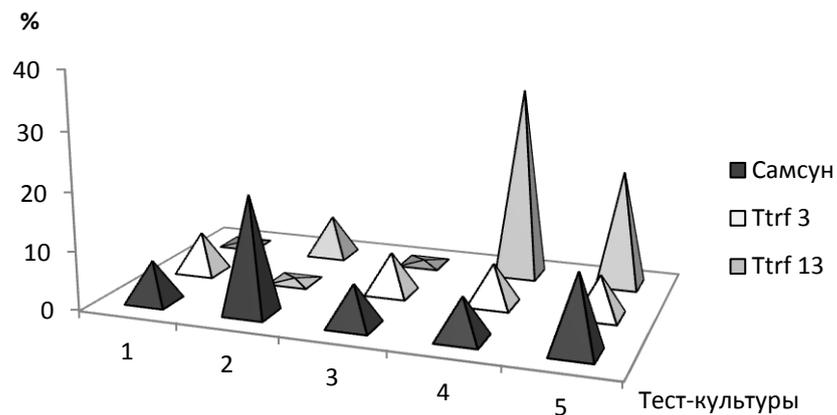


Рисунок 31 – Частота встречаемости (%) в ризосфере различных генотипов табака стрептомицетов, ингибирующих рост тест-культур грибов: 1 – *Fusarium culmorum*, 2 – *F. avenaceum*, 3 – *F. oxysporum* и бактерий: 4 – *Erwinia herbicola*, 5 – *Arthrobacter simplex*

На корнях трансгенной линии Ttrf 2, частота встречаемости стрептомицетов-антагонистов с широким спектром действия (активных в отношении трех и более тест-культур) на корнях трансгенной линии Ttrf 2 снизилась по сравнению с исходным сортом Самсун в полтора раза (рис. 32).

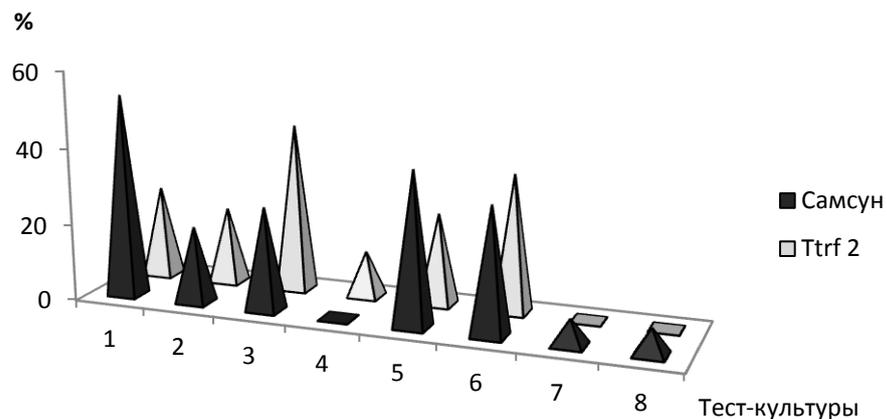


Рисунок 32 – Частота встречаемости (%) в ризосфере различных генотипов табака стрептомицетов, ингибирующих рост тест-культур грибов: 1 – *Fusarium culmorum*, 2 – *F. avenaceum*, 3 – *F. oxysporum* и бактерий: 4 – *Erwinia herbicola*, 5 – *Arthrobacter simplex*

На корнях линии табака Ttrf 8, которую выращивали в обычных условиях (контроль) и на фоне эдафического стресса, обусловленного токсичностью алюминия в кислой почве (провокационный фон), отличия в антагонистической активности были несущественными на контрольном фоне, тогда как на провокационном фоне встречаемость антагонистов фитопатогенных тест-культур существенно изменялась по сравнению с исходным сортом (рис. 33).

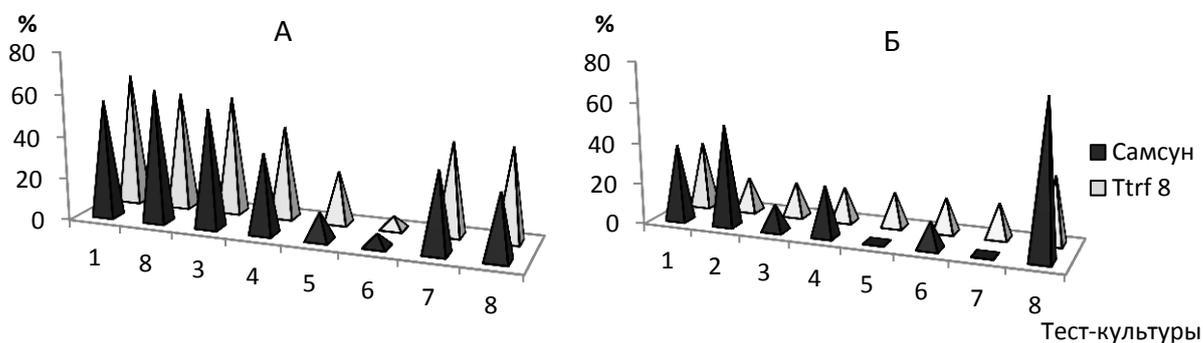


Рисунок 33 – Частота встречаемости (%) в ризосфере различных генотипов табака стрептомицетов на контрольном (А) и провокационном (Б) фоне, ингибирующих рост тест-культур грибов: 1 – *Fusarium avenaceum*, 2 – *F. culmorum*, 3 – *F. oxysporum*, 4 – *Bipolaris sorokiniana* и бактерий: 5 – *Erwinia rhapontici*, 6 – *Pseudomonas putida*, 7 – *Arthrobacter simplex*, 8 – *E. Herbicola*

В результате изучения антагонистической активности актиномицетов, было показано, что штаммы, выделенные с корней исходных сортов, как томата, так и табака, обладали антагонистической активностью в отношении большего количества тест-культур, чем штаммы, выделенные с корней трансгенных растений. Достаточно высокое сходство в проявлении антагонистического потенциала ризосферных актиномицетов с исходным сортом Самсун было обнаружено только у линии табака Ttrf 8. Снижение антагонистического потенциала актиномицетов на корнях генетически модифицированных растений чревато повышением заболеваемости

сельскохозяйственных культур корневыми инфекциями, а также может способствовать накоплению в почве значительного инфекционного пула.

6.3 Чувствительность к антибиотикам ризосферных изолятов

В связи с использованием в технологиях получения трансформантов различных антибиотиков представляло интерес выяснить, меняется ли у растений-трансформантов спектр резистентности к антибиотикам колонизирующих ризосферу микроорганизмов по сравнению с ризосферными микроорганизмами исходного сорта. При трансформации растений табака и томата, наряду с целевым геном *Fe-SOD1*, в растительный геном был встроен маркерный ген неомицин фосфотрансферазы (*npt II*), детерминирующий устойчивость к канамицину, и позволяющий впоследствии проводить отбор успешно трансформированных линий на селективной среде с добавлением этого антибиотика.

Проверка чувствительности ризосферных изолятов стрептомицетов линий томата bn 4, bn 6 и bn 34 к антибиотикам канамицин, гентамицин, азтреонам и амикацин не выявила существенных изменений комплексов трансгенных линий по сравнению с комплексом исходного сорта Белый налив (рис. 34). Практически все изоляты томата линий bn 27 и bn 34 (T2) проявили устойчивость к азтреонаму и были в той или иной степени чувствительны к канамицину гентамицину и амикацину. Различия между изолятами с корней трансгенных и исходных растений обнаружены только в отношении антибиотика оксациллин (рис. 35). Частота встречаемости чувствительных к оксациллину штаммов на корнях сорта Белый налив составила 17%, тогда как на корнях трансгенных линий они не отмечены.

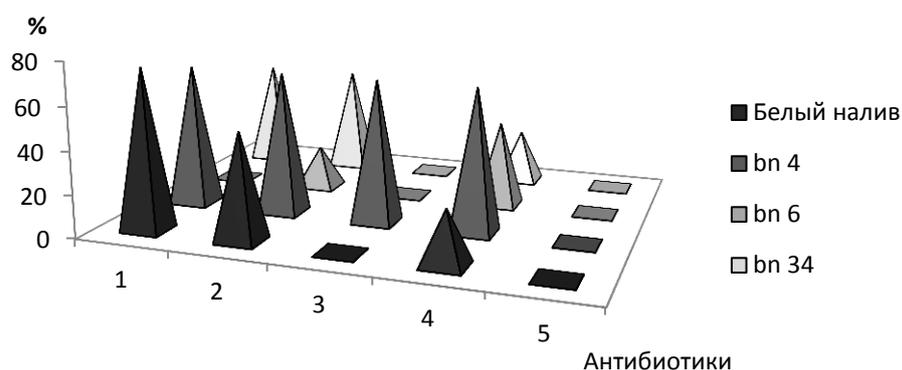


Рисунок 34 – Устойчивость к антибиотикам 1 – цефотоксим (30 мкг), 2 – цефтриаксон (30 мкг), 3 – гентамицин (120 мкг), 4 – триметоприн сульфат (30 мкг), 5 – канамицин (30 мкг), штаммов *Streptomyces* sp, изолированных с корней томата различных генотипов.

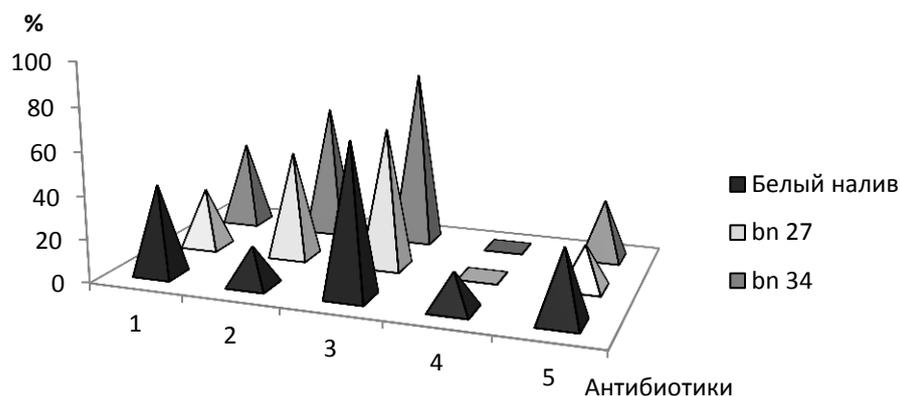


Рисунок 35 – Устойчивость к антибиотикам 1 – гентамицин (120 мкг), 2 – канамицин (30 мкг), 3 – азтреонам (30 мкг), 4 – оксацилин (120 мкг), 5 – амикацин (30 мкг), штаммов *Streptomyces* sp, изолированных с корней томата различных генотипов.

Проверка методом бумажных дисков чувствительности изолятов к антибиотикам у стрептомицетных изолятов из ризосферы табака линий Ttrf 2, Ttrf 2 и Ttrf 13 также не выявила существенных изменений в изменении чувствительности стрептомицетов по сравнению с изолятами с корней исходного сорта Самсун (рис. 36).

