

ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК РАН  
ОБЩЕСТВО ФИЗИОЛОГОВ РАСТЕНИЙ РОССИИ  
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ ИМ. К.А. ТИМИРЯЗЕВА РАН  
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ И ФОТОСИНТЕЗУ РАН  
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК  
ТЕХНИЧЕСКИЙ КОМИТЕТ № 447 «БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ ПИЩЕВЫХ  
ПРОДУКТОВ, КОРМОВ И МЕТОДЫ ЕЕ КОНТРОЛЯ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ РФ ПО  
ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ  
ОБЩЕНАЦИОНАЛЬНАЯ АССОЦИАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ  
АЛЬЯНС СНГ «ЗА БИОБЕЗОПАСНОСТЬ»

2-й Всероссийский симпозиум  
**«ФИЗИОЛОГИЯ ТРАНСГЕННОГО  
РАСТЕНИЯ И ПРОБЛЕМЫ  
БИОБЕЗОПАСНОСТИ»**

All-Russia Symposium  
**TRANSGENIC PLANTS  
AND BIOSAFETY**

Москва, 22 - 25 октября, 2007 г.

**ПРОГРАММА  
ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ**

МОСКВА 2007

## ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ СИМПОЗИУМА

Кузнецов Вл.В.            Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН            Сопредседатель  
(ИФР РАН)

Бурьянов Я.И.            Филиал ИБХ РАН            Сопредседатель

### Члены оргкомитета

Баранов А.С.            Общественная ассоциация генетической безопасности

Белецкий И.П.            Институт теоретической и экспериментальной  
биофизики РАН

Ванюшин Б.Ф.            МГУ им. М.В. Ломоносова

Вонский М.С.            Институт цитологии РАН

Гервазиева В.Б.            НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН

Пухальский В.А.            Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Климов Е.В.            «Фонд интеграции экологической культуры», Казахстан

Колесникова В.Б.            Альянс СНГ «За биобезопасность»

Кочетов А.В.            Институт цитологии и генетики СО РАН

Куликов А.М.            Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Мельников В.А.            Аппарат Правительства РФ

Монастырский О.А.            ВНИИ биологической защиты растений РАСХН

Новицкий И.Ю.            Московская городская дума

Разбаш О.А.            Российский региональный экологический центр

Романов Г.А.            ИФР РАН

Рудова Т.С.            Технический комитет «Биологическая безопасность пищевых  
продуктов, кормов и методы ее контроля» Федеральной  
службы РФ по техническому регулированию и метрологии,  
снс ИФР РАН

Саяев Р.К.            Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН

Соколов М.С.            НИЦ токсикологии Минздрава РФ

Стебенкова Л.В.            Московская городская дума

Цыдендамбаев В.Д.            ИФР РАН

Чмора С.Н.            ИФР РАН            Ученый секретарь

В рамках Симпозиума рассмотрены проблемы физиологии генетически модифицированных (ГМ, трансгенных) растений и их использования для решения крупных общебиологических проблем; фундаментальные аспекты создания трансгенных растений, медико-биологические аспекты употребления генетически модифицированных продуктов питания, потенциальные и реальные риски от неконтролируемого коммерческого использования ГМ растений, а также современные методы идентификации трансгенов в растениях и продуктах, полученных на их основе. Важное место на симпозиуме уделено рассмотрению международного и российского законодательства по контролю за потоками трансгенных организмов и полученных из них продуктов в глобальном и региональном масштабах. Особое значение в программе симпозиума отведено обсуждению вопросов использования ГМ растений в сельскохозяйственном производстве и связанных с этим биологических рисков для человека и окружающей среды.

Основные задачи в области предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в результате воздействия химических и биологических факторов:

«...обеспечение безопасности продуктов питания и лекарственных препаратов, производимых из генетически измененных материалов, безопасности экологической системы от проникновения чужеродных биологических видов организмов, прогнозирование генетических аспектов биологической безопасности; создание системы государственного контроля за оборотом генетически модифицированных материалов...»

*Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2010 года и дальнейшую перспективу  
(утверждены Президентом РФ 4 декабря 2003 г. № Пр-2194)*

## **ПРОГРАММА СИМПОЗИУМА**

*Все заседания будут проходить в Большом конференц-зале Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (ИФР РАН)  
(г. Москва, Ботаническая ул., д. 35)*

**Понедельник, 22 октября**

10:00-18:00 Регистрация участников в ИФР РАН

**Вторник, 23 октября**

*Председатели:* Бурьянов Я.И., Кузнецов Вл.В.

10:00-10:40 **Открытие Симпозиума, приветствия**

Заседание 1 ***Создание трансгенных растений нового поколения***

10:40-11:10 Бурьянов Я.И., Захарченко Н.С., Рукавцова Е.Б. (Филиал института биоорганической химии РАН)

Трансгенные растения нового поколения: на пути избавления от «генетического мусора».