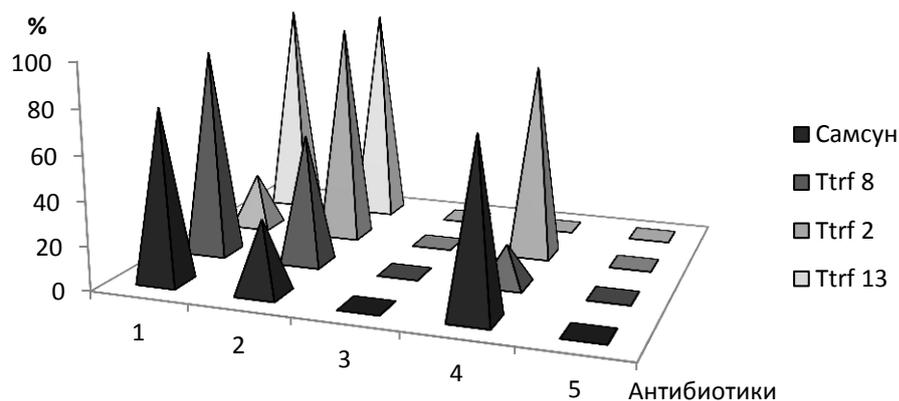


Рисунок 36 – Устойчивость к антибиотикам 1 – цефотоксим (30 мкг), 2 – цефтриаксон (30 мкг), 3 – гентамицин (120 мкг), 4 – триметоприн сульфат (30 мкг), 5 – канамицин (30 мкг), штаммов *Streptomyces* sp, изолированных с корней табака различных генотипов.

Полученные результаты указывают на то, что гетерологичный маркерный ген неомицин фосфотрансферазы (*npt II*), придающий трансформантам табака и томата устойчивость к канамицину, не оказал значимого влияния на резистентность к этому антибиотику в популяциях ризосферных микроорганизмов, равно, как и к другим, взятым в исследование, тест-антибиотикам.

6.4 Синтез ауксинов ризосферными изолятами

Важным условием ассоциативного взаимодействия стрептомицетов с растениями является синтез соединений с фиторегуляторной активностью, в частности ауксинов, которые влияют на фотосинтез, образование пигментов, биосинтез различных метаболитов и устойчивость растений к стрессовым факторам среды. Определение способности изолятов из ризосферы томата и табака различных генотипов продуцировать ауксины показало, что продукция ИУК на среде с 200 мкг/мл триптофана за 72 часа роста

стрептомицетов варьирует от 9,0 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 bn 6 и bn 27 (T2), чем из ризосферы исходного сорта и линий bn 4, bn 34 и bn 34 (T2) (табл. 16).

Таблица 16 – Образование ауксинов культурами стрептомицетов из ризосферы томата различных генотипов

Показатель	Генотип растений томата					
	Белый налив	bn-4	bn-6	bn-34	bn-27 (T2)	bn-34 (T2)
Средняя продукция ИУК, мкг/мл	13,7±1,3	14,5±1,3	18,9±2,0	6,8±2,9	13,1±2,6	13,9±1,7
Пределы колебаний (мин,-макс, ИУК), мкг/мл	11,7-15,9	13,4-18,1	16,6-22,5	4,5-14,0	11,4-21,1	12,2-18,4
Доля активных продуцентов ИУК (≥ 20 мкг/мл· 72 час), %	нет	нет	38	нет	8	нет

Для изолятов из ризосферы табака наибольшая средняя продуктивность ИУК была у штаммов из ризосферы линии Ttrf 3 (табл. 17).

Таблица 17 – Образование ауксинов культурами стрептомицетов из ризосферы табака различных генотипов

Показатель	Генотип растений табака				
	Самсун	Ttrf 3	Ttrf 13	Ttrf 2	Ttrf 8
Средняя продукция ИУК, мкг/мл	10,9±1,2	14,1±3,9	10,6±1,5	9,9±0,8	11,7±0,8
Пределы колебаний (мин,-макс, ИУК), мкг/мл	9,5-12,2	9,8-21,4	9,0-13,2	9,1-11,3	9,0-19,4
Доля активных продуцентов ИУК (≥ 20 мкг/мл· 72 час), %	нет	14	нет	нет	нет

Для изолятов из ризосферы табака наибольшая средняя продуктивность ИУК была у штаммов из ризосферы линии Ttrf 3.

Штаммы, способные продуцировать ИУК в концентрации 20 мкг/мл и выше встречались только среди стрептомицетов, ассоциированных с корнями табака линии Ttrf 3 томата линий bn 6, bn 27 (T2).

В большем количестве продуцировали ИУК штаммы актиномицетов из ризосферы томата, чем из ризосферы табака. Однако, если отдельные линии табака достоверно не различались по продукции ауксинов, то у томата линия bn 6 достоверно (в 1,3 раза) превосходила линию bn 4 по средней величине накопления ИУК в культуральной жидкости. Это свидетельствует о генотипической специфичности ризосферных комплексов актиномицетов, селективируемых на своих корнях растениями отдельных генотипов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С момента создания первых коммерческих линий генетически модифицированных растений (ГМР) возник вопрос об их экологической безопасности. Сегодня ситуация обострена в связи с тем, что площади занятые под ГМ культурами в мире неуклонно растут, увеличиваясь примерно на 10% ежегодно (Clive, 2018), а дискуссия по экологической безопасности использования ГМР до сих пор не привела к однозначному ответу.

Встраивание в геном организма-хозяина новых конструкций преследует цель получения нового признака, недостижимого для данного организма естественным путем или требующим длительных усилий селекционеров. Однако генно-инженерное вмешательство, наряду с совершенствованием растений, может привести к нежелательным экологическим последствиям. Вместе с новым хозяйственно ценным признаком организм может приобретать также новые качества, опосредованные как нестабильностью новой конструкции, так и ее регуляторным действием на соседние гены (плейотропное действие гетерологичного гена) (Turtini et al., 2015).

Для исключения возможности причинения почве экологического ущерба необходима оценка экологических рисков возможного влияния ГМР на почвенную микробную систему, поскольку микроорганизмы составляют более 80% от общей почвенной биомассы, во многом определяют функции экосистемы, например круговорот отдельных элементов питания и разложение растительных остатков. Прямые и опосредованные ассоциации микроорганизмов с растениями создают сильные механизмы обратной связи, тем самым оказывая влияние на продуктивность растений. Именно микроорганизмы являются чувкими биоиндикаторами, резко реагирующими

на изменения в среде. Особый интерес представляют исследования, направленные на выявление структурных перестроек микробных комплексов в ризосфере трансгенных растений.

Неотъемлемым компонентом почвенных и ризосферных микробных комплексов являются мицелиальные прокариоты – актиномицеты. Благодаря своей уникальной биосинтетической активности, актиномицеты выдвинуты сегодня на роль ключевого звена в поддержании гомеостаза почвенной микробной системы (Назарова, Широких, 2017).

В наших экспериментах по колонизации ризосферными штаммами стрептомицетов картофеля, как представителя семейства Solonacea, плотность заселения отдельных тканей и органов меристемных растений варьировала в пределах двух порядков (от 10^7 до 10^9 КОЕ/г) и зависела от способности штамма продуцировать лектины – гликопротеины, способные обратимо и избирательно связывать углеводы и углеводные детерминанты биополимеров без изменения их структуры.

Растения, подвергнутые инокуляции, по морфометрическим показателям *in vitro* и продуктивности *in vivo*, не имели существенных отклонений от контроля, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния актиномицетов на растения при ассоциативном взаимодействии. На этом основании актиномицеты далее использовали как модельную группу микроорганизмов для сравнительной оценки структуры ризосферных комплексов трансформантных линий и растений исходного генотипа при выращивании в одних и тех же условиях.

Для подтверждения функциональной активности встроенного в геном растений из семейства Solonacea – томата и табака – гена *Fe-SOD1* из *Arabidopsis thaliana* (L.) была определена суммарная активность супероксиддисмутазы (SOD) - одного из ключевых ферментов

антиоксидантной защиты клеток и тканей. В листьях трансформантов томата суммарная активность SOD достоверно превышала аналогичный показатель у растений исходного генотипа Белый налив лишь для отдельных независимых трансгенных линий и в отдельные межфазные периоды. У трансформантов табака суммарная активность SOD в обычных условиях была достоверно выше, чем в листьях исходного сорта Самсун, а на фоне стресса, обусловленного токсичностью алюминия в кислой почве преимущество перед исходным сортом проявила только одна из исследованных линий - Ttrf 13. Ранее было показано, что сверхэкспрессия гена *Fe-SOD1* вызывает повышение устойчивости растений к УФ-облучению и солевому стрессу (Баранова, Гулевич, 2006).

В результате генно-инженерного вмешательства накопление МДА – продукта перекисного окисления липидов в листьях линий трансформантов было ниже по сравнению с исходными сортами в 2,1-2,5 раза в зависимости от генотипа и фазы развития растений, что говорит о большей сбалансированности окислительно-восстановительных процессов у растений, несущих гетерологичную вставку *Fe-SOD1*. В то же время, часто наблюдаемое отсутствие достоверных различий линий трансформантов с исходными сортами по накоплению МДА и суммарной активности СОД может говорить об отсутствии в листьях трансформантов отдельных линий стабильной экспрессии и функциональной активности встроенного гена *Fe-SOD1*.

С использованием селективных приемов из ризосферы исходных сортов и трансформантных линий томата и табака выделено в чистую культуру, в общей сложности, 266 представителей мицелиальных прокариот. Микроскопия изолятов выявила типичные для рода *Streptomyces* морфологические признаки, а выборочный анализ фрагментов генов 16S рРНК, показал, что полученные изоляты являются представителями рода

Streptomyces, семейства *Streptomycetaceae*, порядка *Actinomycetales*, класса *Actinobacteria*.

Сравнительное изучение структуры комплексов актиномицетов в ризосфере томата и табака выявило у растений с генно-инженерным усилением антиоксидантной защиты ряд отличий от исходных сортов Белый налив и Самсун соответственно. В качестве общей тенденции можно отметить более низкую заселенность ризосферы трансформантных линий актиномицетами при увеличении их родового и видового разнообразия. Наиболее значительные перестройки структуры комплексов актиномицетов в ризосфере трансформантов томата и табака реализуются через изменение показателей индексов разнообразия, частоты встречаемости и долевого участия представителей отдельных секций и серий. На корнях трансформантов расширился видовой спектр стрептомицетов за счет представителей пигментированных секций и серии *Cinereus Aureus*, *Cinereus Violaceus*, *Cinereus Chromogenes* и *Helvolus*, при сокращении почти вдвое долевого участия в комплексе видов серии *Cinereus Achromogenes*, наиболее характерных для дерново-подзолистых почв.

Несмотря на выявленные в нашей работе различия в численности и таксономической структуре комплексов мицелиальных прокариот, изменчивость, связанная с ростом и развитием растений, оказалась более значимой по сравнению с изменчивостью, обусловленной генетической модификацией растений. Эти результаты совпадают с данными других исследований, выполненных, преимущественно, с использованием генно-молекулярных методов (Glandorf et al., 2001), и которые свидетельствуют, что диапазон выявленных различий, как правило, не превосходит тот диапазон, который имеется между сортами, созданными обычными методами селекции. Чаще всего работы по изучению ризосферной микрофлоры ГМР проводятся с использованием метагеномного

секвенирования, которое позволяет оценить генетическое разнообразие микроорганизмов, но не дает представления об их функциональной активности.

В своей работе, для достижения лучшего понимания реального воздействия растений трансформантов с усиленной антиоксидантной защитой на почвенные микроорганизмы, как обязательного компонента оценки экологического риска, наряду с таксономической структурой ризосферных комплексов определяли физиологическую активность культур стрептомицетов, выделенных с корней сравниваемых растений. Изоляты сформированной рабочей коллекции (в общей сложности 266 штаммов) были протестированы на наличие фитостимулирующих и антагонистических свойств, способность продуцировать целлюлазы и ауксины. Поскольку при выделении культур фиксировали принадлежность каждого штамма к определенному генотипу растения, это позволило охарактеризовать в синэкологических показателях функциональную структуру ризосферных комплексов актиномицетов, ассоциированных с корнями исходных сортов и полученных на их основе трансгенных линий, в одних и тех же условиях выращивания.

Анализ полученных данных показал значимое влияние встройки в геном табака гетерологичной последовательности не только на численность и видовую представленность мицелиальных прокариот в ризосфере растений трансформантов, но и продемонстрировал изменения в функциональной структуре комплексов ассоциированных с корнями почвенных микроорганизмов. Эти изменения касаются частоты встречаемости и долевого участия в комплексах актиномицетов, участвующих в процессах регуляции роста и защиты растений от фитопатогенов и в процессах биодеструкции в почве целлюлозы. В отношении чувствительности почвенных микроорганизмов к антибиотикам существенных различий между

ризосферой исходных сортов и трансформантных линий не выявлено. Это находится в противоречии с представлениями некоторых авторов о том, что ризосфера ГМР может изменяться, благодаря дрейфу генов от ГМР к аборигенным почвенным микроорганизмам (Созинов, 2011). Если передача генов от бактерий растениям хорошо известна и используется на практике в процессах агробактериальной трансформации растений, то возможность обратного направленного процесса – от растений к бактериям, пока экспериментально не доказана (Miller, Levy, 1989).

Таким образом, результаты сравнительной оценки комплексов актиномицетов из ризосферы растений семейства Solonasea – томата Белый налив, табака Самсун и полученных агробактериальной трансформацией на их основе трансгенных линий с усиленной защитой к окислительному стрессу свидетельствуют о том, что измененные путем генной инженерии растения могут приводить к изменениям в окружающей среде. Эти изменения касаются количественного и качественного состава почвенных микроорганизмов, участвующих в процессах регуляции роста и защиты растений от фитопатогенов, а также в процессах биодеструкции растительных полимеров, в частности, целлюлозы, что может вести к нарушениям в экосистемном цикле углерода и оказывать влияние на процессы трансформации в почве растительного опада, в связи с чем требует своей специальной оценки для прогнозирования и минимизации потенциальных рисков для экологии почвы.

Даже фрагментарная оценка функциональных проявлений микрофлоры, заселяющей прикорневое пространство ГМР, дает нам основание для озабоченности экологическими последствиями вмешательства человека в структуру растительного генома. Следует сосредоточить большее внимание именно на функциональных проявлениях микроорганизмов, что позволит более аргументировано делать прогнозные оценки безопасного

состояния агроценозов, потому как простая инвентаризация микробного разнообразия и даже констатация наличия или выпадения тех или иных видов, не дает нам такой возможности.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Изучение колонизации меристемных растений картофеля 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 Белый налив и табака. 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 несущественно.

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 рРНК, подтвердила,

что изоляты с данным морфотипом являются представителями рода *Streptomyces*, семейства *Streptomycetaceae*, порядка *Streptomycetales*, класса *Actinobacteria*. Сформирована рабочая коллекция стрептомицетов с фитостимулирующими и антагонистическими свойствами, продуцентов целлюлаз и фитогормонов.

б. 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВНИИСБ – Всероссийский институт сельскохозяйственной биотехнологии;

ГИ – генная инженерия;

ГМ – генетически модифицированный;

ГПТ – горизонтальный перенос генов.;

ДГГЭ – денатурирующий градиентный гель электрофореза;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ИУК – индолилуксусная кислота;

КГА – казеин – глицериновый агар;

КМЦ – карбоксиметилцеллюлаза;

КОЕ – колониеобразующая единица;

МДА – малоновый диальдегид;

МС – питательная среда Мурасиге-Скуга;

об./мин – оборотов в минуту;

ПОЛ – перекисное окисление липидов;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

СКЖ – супернатант культуральной жидкости;

СОД (SOD) – супероксиддисмутаза;

ТБК – тиобарбитуровая кислота;

bar – ген резистентности к фосфинотрицину из *Streptomyces hygroscopicus*

Vt-токсин – дельта токсин *Bacillus thuringiensis*;

cry1Ab – ген дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis*;

cry1Ac – ген дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis*;

cry3a – ген дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis*;

EPSPS – ген 5-енолпирувил-шикимат-3-фосфат-синтазы F- критерий Фишера;

Fe-SOD1 – ген Fe-супероксиддисмутазы 1;

ISAAA – Международная служба по мониторингу за применением агробιοтехнологии;

NBT – n-нитротетразолиевого синего;

NCBI – национальный центр биотехнологической информации;

NPTII – ген устойчивости к канамицину;

NRPS – нерибосомальная пептид-синтетаза;

pH – концентрация ионов водорода;

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешков, А.В. Real Time ПЦР — перспективный метод контроля генетически модифицированных объектов / А.В. Алешков, А.И. Окара // Методы оценки соответствия. – 2007. – № 6. – С. 24-28.
2. Алешков, А.В. Генетически модифицированные пищевые продукты: опыт России / А.В. Алешков // Актуальные вопросы технических наук: теоретический и практический аспекты: коллективная монография. – Уфа: АЭТЕРНА. – 2017. – С. 4-16.
3. Алешков, А.В. Генетически модифицированные продукты в России и КНР: статус и тренды нормирования / А.В. Алешков, Т.К. Каленик // Baikal Research Journal. – 2015. – Т.6. No 5. – 18 с.
4. Баранов, А.С. Использование генетически модифицированных организмов и вопросы экологической безопасности // 2-й Всероссийский симпозиум «Физиология трансгенного растения и проблемы биобезопасности». – 2007. – С. 19.
5. Баранова, Е.Н. Проблемы и перспективы генно-инженерного подхода в решении вопросов устойчивости растений к засолению / Е.Н. Баранова, А.А. Гулевич // Сельскохозяйственная биология. – 2006. – №1. – С. 39-53.
6. Белявская, Л.А. Лектины почвенных стрептомицетов – антагонистов фитопатогенов / Л.А. Белявская, Э.А. Коваленко, В.Е. Козырицкая, Г.А. Иутинская // Фундаментальная гликобиология: Материалы II Всероссийской конференции. – Саратов: ООО «Ракурс», 2014. – С. 102.
7. Вельков, В.В. Проблемы государственного регулирования производства трансгенных растений / В.В. Вельков, М.С. Соколов, А.Б. Медвинский // Вестник защиты растений. – 2003. – № 3. – С. 3–16.

8. Викторов, А.Г. Тенденции развития глобального рынка трансгенных растений и проблемы экологической безопасности / А.Г. Викторов // Физиология растений. – 2016. – Т. 63. – С. 44-51.
9. Гаузе, Г.Ф. Определитель актиномицетов. Роды *Sreptomycetes*, *Streptoverticillium*, *Chainia* / Г.Ф. Гаузе, Т.П. Преображенская, М.А. Свешникова, Л.П. Терехова, Т.С. Максимова. М.: Наука, 1983. – 248 с.
10. Гизбуллин Н.Г. Использование генно-модифицированных растений: за и против / Н.Г. Гизбуллин // Сахарная свекла. – 2014. – №. 7. – С. 11-13.
11. Гузырь, В.В., Горюнова Н.Н. Генетическая модификация организмов и продовольственная безопасность в современном мире / В.В. Гузырь, Н.Н. Горюнова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 6-1. – С. 99-102.
12. Дмитриев, Е.А. Математическая статистика в почвоведении: учебник / Е. А. Дмитриев. – М.: МГУ, 1972. – 292 с.
13. Добровольский, Г.В. Роль почвы в формировании и сохранении биологического разнообразия / под ред. Г.В. Добровольского, И.Ю. Чернова. М.: Товарищество научных исследований КМК, 2011. – 275 с.
14. Доклад Конференции Организации Объединенных Наций по окружающей среде и развитию Рио-де Жанейро, 3–14 июня 1992 года. Т. 1. Резолюции, принятые на Конференции. Нью-Йорк. – 1993. – 528 с.
15. Егоров, Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Высшая школа, 1979. – 485 с.
16. Ермишин, А.П. Генетически модифицированные организмы и биобезопасность / А.П. Ермишин – Litres, 2013. – 171 с.
17. Жученко, А.А. Генетические ресурсы и генетическая модификация растений как факторы изменений среды обитания человека / А.А. Жученко, Ю.В.Чесноков // Биосфера. – 2012. – Т. 4. – №. 2.

18. Звягинцев, Д.Г. Биология почв: учебник / Д.Г. Звягинцев, И.П. Бабьева, Г.М. Зенова. – 3-е изд., испр. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 2005. – 445 с.
19. Звягинцев, Д.Г. Экология актиномицетов / Д.Г. Звягинцев, Г.М. Зенова. – ГЕОС, 2001. – 256 с.
20. Зенова, Г.М. Методы определения структуры комплексов актиномицетов и грибов / Г.М. Зенова, А. В. Кураков. – М.: МГУ, 1988. – 54 с.
21. Зенова, Г.М. Разнообразие актиномицетов в наземных экосистемах / Г.М. Зенова, Д.Г. Звягинцев – МГУ, 2002. – 132 с.
22. Калакуцкий, Л.В. Актиномицеты и высшие растения / Л.В. Калакуцкий, Л.С. Шарая // Успехи микробиологии. М.: Наука, 1990. – №. 2. – С. 26-65.
23. Картахенский Протокол по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии (Монреаль, 29.12.2000)
24. Кащьяп В. Пестициды и трансгенные растения как международная агроэкологическая проблема // М.: Изд-во РУДН. – 1998. – С. 167.
25. Коттер, Д. Горизонтальный перенос генов от трансгенных растений к почвенным бактериям: редкое событие? / Д. Коттер // Аграрная Россия. – 2005. – №. 1. – С. 28-44.
26. Кузнецов, В.В. Генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры и полученные из них продукты: пищевые, экологические и агротехнические риски / В.В. Кузнецов, А.М. Куликов, В.Д. Цыдендамбаев / Известия аграрной науки. – 2010. – Т. 8. – №. 3. – С. 10-30.
27. Лакин Г. Ф. Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд., перераб. и доп // М.: Высш. шк. – 1990. – С. 352.
28. Лукаткин, А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. – 208 с.