11:10-11:40 Кучук Н.В. (Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев)

Транспластомные растения: получение и перспективы их использования.

11:40-12:00 Кофе-брейк

Заседание 2 ***Проблемы биобезопасности ГМО и продуктов их переработки для здоровья человека***

*Председатели:* Гервазиева В.Б., В.Д. Цыдендамбаев

12:00-12:20 Кузнецов Вл.В. (ИФР РАН)

Источники научной неопределенности при оценке рисков коммерческого использования ГМО и продуктов их переработки.

12:20-12:50 Александрович С.А., Гервазиева В.Б., Самойликов П.В., Бержец В.М. (ГУ НИИВС им. Мечникова РАМН)

Биохимические и аллергенные свойства натуральной и генетически модифицированной сои.

12:50-13:20 Ермакова И.В. (Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН)

Новые данные о влиянии ГМО на физиологическое состояние и высшую нервную деятельность млекопитающих.

13:20-13:40 Коновалова М.А., Блинов В.А. (Саратовский государственный аграрный университет, Саратов)

Морфологические показатели и особенности спектра ферментов крови мышей, получавших ГМ сою.

13:40-15:00 Обед (Пресс-конференция)

### **Заседание 3 Проблемы экологической безопасности ГМО**

*Председатели:* Соколов М.С., Баранов А.С.

- 15:00-15:30 Соколов М.С., Марченко А.И., Боровик Р.В. (ФГУН Центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов ФМБА)  
Экологические аспекты оценки безопасности производства генно-инженерно-модифицированных растений: методологические подходы и возможные пути решения.
- 15:30-16:00 Баранов А.С. (Институт биологии развития РАН)  
Использование генетически модифицированных организмов и вопросы экологической безопасности.
- 16:00-16:20 Куликов А.М. (Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН)  
Риски использования ГМО и новые методы контроля численности популяций насекомых-вредителей
- 16:20-16:40 Викторов А.Г. (Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН)  
Влияние ВТ-растений на почвенную биоту и плеотропный эффект дельта-эндотоксин-кодирующих генов.
- 16:40-17:00 Негрецкий В.А., Новожилов О.В., Блюм Я.Б. (Институт ботаники НАН Украины, Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев)  
Исследование возможности вертикального переноса трансгенов от ГМ гибридов сахарной свеклы к ее диким родственникам.
- 17:00-17:20 Кофе-брейк
- Заседание 4 ***Диагностика ГМО и законодательная охрана трансгенных сортов растений***
- Председатели:* Романов Г.А., Вонский М.С.
- 17:20-17:50 Вонский М.С., Пономарева Н.В., Крылов А.И. (Институт цитологии РАН, С.-Петербург)  
Диагностика ГМО – от скрининга до количественного анализа.
- 17:50-18:10 Черемных Е.Г. (МГУ Прикладной биотехнологии)  
Новый подход к оценке безопасности пищевых продуктов.
- 18:10-18:40 Роговский Ю.А. (ФГУ «Государственная комиссия Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений», отдел Методики)  
Законодательство Российской Федерации по охране и использованию трансгенных сортов растений и пород животных.

## Среда, 24 октября

### Заседание 5 *Проблемы регулирования потока ГМО и полученных из них продуктов*

*Председатели:* Копейкина В.Б., Монастырский О.А.

- 10:00-10:30 Монастырский О.А. (ВНИИ биологической защиты растений РАСХН, Краснодар)  
Проблемы продовольственной безопасности России после вступления в ВТО.
- 10:30-11:00 Копейкина В.Б. (Экологический клуб "Эремурус"/Альянс СНГ "За биобезопасность")  
Зоны, свободные от ГМО, как феномен и ответ глобального сообщества на распространение трансгенных культур.
- 11:00-11:20 Климов Е.В. (Фонд интеграции экологической культуры, Казахстан)  
Политика, законодательство и практика регулирования ГМО в Казахстане.
- 11:20-11:40 Гетман И.А., Наумкина Е.М., Чижова С.И., Колотовкина Я.Б., Цыдендамбаев В.Д., Кузнецов В.В., Кузнецов Вл.В., Романов Г.А. (ИФР РАН)  
Мониторинг трансгенных компонентов в продуктах питания растительного происхождения, проведенный на основе исследования ДНК
- 11:40-12:00 Кофе-брейк

### Заседание 6 *Физиология и биотехнология трансгенных растений*

*Председатели:* Кучук Н.В., Кузнецов В.В.