29. Мардахаева, Б.А. Генно-модифицированные продукты-смерть или жизнь? / Б.А. Мардахаева // ББК 65.26 Н 72. – 2016. – С. 67.
30. Мерзаева, О.В. Колонизация актиномицетами различных родов прикорневой зоны растений / О.В. Мерзаева, И.Г. Широких // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – №. 2. – С. 271-276.
31. Мерзаева, О.В. Образование ауксинов эндофитными актинобактериями озимой ржи / О.В. Мерзаева, И.Г. Широких // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46. – №. 1. – С. 51-57.
32. Мирошниченко, Д. Н. Анализ вертикального переноса генов от трансгенных к нетрансгенным растениям пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / Д.Н.Мирошниченко, М.В.Филиппов, С.В. Долгов // Сельскохозяйственная биология. – 2012. – №. 3. – С. 37-46.
33. Михайлова, Е.В. Экологические аспекты переопыления трансгенных растений с увеличенными размерами органов и их нетрансгенных родственников на примере табака / Е.В. Михайлова, Б.Р. Кулуев // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2013. – Т. 15. – №. 3-4. – С. 1382-1386.
34. Мукашева, М.Х. Разнообразие микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности / М.Х. Мукашева, Т.Д. Шигаева // ДГП НИИ «Проблем биологии и биотехнологии» РГП «КазНУ имени Аль-Фараби» – 2015 – С.14-16.
35. Мэггаран, Э. Экологическое разнообразие и его измерение / Э. Мэггаран. – М.: Мир, 1992. – 173 с.
36. 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: Материалы XIII Всероссийской

научно-практической конференции с международным участием. Кн. 1. Киров: Изд-во ООО «Веси». – 2015 . – С. 287-289.

37. Назарова, Я.И. Оценка экологической безопасности трансгенных растений / Я.И. Назарова, И.Г. Широких //Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем. – 2017. – С. 67-71.

38. Новикова, И.И. Биологическое разнообразие микроорганизмов – основа для создания новых полифункциональных биопрепаратов для фитосанитарной оптимизации агроэкосистем / И.И. Новикова // Вестник защиты растений. – 2016. – Т. 83. – №3. – С. 120-122.

39. Нодельман, Е.К. Применение гена Fe-зависимой супероксиддисмутазы для защиты хлоропластов растений томата и табака от окислительного стресса: дис. – Автореф. дис... к. б. н. – 2014.

40. Оденцева, А.О. Перспективы использования современных агробιοтехнологий в экономике России / А.О. Оденцева, А.О. Гузырь // Вестник науки Сибири. – 2016. – №1(20). – С. 1-11.

41. Окружающая среда и здоровье детей. / Всемирная организация Здравоохранения. [Электронный ресурс], дата обращения август 2017г. – Режим доступа: http://www.who.int/features/factfiles/children_environmental_health/facts/ru/index4.html-4k

42. Определитель бактерий Берджи // М.: Мир. – 1997. – Т. 1. – С. 1-429.

43. Полянская, Л.М. Микробная сукцессия в почве: Автореф. дисс... докт. биол. наук. – М.: МГУ, 1996. – 96 с. .

44. Постановление Правительства РФ от 30.01.2017 г. № 103 «О внесении изменения в положение о Федеральной службе по ветеринарному и фитосанитарному надзору» // СЗ РФ, 2017.

45. Семенов, С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов: справочник / С. М. Семенов. М.: Агропромиздат, 1990. – 239 с.
46. Серенко, Е.К. Получение трансгенных растений томата с геном Fe-зависимой супероксиддисмутазы / Е.К. Серенко, В.Н. Овчинникова, Л. В. Куренина и др. // Докл. РАСХН. – 2009. – № 4. – С. 12 – 14.
47. Созинов, О.В. Генетически модифицированные растения для окружающей среды: конфликт интересов // ББК 20.1 Э40 Редакционная коллегия: Агиевец С.В, канд. юрид. наук, доц. (ГрГУ им. Я. Купалы) (отв. ред.). – 2011. – С. 71.
48. Соколов, М. С., Спиридонов Ю. Я., Марченко А. И. Особенности действия bt-гмр и сгу-белков на геобионты и биогеохимические функции почвы / М.С. Соколов, Ю.Я. Спиридонов, А.И. Марченко // Успехи современной науки. – 2017. – Т. 2. – №. 10. – С. 67-70.
49. Соколов, М.С. Оценка экологической безопасности трансгенных инсектицидных растений / М.С. Соколов, А.И. Марченко // Биосфера. – 2013. – Т. 5. – №. 3.
50. Способ оценки действия биологически активных веществ на антиген-антительное взаимодействие: пат. 2484480 Рос. Федерация МПК G01N33/557 G01N33/577 / Ф.Н. Гильмиярова, В.М. Радомская, Е.А. Шахнович, Н.А. Колотьева, Н.С. Нефедова, Е.А. Рыскина; патентообладатель Е.А. Шахнович; заявл. 16.04.2012; опубл. 10.06.2013.
51. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии: монография / Й. Сэги. – М.: Колос, 1983. – 296 с.
52. Топчий, М.В. К проблеме опасности ГМО / М.В. Топчий, Т.М. Чурилова // Ответственный редактор. – 2015. – С. 20.
53. Федеральный закон от 03.07.2016 № 358-ФЗ «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации в

части совершенствования государственного регулирования в области генно-инженерной деятельности» // СЗ РФ, 2016.

54. Федеральный закон от 10.01.2002 г. № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды» // СЗ РФ, 2002.

55. Федеральный закон от 17.12.1997 г. (с изменениями от 03.07.2016) № 149-ФЗ «О семеноводстве» // СЗ РФ, 1997.

56. Фирова, И.П. Регулирование развития рынка продовольствия в политике национальной безопасности / И.П. Фирова, М.М. Глазов // Общество. Среда. Развитие. – 2015. – № 2. – С. 29-35.

57. Фитюхина, О.Н. Агропродовольственные рынки в условиях глобализации. – Ростов-на-Дону.: Ростиздат. – 2012. – 401 с.

58. Цаценко, Л.В. Генетический мониторинг в агроэкологии: учебное пособие / Л.В. Цаценко. – Краснодар: КубГАУ, 2016. – 110 с.

59. Чемерис, А.В. Надо ли опасаться ГМО? Взгляд несторонних наблюдателей на истерию вокруг / А.В. Чемерис, С.М. Бикбулатова, Д. А. Чемерис, А. Баймиев и др. // Биомика. – 2014 – Т. 6 – № 2. – С. 77-138.

60. Широких И.Г. Актиномицеты в прокариотном комплексе ризосферы овса на дерново-подзолистой почве / И.Г Широких, Г.М. Зенова, О.В. Мерзаева, Е.В. Лапыгина и др. // Почвоведение. – 2007. – №. 2. – С. 179-183.

61. Широких, И.Г. Комплекс актиномицетов в ризосфере озимой ржи на дерново-подзолистой почве / И.Г. Широких, О.В Мерзаева // Микробиология. – 2005. – Т. 74. – №. 2. – С. 271-277.

62. Широких, И.Г. Микробные сообщества кислых почв Кировской области / И.Г. Широких, А.А. Широких, Т.Я. Ашихмина. – [Киров: НИИСХ Северо-Востока, 2004 – 332 с.](#)

63. Шлык, А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зелёных листьев / Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – С. 154-171.
64. Aly, M.M. Synergistic Effect between *Azotobacter vinelandii* and *Streptomyces* sp. Isolated From Saline Soil on Seed Germination and Growth of Wheat Plant / M.M. Aly, H. El-Sayed, A. El Sayed, S.D. Jastaniah // Journal of American Science. – 2012. – V. 8(5). – P. 667-676.
65. Amann, R. Phylogenetic identification and in situ detection of individual cells without cultivation / R. Amann, авторы // Microbiol. Rev. – 1995. – V 59. – P. 143–169.
66. Arango, L. Effects of glyphosate on the bacterial community associated with roots of transgenic Roundup ReadyR soybean / L. Arango, K. Buddrus-Schiemann, K. Opelt, T. Lueders, et. al. // European Journal of Soil Biology. – 2014. – T. 63. – С. 41-48.
67. Arshad, H. An efficient and secure authentication and key agreement scheme for session initiation protocol using ECC / H. Arshad, M. Nikooghadam // Multimedia Tools and Applications. – 2016. – V. 75. – №. 1. – P. 181-197.
68. Baumgarte, S. Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere / S. Baumgarte, C.C. Tebbe // Molecular Ecology. – 2005. – V. 14. – P. 2539–2551.
69. Beauchamp, C., Fridovich J. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels // Anal. Biochem. – 1971. – V. 44. – P. 276-287.
70. Becker, J. Begeitende Sicherheitsforschung zur Freisetzung Genetisch Veranderter Petunien / J. Becker, H. Siegert, G. Logemann, J. schell // Bundesministerium fur Forschung und Technologie, Boon, Germany. – 1994. – P. 563-578.

71. Beckie, H.J. Impact of herbicide-resistant crops as weeds in Canada / H.J. Beckie, L.M. Hall, S.I. Warwick // BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE WEEDS. – 2001. – V. 1. – P. 135-142.
72. Belimov, A.A. Accumulation of radionuclides by associative bacteria and the uptake of ^{143}Ce by the inoculated barley plants / A.A. Belimov, A.M. Kunakova, N. D. Vasilyeva et al. // Nitrogen Fixation with Non-Legumes; eds: K.A. Malik et al. – Kluw. Acad. Publ. – 1998. – P. 275-280.
73. Blackwood, C.B. Soil microbial communities associated with Bt and non-Bt corn in three soils / C.B. Blackwood, J.S. Buyer // J. Environ. Qual. – 2004. – V. 33. – P. 832–836.
74. Bohm, G.M.B. Transformação genética e aplicação de glifosato na microbiota solo, fixação biológica de nitrogênio, qualidade e segurança d grãos de soja geneticamente modificada / G.M.B. Bohm, C.V. Rombaldi // Ciência Rural. – 2010. – V. 40. – P. 213–221.
75. Brannon, K.J. Rhetorical Analysis of Monsanto. – 2016.
76. Brimner, T.A. Influence of herbicide resistant canola on the environmental impact of weed management / T.A. Brimner, G.J. Gallivan, G. R. Stephenson // Pest Management Science: formerly Pesticide Science. – 2005. – V. 61. – №. 1. – P. 47-52.
77. Brookes, E. How well can body size represent effects of the environment on demographic rates? Disentangling correlated explanatory variables / Mollie E. Brooks, Marianne Mugabo, Gwendolen M. Rodgers, Timothy G. Benton et al // Journal of Animal Ecology. – 2016. – V. 85. – P. 318–328.
78. Bruinsma, M. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil / M. Bruinsma, G.A. Kowalchuk, J.A. van Veen // Biol Fertil Soils. – 2003. – V. 37. – P. 329–337.