- 12:00-12:30 Романов Г.А. (ИФР РАН)  
Этюды о трансгенных растениях: *tempora mutantur, et nos mutamur in illis* (времена меняются и мы меняемся вместе с ними).
- 12:30-12:50 Ильина Е.Н., Егорова И.А., Монахова В.А., Додуева И.Е., Лутова Л.А. (Санкт-Петербургский ГУ)  
Создание и изучение коллекции трансгенных растений редиса, экспрессирующих отдельные гены Т-ДНК агробактерий.
- 12:50-13:10 Пузина Т.И. (Орловский педагогический университет)  
Гормональный статус и физиологические особенности растений картофеля, экспрессирующих Vt-токсин.

13:10-13:30 Кершанская О.И. (Институт биологии и биотехнологии растений, Казахстан)

Физиология трансгенных растений пшеницы и проблемы биобезопасности.

13:30-13:50 Поляков А.В. (ГНУ ВНИИ овощеводства РАСХН)

Трансгенные растения овощных культур: способы получения и перспективы использования.

13:50-14:20 Кофе-брейк

#### Заседание 7 **Физиология и биотехнология трансгенных растений**

*Председатели:* Кузовкина И.Н., Голденкова-Павлова И.В.

14:20-14:50 Кузовкина И.Н., Альтерман И.Е., Вдовитченко М.Ю. (ИФР РАН)

Генетически трансформированные корни растений как потенциальный источник экологически чистого лекарственного сырья.

14:50-15:20 Голденкова-Павлова И.В. (Институт общей генетики РАН)

Новый подход для экспрессии гетерологичных генов в растениях для биотехнологии

15:20-15:40 Ралдугина Г.Н., Кунда М.С., Белоногова М.А. (ИФР РАН)

Нерешенные проблемы технологии создания трансгенных растений на примере родов *Brassica* и *Linum*.

15:40-16:00 Колодяжная Я.С., Коваль В.С., Романова А.В., Титов С.Е., Кочетов А.К. (Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск)

Супрессия активности гена пролиндегидрогеназы повышает неспецифическую устойчивость растений к абиотическим стрессам.

16:00-16:20 Беляев Д.В., Ралдугина Г.Н. (ИФР РАН)

Тканеспецифическая экспрессия трансгена как подход к безопасности трансгенных растений.

16:20-16:40 Дерябин А.Н., Синькевич М.С., Трунова Т.И. (ИФР РАН)

Защитная роль сахаров в условиях окислительного стресса, вызванного гипотермией (на примере трансгенных растений картофеля с измененным углеводным метаболизмом).

16:40-17:00 Кофе-брейк

17:00-18:00 **Общая дискуссия и закрытие Симпозиума**

18:00 **Фуршет**

#### **Четверг, 25 октября**

Отъезд участников.



## **ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ**

## **ДЕЙСТВИЕ ГЕНА *PHUV* ИЗ *Arabidopsis thailana* НА КЛУБНЕОБРАЗОВАНИЕ ТРАНСГЕННОГО КАРТОФЕЛЯ (*Solanum tuberosum* L.) В КУЛЬТУРЕ *in vitro***

Аксенова Н.П., Константинова Т.Н., Сергеева Л.И., Ложникова В.Н.,  
Голяновская С.А., Романов Г.А.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая, 35  
127276. Москва; тел.: (495) 9039334. факс: (495) 9778018  
E-mail: [gar@ippras.ru](mailto:gar@ippras.ru) (Романову Г. А.).

Ранее было показано, что введение гена *PHUV* из арабидопсиса под контролем *35S*-промотора существенно усилило ингибиторный эффект длинного дня на клубнеобразование трансгенного картофеля и, одновременно, увеличило активность гиббереллинов – эндогенных гормональных ингибиторов формирования клубней. Такое ингибиторное влияние суперэкспрессии фитохрома В на инициацию клубней почти полностью снималось добавлением в культуральную среду кинетина.

В представленной работе у нетрансформированных растений Дезире (НТ) и фитохромных трансформантов картофеля (линии Д-5 и Д-12) сопоставлено влияние экзогенных гиббереллина А<sub>3</sub> (ГА<sub>3</sub>) и кинетина на инициацию клубней, на содержание эндогенных цитокининов (зеатина и зеатинрибозид, З+ЗР) и на их соотношение в надземных и подземных органах. Растения выращивали в факторостатной камере на различных фотопериодах и культивировали на среде МС с 5% сахарозы без гормонов, а также при отдельном или совместном внесении ГА<sub>3</sub> и кинетина.

Содержание эндогенных цитокининов по данным иммуноферментного анализа у фитохромных трансформантов было выше на 25-35%, чем у НТ растений, особенно в надземных органах. Добавление ГА<sub>3</sub> в культуральную среду ингибировало клубнеобразование у НТ и Д-12 растений, причем у Д-12 варианта ГА<sub>3</sub> оказал более сильный ингибиторный эффект. ГА<sub>3</sub> вызывал также общее повышение содержания З+ЗР у НТ и Д-12 вариантов. Экзогенный кинетин стимулировал клубнеобразование. Эта стимуляция особенно сильно проявилась у фитохромных трансформантов. Внесение кинетина привело также к резкому, в 2-3 раза, снижению содержания эндогенных цитокининов в надземных побегах и к перераспределению содержания З+ЗР в пользу подземных органов. Кинетин, при его совместном внесении в культуральную среду с ГА<sub>3</sub>, заметно ослабил ингибиторный эффект гиббереллина на клубнеобразование. Это ослабление было выражено сильнее у НТ, чем у Д-12 растений.