79. Carroll, M. The sticky materiality of neo-liberal neonatures: GMOs and the agrarian question // *New Political Economy*. – 2017. – V. 22. – №. 2. – P. 203-218.
80. Ceccherini, M.T. Degradation and transformability of DNA from transgenic leaves / M.T. Ceccherini, J. Poté, E. Kay, V.T. Van et. al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69 – P. 673-678.
81. Challis, G.L. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species / G.L. Challis, D.A. Hopwood // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – V. 100. – №. 2. – P. 14555-14561.
82. Chater, K.F. The complex extracellular biology of streptomycetes K.F. Chater, S. Biro, K.J. Lee, T. Palmer, H. Schrempf // *FEMS Microbiol rev.* – 2010. – V.34. – P. 171-198.
83. Chaudhry, V. Impact of salinity-tolerant MCM6 transgenic tobacco on soil enzymatic activities and the functional diversity of rhizosphere microbial communities / V. Chaudhry, H.Q. Dang, N.Q. Tran, A. Mishra et. al. // *Res. Microbiol.* – 2012. – V. 163. – P. 511-517.
84. Chung, W.C. Formulation of a soil biofungicide for control of damping-off of Chinese cabbage (*Brassica chinensis*) caused by *Rhizoctonia solani* / W.C. Chung, J.W. Huang, H.C. Huang // *Biol. Control*. – 2005. – V. 32. – P. 287-294.
85. Clausen, M. Antifungal activity of a virally encoded gene in transgenic wheat / M. Clausen, R. Kräuten, G. Schachermayr, I. Potrykus, C. Sautter // *Nature Biotech.* – 2000. – V. 18. – P. 446-449.
86. Clive, J. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014 [Электронный ресурс] / Clive, J. // ISAAA Brief 49-2014. – Режим доступа: <http://www.isaaa.org/>.

87. Clive, J. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016 [Электронный ресурс] / Clive, J. // ISAAA Brief 51-2016. – Режим доступа: <http://www.isaaa.org/>.
88. Clive, J. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2017 [Электронный ресурс] / Clive, J. // ISAAA Brief 51-2017. – Режим доступа: <http://www.isaaa.org/>.
89. Clive, J. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2018 [Электронный ресурс] / Clive, J. // ISAAA Brief 52-2018. – Режим доступа: <http://www.isaaa.org/>.
90. Conner, A.J. The release of genetically modified crops into the environment / A.J. Conner, T.R. Glare, J. Nap // *The Plant J.* – 2003. – V. 33. – Part 1. – P. 19-46.
91. Cytryn, E. The soil resistome: the anthropogenic, the native, and the unknown / E. Cytryn // *Soil Biol. Biochem.* – 2013. – V. 63. – P. 18–23.
92. Dale P. J., Clarke B., Fontes E. M. G. Potential for the environmental impact of transgenic crops / P.J. Dale, B. Clarke, E.M.G Fontes // *Nature biotechnology.* – 2002. – V. 20. – №. 6. – P. 567-574.
93. De Schrijver, A. Relevance of Bt toxin interaction studies for environmental risk assessment of genetically modified crops. / A. De Schrijver, P. De Clercq, R.A. de Maagd, K. van Frankenhuyzen // *Plant Biotechnol.* – 2015 – V 13. – P. 1221 – 1223.
94. de Vries, J. Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination J. de Vries, W. Wackernagel // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* – 2002. – V. 99. – P. 2094-2099.
95. Dernoeden, P.H. Polyoxin D (Endorse®) – A new fungicide for brown patch and large patch control, TURFAX. *The International Newsletter about Current Developments in turfgrass.* – 2001. – V. – 9. – P. 6-7.

96. Devare, M. Neither transgenic Bt maize (MON863) nor tefluthrin insecticide adversely affect soil microbial activity or biomass: a 3-year field analysis / M. Devare, L.M. Londoño-R, J.E. Thies // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2007. – V. 39. – №. 8. – P. 2038-2047.
97. Devos, Y. Quantifying the introgressive hybridisation propensity between transgenic oilseed rape and its wild/weedy relatives / Y. Devos, A. De Schrijver, D. Reheul // *Environmental Monitoring and Assessment*. – 2009. – V. 149. – №. 1-4. – P. 303-322.
98. Dewi, T.K. Secondary Metabolites Production by Actinomycetes and their Antifungal Activity / T.K. Dewi, D. Agustiani, S. Antonius // *KnE Life Sciences*. – 2017. – V. 3. – №. 4. – P. 256-264.
99. Donegan, K.K., Palm C.J., Fieland V.J., Porteous L.A., Changes in levels, species, and DNA fingerprints of soil micro-organisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* is var. Kurstaki endotoxin / K.K. Donegan, C.J. Palm, V.J. Fieland, L.A. Porteous et. al. // *Appl. Soil Ecol.* – 1995. – №. 2. – P. 111–124.
100. Doroghazi, J.R. Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes / J.R. Doroghazi, W.W. Metcalf // *BMC genomics*. – 2013. – V. 14. – №. 1. – P. 611.
101. Duke S.O. Taking stock of herbicide resistant crops ten years after introduction / S.O. Duke // *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*. – 2005. – V. 61. – №. 3. – P. 211-218.
102. Dunfield K.E. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus* / K.E. Dunfield, J.J. Germida // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2001. – V. 38. – №. 1. – P. 1-9.

103. Dunfield, K.E. Impact of genetically modified crops on soil-and plant-associated microbial communities / K.E. Dunfield, J.J. Germida // *J. Environ Qual.* – 2004. – V. 38. – P. 806–815.
104. Dunfield, K.E. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with fieldgrown genetically modified canola (*Brassica napus*) / K.E. Dunfield, J.J. Germida // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69. – P. 7310–7318.
105. Ellstrand, N.C. Dangerous liaisons?: when cultivated plants mate with their wild relatives. – JHU Press, 2003. – P. 247.
106. Filion, M. Do transgenic plants affect rhizobacteria populations? / M. Filion // *Microb. Biotechnol.* – 2008. – V. 1. – P. 463.
107. Firn, R.D. Secondary metabolism and the risks of GMOs / R.D. Firn, C.G. Jones // *Nature.* – 1999. – V. 400. – P. 14-50.
108. Funke, T. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops / T. Funke, H. Han, M.L. Healy-Fried, M. Fischer, E. Schonbrunn // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2006. – V. 103. – P. 13010-13015.
109. Gebhard F. Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA / F. Gebhard, K. Smalla // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1998. – V. 64. – №. 4. – P. 1550-1554.
110. Getha, K. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process / K. Getha, S. Vikineswary // *J. of Industrial Microbiology & Biotechnology.* – 2002. – V. 28 (6). – P. 303-310.
111. Glandorf, D.C. Effect of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r on the fungal rhizosphere microflora of field-grown wheat / D.C Glandorf, P. Verheggen, J. Tansen et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 67. – №. 8. – P. 3371-3378.

112. GM Approval Database [электронный ресурс], дата обращения февраль 2018г. – Режим доступа: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>.
113. Gopalakrishnan, S. Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea / S. Gopalakrishnan, S. Pande, M. Sharma P. Humayun et al. // Crop. Prot. – 2011. – V.30. – №. 8. – P.1070–1078.
114. Gopalakrishnan, S. Evaluation of *Streptomyces* spp. for their plant-growth-promotion traits in rice / S. Gopalakrishnan, S. Vadlamudi, S. Apparla, P. Bandikinda et. al. // Can J Microbiol. – 2013. – V. 59. – P. 534-539.
115. Gopalakrishnan, S. Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice / S. Gopalakrishnan, S. Vadlamudi, P. Bandikinda // Microbiol Res. – 2014. – V.169. – P. 40-48.
116. Guana, Z-J. Do genetically modified plants affect adversely on soil microbial communities? / Z-J. Guana, S-B. Luc, Y-L. Huod, Z-P. Guane, B. Liuf, W. Weib // Agriculture, Ecosystems and Environment. – 2016. – V. 235. – P. 289-305.
117. Gyamfi, S. Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere / S. Gyamfi, U. Pfeifer, M. Stierschneider, A. Sessitsch // FEMS Microbiol Ecol. – 2002. – V. 41. – P. 181–190.
118. Hamedi, J. Biotechnological application and taxonomical distribution of plant growth promoting actinobacteria / J. Hamedi, F. Mohammadipanah // Journal of industrial microbiology & biotechnology – 2015. – V. 42. – №. 2. – С. 157-171.

119. Hartung, F. Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU / F. Hartung, J. Schiemann // *The Plant Journal*. – 2014. – V. 78. – №. 5. – P. 742-752.
120. Head, I.M. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultured microorganisms / I.M. Head, J.R.Saunders, R.W. Pickup // *Microb. Ecol.* – 1998. – V 35. – P. 1–21.
121. Heinemann, J.A. Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants / J.A. Heinemann, T. Traavik // *Nature Biotechnology*. – 2004. – V. 22. – P. 1105-1109.
122. Heuer, H. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors / H. Heuer, R.M. Kroppenstedt, J. Lottmann, G. Berg, K. Smalla // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2002. – V. 68(3). – P. 1325-1335.
123. Hightower, R. Expression of antifreeze proteins in transgenic plants / R. Hightower, C. Baden, E. Penzes, P. Lund, P. Dunsmuir // *Plant Molecular Biology*. – 1991. – V. 17. – №. 5. – P. 1013-1021.
124. Hoffman, C. (1990) Ecological risks of genetic engineering of crop plants / C. Hoffman // *BioScience*. – 1990. – V. – 40. – P. 434-437.
125. Hopwood D. A. *Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers* // Oxford University Press. – 2007. – 249 p.
126. Horlacher, N. Biotransformation of the fungal phytotoxin fomannoxin by soil Streptomyces / N. Horlacher, J. Nachtigall, D. Schulz, R.D. Süssmuth et. al. // *J Chem Ecol.* – 2013. – V. 39. – P. 931-941.
127. Hoster, F. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel Streptomyces strain / F. Hoster, J.E. Schmitz, R. Daniel // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2005. – V. 66. – P. 434-442.

128. Icoz, I. Fate and effects of insect-resistant Bt crops in soil ecosystems / I. Icoz, G. Stotzky // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2008. – V 3. – P. 559-586.
129. Kay, B.D. Conservation tillage and depth stratification of porosity and soil organic matter / B.D Kay, A.J VandenBygaart // *Soil and Tillage Research*. – 2002. – V. 66. – №. 2. – P. 107-118.
130. Ki-Jong, Lee The Effects of Genetically Modified Crops on Soil Microbial Community Lee Ki-Jong, Oh Sung-Dug, Sohn Soo-In et al. // *Korean J Environ Agric*. – 2012. – V. 31. – № 2. – P. 192–199.
131. King, A.C. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to glyphosate applications A.C. King, L.C. Purcell, E.D. Vories // *Agron. J*. 2001. – V. – 93. – P. 179-186.
132. Kowalchuk, G.A. Molecular microbial ecology manual /G.A. Kowalchuk, F. Bruijn, A.D. Akkermans // *Springer Science & Business Media*. – 2004. – V. 1.
133. Kowalchuk, G. A. Assessing responses of soil microorganisms to GM plants / G.A. Kowalchuk, M. Bruinsma, J.A. van Veen // *Trends in Ecology & Evolution*. – 2003. – V. 18. – №. 8. – P. 403-410.
134. Kremer, R.J. Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms / R.J. Kremer, N.E. Means // *Europ. J. Agron*. – 2009. – V. 31. – P. 153–161.
135. Krogh, P.H. Responses by earthworms to reduced tillage in herbicide tolerant maize and Bt maize cropping systems / P.H. Krogh, B. Griffiths, D. Demšar et al. // *Pedobiologia*. – 2007. – V. 51. – №. 3. – P. 219-227.
136. Kurth, F. Streptomyces -induced resistance against oak powdery mildew involves host plant responses in defense, photosynthesis, and secondary metabolism pathways / F. Kurth, S. Mailänder, M. Bönn, L. Feldhahn, S. Herrmann, I. Große, et al. // *Mol. Plant Microbe Interact*. – 2014. – V. 27. – P. 891-900.

137. Lacroix, B. Transfer of DNA from bacteria to eukaryotes / B. Lacroix, V. Citovsky // Microbiol. – 2016. – P. 7.

138. Ladics, GS. Genetic basis and detection of unintended effects in genetically modified crop plants / GS. Ladics, A. Bartholomaeus, P. Bregitzer, NG. Doerrer, A. Gray, T. Holzhauser, M. Jordan, P. Keese, E. Kok, P. Macdonald, W. Parrott, L. Privalle, A. Raybould, SY. Rhee, E. Rice, J. Romeis, J. Vaughn, J-M. Wal, K. Glenn. Transgenic Research. – 2015. – V. 24 – P. 587-603.

139. Lanoot, B. Reclassification of *Streptomyces nigrifaciens* as a later synonym of *Streptomyces flavovirens*; *Streptomyces citreofluorescens*, *Streptomyces chrysomallus* subsp. *chrysomallus* and *Streptomyces fluorescens* as later synonyms of *Streptomyces anulatus*; *Streptomyces chibaensis* as a later synonym of *Streptomyces corchorusii*; *Streptomyces flaviscleroticus* as a later synonym of *Streptomyces minutiscleroticus*; and *Streptomyces lipmanii*, *Streptomyces griseus* subsp. *alpha*, *Streptomyces griseus* subsp. *cretosus* and ... / B. Lanoot, M. Vancanneyt, A. Van Schoor, Z. Liu et al. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2005. – V. 55(2). – P. 729-731.

140. Lanza, V.F. The plasmidome of Firmicutes: impact on the emergence and the spread of resistance to antimicrobials / V.F. Lanza, A.P. Tedim, J.L. Martinez, F. Baquero, T.M. Coque // Microbiol. Spectr. – 2015 – P. 3.

141. Latham, JR. The mutational consequences of plant transformation. / JR. Latham, AK. Wilson, RA. Steinbrecher et al. // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2006. P. 1-7.

142. Law, J.W.F. The potential of *Streptomyces* as biocontrol agents against the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*) / J.W.F. Law, H.L. Ser, T.M. Khan, L.H. Chuah // Frontiers in microbiology. – 2017. – V. 8. – P. 3.

143. Libbert, E. Interactions between plants and epiphytic bacteria regarding their auxin metabolism / E. Libbert, H. Risch // *Physiol. Plantarum*. – 1969. – V. 22. – P. 51–58.
144. Liu, W. Transgenic Bt rice does not affect enzyme activities and microbial composition in the rhizosphere during crop development W. Liu, H.H. Lu, W.X. Wu, Q.K. Wei et. al. // *Soil Biol. Biochem.* – 2008. – V. 40. – P. 475–486.
145. Locke, J.A. Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer / J.A. Locke, E.S. Guns, A.A. Lubik et al. // *Cancer research*. – 2008. – V. 68. – №. 15. – P. 6407-6415.
146. Lombardo, L. New technologies for insect-resistant and herbicide-tolerant plants / L. Lombardo, G. Coppola, S. Zelasco // *Trends in biotechnology*. – 2016. – V. 34. – №. 1. – P. 49-57.
147. Ioset, J.R. Flavonoid profiling among wild type and related GM wheat varieties / 213. J.R. Ioset, B. Urbaniak, K. Ndjoko-Ioset et. al. // *Plant molecular biology*. – 2007. – V. 65. – №. 5. – P. 645-654.
148. Lynch, J.M. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms / J.M. Lynch, A. Benedetti, H. Insam, M.P. Nuti et. al. // *Biol. Fert. Soils*. – 2004. – V. 40. – P. 363-385.
149. Martinez, K.B. Microbial metabolites in health and disease: Navigating the unknown in search of function / K.B. Martinez, V. Leone, E.B. Chang // *Journal of Biological Chemistry*. – 2017. – V. 292. – №. 21. – P. 8553-8559.
150. Meriles, J.M. Glyphosate and previous crop residue effect on deleterious and beneficial soil-borne fungi from a peanut–corn–soybean rotations

J.M. Meriles, S. Vargas Gil, R.J. Haro, G.J. March, C.A. Guzman // *Journal of phytopathology*. – 2006. – V. 154 (5). – P. 309–316.

151. Miller, R.V. Gene transfer in the environment / R.V Miller, S.B. Levy // McGraw-Hill, New York. – 1989. – P. 405-420.

152. Mondy, S. An increasing opine carbon bias in artificial exudation systems and genetically modified plant rhizospheres leads to an increasing reshaping of bacterial populations / S. Mondy, A. Lenglet, A. Beury-Cirou, C. Libanga et. al. // *Molecular Ecology*. – 2014. – P. 4846-4861.

153. Motavalli, P.P. Impact of genetically modified crops and their management on soil microbially mediated plant nutrient transformations / P.P Motavalli, R.J. Kremer, M. Fang et. al. // *Journal of environmental quality*. – 2004. – V. 33. – №. 3. – P. 816-824.

154. Murashige, T. medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F.A. Skoog // *Physiol. Plant*. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.

155. Nielsen, K.M. Dynamics, horizontal transfer and selection of novel DNA in bacterial populations in the phytosphere of transgenic plants K.M. Nielsen, J.D. van Elsas, K. Smalla // *Annals of Microbiology*. – 2001. – V. 51. – P. 79-94.

156. Nielsen, K.M. Induced Natural Transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* in Soil Microcosms / K.M. Nielsen, A.M.Bones, J.D Van Elsas // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1997. – V. 63. – №. 10. – P. 3972-3977.

157. O'Callaghan, M. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms / M. O'Callaghan, T.R. Glare, E.P. Burgess et al. // *Annu. Rev. Entomol.* – 2005. – V. 50. – P. 271-292.

158. Oger, P. Effect of crop rotation and soil cover on the alteration of the soil microflora generated by the culture of transgenic plants producing opines / P. Oger, H. Mansouri, Y. Dessaux // *Mol. Ecol.* – 2000. – V. 9. – P. 881-890.

159. Ondreičková, K. Impact of genetically modified maize on the genetic diversity of rhizosphere bacteria: a two-year study in Slovakia / K. Ondreičková, D. Daniel Mihálik, A. Andrej Ficek, M. Martina Hudcovicová et. al // *Polish Journal of Ecology.* – 2014. – V. 62(1). – P. 67–76.

160. Owen, D. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition / D. Owen, A.P. Williams, G.W. Griffith, P.J.A. Withers // *Applied Soil Ecology.* – 2015 – V. 86. – P. 41-54.

161. Palaniyandi, S.A. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion / S.A. Palaniyandi, S.H. Yang, L. Zhang, J.W. Suh // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – V. 97. – P. 9636.

162. Poerschmann, J. Molecular composition of leaves and stems of genetically modified Bt and near-isogenic non-Bt Maize – characterization of lignin patterns / J. Poerschmann, A. Gathmann, J. Augustin, U. Langer, T. Gorecki // *J. Environ Qual.* – 2005. – V. 34. – P. 1508-1518.

163. Price, B. The GM Contamination Register: a review of recorded contamination incidents associated with genetically modified organisms (GMOs) 1997–2013 / B. Price, J. Cotter // *International Journal of Food Contamination.* – 2014. – V. 1. – P. 5.

164. Priha, O. Microbial activities related to C and N cycling and microbial community structure in the rhizospheres of *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* seedlings in an organic and mineral soil / O. Priha, S.J. Grayston, T. Pennanen, A. Smolander // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1999. – V. 30. – P. 187-199.

165. Qaim, M. Roundup Ready soybeans in Argentina: farm level and aggregate welfare effects / Qaim, M. Traxler, G // *Agricultural economics*. – 2005. – V. 32. – №. 1. – P. 73-86
166. Quail, M.A. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers / M.A. Quail, M. Smith, P. Coupland, T.D. Otto et al. // *BMC Genomics*. – 2012. – V. 13. – P. 341.
167. Querci, M. The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms / M. Querci, M. Jermini, G. Van den Eede // *TRAINING COURSE ON*. – 2006. – P. 33.
168. Regal, P.J. Models of genetically engineered organisms and their ecological impact / P.J. Regal, J.Philip // *Ecology of biological invasions of North America and Hawaii*. – Springer, New York, NY. – 1986. – P. 111-129.
169. Ren, L. Improved eicosapentaenoic acid production in *Pythium splendens* RBB-5 based on metabolic regulation analysis / L. Ren, P. Zhou, Y. Zhu, RZ. Ran, L. Yu. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2017. – V. 101(9) – P.3769-3780.
170. Rey, T. Plenty is no plague: *Streptomyces symbiosis* with crops / T. Rey, B. Dumas // *Trends in plant science*. – 2017. – V. 22. – №. 1. – P. 30-37.
171. Rowbotham, T.Y. Ecology of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes cetes in fresh water and agricultural habitats / T.Y. Rowbotham, T. Cross, J. Gen // *Microbiol*. – 1977. – V. 100. – P. 231-240.
172. Roy D. B. Invertebrates and vegetation of field margins adjacent to crops subject to contrasting herbicide regimes in the farm scale evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops / D.B. Roy, D.A. Bohan, A.J.Haughton, M.O. Hill, J.L. Osborne, S.J. Clark, G.T. Champion, C. Haves, M.S. Heard, L.G. Firbank. // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. – 2003. – V. 358. – №. 1439. – P. 1879-1898.

173. Saleh, O. Mutational analysis of a phenazine biosynthetic gene cluster in *Streptomyces anulatus* 9663 / O. Saleh, K. Flinspach, L. Westrich, A. Kulik et al. // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. – 2012. – V. 8. – P. 501-513.
174. Samuels, J. Transgene flow from Bt brinjal: a real risk? / J. Samuels. // *Trends Biotechnol.* – 2013. V. – 31. – P. 333–334.
175. Sanogo, S. Effects of herbicides on *Fusarium solani* f. sp. glycines and development of sudden death syndrome in glyphosate-tolerant soybean / S. Sanogo, X.B. Yang, H. Scherm // *Phytopathology*. – 2000. – V. 90. – P. 57–66.
176. Saxena, D. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil / D. Saxena, G. Stotzky // *Soil Biol. Biochem.* – 2001. – V. 33. – P. 1225–1230.
177. Saxena, D. Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn / D. Saxena, G. Stotzky // *American Journal of Botany*. – 2001. – V. 88. – P. 1704–1706.
178. Saxena, D. Flores S., Stotzky G. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn D. Saxena, S. Stotzky G. Flores // *Nature*. – 1999. – V. 402. – P. 480.
179. Saxena, D. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ / D. Saxena, G. Stotzky // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2000. – V. 33. – P. 35.
180. Schrey, S.D. Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis / S.D. Schrey, M.T. Tarkka // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2008. – V. 94. – P.11-19.
181. Schrey, SD, Interaction with mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* sp. AcH 505 modifies organisation of actin cytoskeleton in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria* (fly agaric) / SD. Schrey, V. Salo, M. Raudaskoski, R. Hampp, U. Nehls, MT. Tarkka // *Curr Genet*. – 2007. – V. 52. – P. 77-85.

182. Schütze, E. Heavy Metal-Resistant Streptomycetes in Soil. In: Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils / E. Schütze, E. Kothe // Soil Biology. – 2012. – V. 31. – P. 163-182.

183. Serrano, C. Expression of the chicken lysozyme gene in potato enhances resistance to infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* / C. Serrano, P. Arce-Johnson, H. Torres et al. // American journal of potato research. – 2000. – T. 77. – №. 3. – C. 191-199.

184. Shanmuganathan, K. Antibiotics in agriculture / K. Shanmuganathan, J. Yasin, M. Jayaprakasam // Agric. Today. – 2001. – V.6. – P. 40-41.

185. Sharples, J.A. The short-run elasticity of demand for US wheat exports // ERS staff report-United States Dept. of Agriculture, Economic Research Service (USA). – 1982.

186. Shimizu, M. Endophytic Actinomycetes: Biocontrol Agents and Growth Promoters / M. Shimizu // In: Maheshwari D.K. (Ed.). Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag. – 2011. – P.201-220.

187. Shirling, E.B. Methods for Characterization of *Streptomyces* Species E.B. Shirling, D. Gottlieb // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1966. – V. 16. – № 3. – P. 313-340.

188. Shrivastava, P. Actinobacteria: Eco-Friendly Candidates for Control of Plant Diseases in a Sustainable Manner / P. Shrivastava, R. Kumar // New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. – 2018. – P. 79-91.

189. Singh, A.K. Rhizospheric fungal community structure of a *Bt* brinjal and a near isogenic variety / A.K. Singh, M. Singh, S.K. Dubey // Journal of Applied Microbiology. – 2014. – V. 117. – P. 750-765.

190. Smalla, K. Bacterual Communities influence by Transgenic Plants In: Proc. of the 3rd Int. Symp on The Biosafety Results of Field Tests of Genetically

Modified Plants and Microorganism / K. Smalla, F. Gebhard, J. D. van Elsas, A. Matzk, J. Schiemann. // The University of California Division of Agriculture and Natural Resources, Oacland, Calif. – 1994. – P. 157-168.

191. Stephen, J.R. and Kowalchuk, G.A. Ribotyping methods for assessment of in situ microbial community structure / J.R Stephen, G.A. Kowalchuk // In Encyclopedia of Environmental Microbiology. – 2002. – V. 5. –P. 2728–2741.

192. Strohl, W.R. Antimicrobials / W.R. Strohl // In: Bull A.T. (Ed.), Microbial Diversity and Bioprocessing. American Society for Microbiology. Washington DC. – 2004. – P. 336-355.

193. Syvanen, M. Evolutionary implications of horizontal gene transfer / M. Syvanen // Ann. Rev. Genet. – 2012. – V. 46. – P. 341–358.

194. Tabashnik B.E. Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field / B.E Tabashnik, Y. Carrière,. T.J. Dennehy, S. Morin // Journal of economic entomology. – 2003. – V. 96. – №. 4. – P. 1031-1038.

195. Tarkka M. Secondary Metabolites of Soil Streptomycetes in Biotic Interactions / Tarkka M., Hampp R. // In: Karlovsky P. (Ed.). Secondary Metabolites in Soil Ecology. Soil Biology 14. Berlin - Heidelberg: Springer-Verlag. – 2008. – P.107-126.

196. Teather, R.M. Use of congo-red polysaccharide interaction in erumeration and characterization of cellulolytic bacteria the bovine rumen / R. M. Teather, P. J. Wood // Appl. Environ. Microbiol. – 1982. – V. 43. – P. 777-780.

197. Thomson, J. Genetically modified food crops for improving agricultural practice and their effects on human health / J. Thomson // Trends in Food Science and Technology. – 2003. – V. 14. – P. – 210-228.

198. Tiedje, J. The planned introduction of genetically modified organisms: ecological considerations and recommendations / J. Tiedje, R. Colwell, Y. Grossman, R. Hodson et al. // *Ecology*. – 1989. – V. 70. – P. 298-315.

199. Tiedje, J.M. Opening the black box of soil microbial diversity / J.M. Tiedje, S. Asuming-Brempong, K. Nüsslein, T.L. Marsh et al. // *Soil Ecol.* – 1999. – V. 13. – P. 109–122.

200. Tokala, R.K. Novel plantmicrobe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*) / R.K. Tokala, J.L. Strap, C.M. Jung, D.L. Crawford et al. // *Applied Environ Microbiol.* – 2002. – V. 68. №. 5. – P. 2161-2171.

201. Tsaftaris, A.S. Transgenic crops: recent developments and prospects. In *Biological Resource Management* / A.S. Tsaftaris A.N. Polidoros, M. Karavangeli, L. Nianiou-Obeidat et al. // *Biological Resource Management*. – 2002. – P. 187-203.

202. Tsaftaris, A.S. Transgenic crops: recent developments and prospects / A.S. Tsaftaris, A.N. Polidoros, M Karavangeli et al. // *Biological Resource Management Connecting Science and Policy*. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2000. – C. 187-203.

203. Turrini, A. Belowground environmental effects of transgenic crops: a soil microbial perspective / A. Turrini, C. Sbrana, M. Giovannetti // *Research in microbiology*. – 2015. – V. 166 (3). – P. 121–131.

204. Valagurova, H.V. Heavy metals effect on the streptomycete association of grey podzolic soil / H.V. Valagurova, G.A. Iutinskaya V.E. Kozyritskaya, N.I. Ivanova et al. // *Microbiol. Zh.* – 1996. – V.58(2). – P. 16-22.

205. Valldor, P. Fate of the insecticidal Cry1Ab protein of GM crops in two agricultural soils as revealed by ¹⁴C-tracer studies / P. Valldor, R. Miethling-Graff, R. Martens, C.C. Tebbe // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – V. 99(17). – P. 7333–7341.

206. Vilvert, R.M. Residual effect of transgenic soybean in soil microbiota / R.M. Vilvert, D. Aguiar, R.M.T. Gimenes, O. Alberton // *African Journal of Agricultural Research*. – 2014. – V. 9 (30). – P. 2369–2376.
207. Vital-López L. Bacterial diversity in the rhizosphere of a transgenic versus a conventional maize (*Zea mays*) / L. Vital-López, M. A Cruz-Hernández, Fernández-Dávila // *Phyton, International Journal of Experimental Botany*. – 2017. – V. 85. – P. 210-217.
208. Wagner, The probability of a horizontal gene transfer from roundup ReadyR soybean to root symbiotic bacteria: a risk assessment study on the GSF lysimeter station / T. Wagner, L.M. Arango Isaza, S. Grundmann, U. Dörfler et. al. // *Water Air Soil Pollut: Focus*. – 2008. – V. 8. – P. 155.
209. Waksman, S.A. The Actinomycetes. Classification, identification and descriptions of genera and species. – Baltimor: The Williams and Wilkins Company, 1961. – V. 2 – 292 p.
210. Wang, W. Siderophore production by actinobacteria / W. Wang, Z. Qiu, H. Tan, L. Cao // *Biometals*. – 2014. – V. 27. – P. 623-631.
211. Warwick, S.I. Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy *Brassica rapa* population / S.I. Warwick, A. Legere, M.-J. Simard, T. James // *Molecular ecology* – 2008. – V. 17 (5). – P. 1387-1395.
212. Weber, T. antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters / T. Weber, K. Blin, S. Duddela, D. Krug et. al. // *Nucleic acids research*. – 2015. – V. 43 (1). – P. 237-243.
213. Weber, T. Etc gene clusters / T. Weber, K. Blin, S. Duddela, D. Krug et. al. // *Nucleic acids research*. – 2015. – V. 43(1). – P. 237-243.
214. Wei, L. Effect of Cry3Bb transgenic corn and tefluthrin on the soil microbial community: biomass, activity and diversity / L. Wei, H.L. Hao, W. Weixiang, K.W. Qi et. al. // *J. Environ Qual*. 2004. – V. 33. – P. 837-843.

215. WHO. Health aspects of markers genes in genetically modified plants. Workshop Report. Copenhagen, Denmark: WHO; 21–24 September 1993.
216. Wilkinson, M. Problems of risk assessment with genetically modified oilseed rape / M. Wilkinson, Y. Charters, A. Timmons, S. Dubbels, A Robertson, N. Wilson, S. Scott, E. O'Brian, H. Lawson // Proc. Brighton Crop Protect. Conf. – Weeds. – 1995. – P. 1035–1044.
217. Wu, W.X. Effect of straws from Bt-transgenic rice on selected biological activities in waterflooded soil / W.X. Wu, Q.F. Ye, H. Min // Eur. J. Soil Biol. – 2004. – V. 40. – P. 15–22.
218. Xiao, K. Biological control of Phytophthora root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces* / K. Xiao, L.L. Kinkel, D. A. Samac // Biol. Control. – 2002. – V. 23. – P. 285-295.
219. Yandigeri, M.S. Drought-tolerant endophytic actinobacteria promote growth of wheat (*Triticum aestivum*) under water stress conditions / M.S., Meena K.K. Yandigeri, D. Singh, N. Malviya // Plant Growth Regul. – 2012. – V. 68(3). – P. 411-420.
220. Yong-Eok, Lee Investigation into effects of transgenic glufosinate-resistant *Zoysia grasses* with herbicide application on bacterial communities under field conditions / Lee Yong-Eok, Lee Sun Hwa, Ryu Gil-Do, Kang Hong-Gyu et. al. // Journal of Plant Biology. – 2015. – V. 58. – № 5. – P. 303.
221. Zablotowicz, R.M. Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosateresistant transgenic soybean: a minireview R.M. Zablotowicz, K.N. Reddy // Journal Environmental Quality. Madison. 2004. – V. 33. – P. 825–831.
222. Zablotowicz, R.M. Nitrogenase activity, nitrogen content, and yield responses to glyphosate in glyphosate-resistant soybean / R.M. Zablotowicz, K.N. Reddy // Crop Protection. – 2007. – V. 26. – P. 370–376.

223. Zhang, Y.J. A 3-year field investigation of impacts of Monsanto's transgenic Bt-cotton NC 33B on rhizosphere microbial communities in northern China / Y.J. Zhang, M. Xie, G. Wu, D.L. Peng et. al. // *Applied Soil Ecology*. – 2015. – V. 89. – P. 18-24.

224. Zhang, Y.J. Impacts of the transgenic CryIAc and CpTI insect-resistant cotton SGK321 on selected soil enzyme activities in the rhizosphere / Y.J. Zhang, M. Xie, C.Y. Li, G. Wu, D.L. Peng // *Plant Soil Environ.* – 2014. – V. 60. – № 9. – P. 401–406.

225. Zhou, D. Cerium and ytterbium codoped halide perovskite quantum dots: a novel and efficient downconverter for improving the performance of silicon solar cells / D. Zhou, D. Liu, G. Pan et. al. // *Advanced Materials*. – 2017. – V. 29. – №. 42. – P. 1704149.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица – Список генов (по данным ISAAA (GM Approval Database, дата обращения 22.01.2019))

№ п/п	Целевые гены	Источник выделения	Эффект, полученный при экспрессии целевых генов	Культуры	Количество линий
Устойчивость к насекомым <i>Lepidoptera</i>					
1	cry1Ab	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. kurstaki	придает устойчивость к <i>Lepidoptera</i> путем селективного повреждения стенок кишечника	хлопок (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	8
				кукуруза (<i>Zea mays</i> L.)	80
				рис (<i>Oryza sativa</i> L.)	2
				сахарный тростник (<i>Saccharum</i> sp.)	1
2	cry1A	<i>Bacillus thuringiensis</i>		хлопок (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	1
				кукуруза (<i>Zea mays</i> L.)	1
3	cry1A.105	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. kumamotoensis		кукуруза (<i>Zea mays</i> L.)	41
				соя (<i>Glycine max</i> L.)	2
4	cry1Ab (truncated)	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. kumamotoensis		кукуруза (<i>Zea mays</i> L.)	2
			рис (<i>Oryza sativa</i> L.)	1	
5	cry1Ab-Ac	<i>Bacillus thuringiensis</i>	хлопок (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	2	
6	cry1Ac	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki HD73	хлопок (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	29	
			баклажаны (<i>Solanum melongena</i>)	1	
			кукуруза (<i>Zea mays</i> L.)	1	
			рис (<i>Oryza sativa</i> L.)	2	
			тополь (<i>Populus</i> sp.)	2	
			томат (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	1	
			соя (<i>Glycine max</i> L.)	5	
7	cry1F	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. aizawai	хлопок (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	7	
			кукуруза (<i>Zea mays</i> L.)	9	
			соя (<i>Glycine max</i> L.)	2	
8	cry1Fa2	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. aizawai	Кукуруза (<i>Zea mays</i> L.)	79	
9	cry2Ab2	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. kumamotoensis	хлопок (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	10	
			кукуруза (<i>Zea Mays</i> L.)	44	
			соя (<i>Glycine max</i> L.)	2	

Продолжение таблицы

№ п/п	Целевые гены	Источник выделения	Эффект, полученный при экспрессии целевых генов	Культуры	Количество линий
22	dvsnf7	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	снижение регуляторной функции гена-мишени Snf7, ведущее к смертности <i>Crepidodera</i>	кукуруза (<i>Zea mays L.</i>)	4
Устойчивость к широкому кругу насекомых-вредителей					
23	API	<i>Sagittaria sagittifolia</i> (Arrowhead)	придает устойчивость к широкому кругу насекомых-вредителей	тополь (<i>Populus sp.</i>)	1
24	CrTI	<i>Vigna unguiculata</i>		хлопок (<i>Gossypium hirsutum L.</i>)	1
25	ecry3.1Ab	<i>Bacillus thuringiensis</i>	придает устойчивость к <i>Lepidoptera</i> и <i>Coleoptera</i> насекомых путем селективного повреждения ткани кишечника	кукуруза (<i>Zea mays L.</i>)	35
Устойчивость к гербициду 2,4-Д					
26	aap-1	<i>Sphingobium herbicidovorans</i>	детоксифицирует 2,4-Д гербицид, ухудшает R-энантиомеры арилоксифеноксипропионатов гербицидов	кукуруза (<i>Zea mays L.</i>)	22
27	aad-12	<i>Delftia acidovorans</i>	катализирует деградацию боковой цепи 2,4-Д гербицида	хлопок (<i>Gossypium hirsutum L.</i>) соя (<i>Glycine max L.</i>)	3 4
Устойчивость к гербицидам dicamba					
28	dmo	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DI-6	придает устойчивость к гербициду dicamba (2-метокси-3,6-дихлорбензойная кислота)	хлопок (<i>Gossypium hirsutum L.</i>) кукуруза (<i>Zea mays L.</i>) соя (<i>Glycine max L.</i>)	4 1 6
Устойчивость к глюфосинату					
29	bar	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	исключает гербицидную активность глюфосината (фосфинотрицин) путем ацетилирования	аргентинский рапс (<i>Brassica napus</i>) цикорий (<i>Cichorium intybus</i>) хлопок (<i>Gossypium hirsutum L.</i>) кукуруза (<i>Zea mays L.</i>) рис (<i>Oryza sativa L.</i>)	25 3 16 7 3 2

Продолжение таблицы

№ п/п	Целевые гены	Источник выделения	Эффект, полученный при экспрессии целевых генов	Культуры	Количество линий
30	pat	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	исключает гербицидную активность глифосината (фосфинотрицин) путем ацетилирования	аргентинский рапс - <i>Brassica napus</i>	2
				хлопок (<i>Gossypium hirsutum L.</i>)	4
				кукуруза (<i>Zea mays L.</i>)	5
31	pat (syn)	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tu 494	исключает гербицидную активность глифосината (фосфинотрицин) путем ацетилирования	хлопок (<i>Gossypium hirsutum L.</i>)	4
				кукуруза (<i>Zea mays L.</i>)	147
				репа (<i>Brassica rapa</i>)	1
				соя (<i>Glycine max L.</i>)	13
				сахарная свекла (<i>Beta vulgaris</i>)	1
Устойчивость к глифосату					
32	2merpsps	<i>Zea mays</i>		хлопок (<i>Gossypium hirsutum L.</i>)	6
				кукуруза (<i>Zea mays L.</i>)	2
				соя (<i>Glycine max L.</i>)	4
33	cp4 epsps (aroa: cp4)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> CP4	уменьшает сродство связывания глифосата, тем самым увеличивая к нему устойчивость	люцерна (<i>Medicago sativa</i>)	4
				аргентинский рапс (<i>Brassica napus</i>)	12
				хлопок (<i>Gossypium hirsutum L.</i>)	15
				полевица побегоносная (<i>Agrostis stolonifera</i>)	1
				кукуруза (<i>Zea mays L.</i>)	82
				репа (<i>Brassica rapa</i>)	3
				картофель (<i>Solanum tuberosum L.</i>)	4
				соя (<i>Glycine max L.</i>)	15
				сахарная свекла (<i>Beta vulgaris</i>)	2
				пшеница (<i>Triticum aestivum</i>)	1

Продолжение таблицы

№ п/п	Целевые гены	Источник выделения	Эффект, полученный при экспрессии целевых генов	Культуры	Количество линий
34	gat4601	<i>Bacillus licheniformis</i>	катализирует инактивацию глифосата, придает к нему устойчивость	аргентинский рапс (<i>Brassica napus</i>)	1
				соя (<i>Glycine max L.</i>)	1
35	gat4621	<i>Bacillus licheniformis</i>	придает устойчивость к глифосату	аргентинский рапс (<i>Brassica napus</i>)	2
				кукуруза (<i>Zea mays L.</i>)	4
36	epsps grg23ace5	<i>Arthrobacter globiformis</i>	придает устойчивость к глифосату	кукуруза (<i>Zea mays L.</i>)	1
37	meppsps	<i>Zea mays</i>		Кукуруза (<i>Zea mays L.</i>)	50
38	goxv247	<i>Ochrobactrum anthropi</i> LBAA	придает устойчивость к глифосату путем деградации аминотимолфосфоновой кислоты (АМКА) и глиоксилата	аргентинский рапс (<i>Brassica napus</i>)	3
				кукуруза (<i>Zea mays L.</i>)	8
				репа (<i>Brassica rapa</i>)	3
				сахарная свекла (<i>Beta vulgaris</i>)	1
Устойчивость к гербициду изоксафлутолу					
39	hppdPF W336	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A32	придает устойчивость к HPPD ингибирующую гербициды (например, изоксафлутол) за счет уменьшения специфичности в отношении биологически активного компонента гербицида	соя (<i>Glycine max L.</i>)	2
Устойчивость к гербицидам с действующим веществом мезотрион					
40	avhppd-03	<i>Avena sativa</i>	Устойчивость к мезотриону	соя – (<i>Glycine max L.</i>)	1
Устойчивость к гербициду Охунил					
41	bxn	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. Ozaenae</i>	устраняет активность гербицидов охунил (например, бромоксинил)	аргентинский рапс <i>Brassica napus</i>	1
				хлопок (<i>Gossypium hirsutum L.</i>)	10
				табак (<i>Nicotiana tabacum L.</i>)	1

Продолжение таблицы

№ п/п	Целевые гены	Источник выделения	Эффект, полученный при экспрессии целевых генов	Культуры	Количество линий
Устойчивость к гербицидам на основе сульфонилмочевины					
42	als	<i>Arabidopsis thaliana</i>	дает возможность синтезировать незаменимые аминокислоты в присутствии гербицидов на основе сульфонилмочевины	лен (<i>Linum usitatissimum L.</i>)	1
43	csr1-2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	придает устойчивость к гербицидам на основе имидазолинона	соя (<i>Glycine max L.</i>)	1
44	gm-hra	modified acetolactate synthase (ALS) enzyme	придает устойчивость к гербицидам на основе сульфонилмочевины	соя (<i>Glycine max L.</i>)	3
45	S4-HrA	<i>Nicotiana tabacum</i>	позволяет растениям синтезировать незаменимые аминокислоты в присутствии гербицидов на основе сульфонилмочевины	хлопок (<i>Gossypium hirsutum L.</i>)	1
46	surB	<i>Nicotiana tabacum</i>	придает устойчивость к гербицидам на основе сульфонилмочевины и других ацетолактатсинтазов (ALS)	гвоздика (<i>Dianthus caryophyllus</i>)	19
47	zm-hra	<i>Zea mays</i>	придает устойчивость ацетолактатсинтазе ингибирующую гербицидами, такими как сульфонилмочевина и имидазолинон	кукуруза (<i>Zea mays L.</i>)	4