Полученные результаты показывают, что эктопическая экспрессия гена *PHUV* из арабидопсиса оказывает существенное влияние на физиологическое взаимодействие цитокининов и гиббереллинов в регуляции клубнеобразования у трансгенных растений картофеля.

Работа поддержана грантом РФФИ 07-04-00585.

## **БИОХИМИЧЕСКИЕ И АЛЛЕРГЕННЫЕ СВОЙСТВА НАТУРАЛЬНОЙ И ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ СОИ**

Александрович С.А., Гервазиева В.Б., Самойликов П.В., Бержец В.М.

ГУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, г. Москва.

Москва, тел: (495)9178651, факс: (495)9172026

E-mail: [vbger@mail.ru](mailto:vbger@mail.ru) (Гервазиева В.Б.), [samoilikov@mail.ru](mailto:samoilikov@mail.ru) (Самойликов П.В.)

В настоящее время соя является одним из источников белка в пищевом рационе человека. В то же время некоторые белки сои являются сильными аллергенами и могут вызывать аллергические реакции. В связи с этим целью работы явилось изучение биохимических и аллергенных свойств экстрактов из соевых бобов (СБ) натуральной и генетически модифицированной (ГМ) сои. Аллергенные экстракты получали из цельных СБ, их оболочек и ядер натуральной и ГМ сои. Биохимические и аллергенные свойства экстрактов СБ исследовали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, иммуноблота и твердофазного ИФА. При электрофоретическом разделении выявлена похожая картина белкового состава аллергенных экстрактов ядра и цельных натуральных СБ и ГМ. Основные белковые фракции из ядер и цельной сои являются низкомолекулярными: от 8,5 кДа до 20 кДа, из которых белковая фракция с м.м. 20 кДа является самой большой и соответствует группе белков ингибиторов Куница (Hog.v1, CMb, BDR). При анализе экстрактов оболочки СБ найдено, что белковая фракция с м.м. 14 кДа, соответствующая соевому профилину (Gly m 3), содержится в натуральных СБ, тогда как белковая фракция с м.м. 34 кДа, которую можно определить как соевый вакуолярный протеин (Gly m Bd 30 k), преобладает в ГМ сое. Методом ИФА было исследовано 220 сывороток крови больных atopическим дерматитом, пищевой аллергией и здоровых людей разного возраста. Частота выявленных IgE-АТ к сое у больных повышалась с возрастом и варьировала от 20% у детей до 1 года до 57,8% у детей подросткового возраста, причем наиболее часто определялись IgE-АТ к аллергену оболочки натуральной сои. К нему же с наибольшей частотой выявлялись IgG-АТ. При исследовании специфичности IgG-АТ в иммуноблоте выявили, что они направлены к широкому спектру белков цельной натуральной и ГМ сои с наибольшей полосой преципитации в белковой фракции с м.м. 30 кДа.

Известно, что в оболочке СБ содержатся белки, гомологичные главному аллергену пыльцы березы (Bet v1), в связи с чем выявленная нами высокая частота определения IgE-АТ к оболочке натуральной сои вполне объяснима с точки зрения перекрестно реагирующих аллергенов. При исследовании сыворотки крови больных с гиперчувствительностью к сое в 81 % случаев обнаружены IgE-АТ к пыльце березы, при этом у 25% пациентов уровень их был высоким. Таким образом, в экстрактах СБ натуральной и ГМ сои выявлены белки с известными аллергенными свойствами, которые могут быть причиной развития аллергических реакций, обусловленных IgE-АТ, и соевой энтеропатии, обусловленной IgG-АТ. Более того, благодаря выраженной гомологии с аллергенами пыльцы березы, продукты, содержащие СБ, могут усиливать сенсибилизацию и обострять аллергические реакции у больных поллинозом.

## ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ОНКОГЕНОВ КАК СПОСОБ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ ФИТОПАТОГЕНОВ

Алексеева В.В.<sup>1</sup>, Рукавцова Е.Б.<sup>1</sup>, Голубчикова Ю.С.<sup>2</sup>, Бурьянов Я.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, пр. Науки, 6, 142290 Пушкино; тел.: (495)9252342, факс: (4967)330527

<sup>2</sup>Уральский государственный университет, ул. Ленина, 51, 620000 Екатеринбург.  
E-mail: [lera@fibkh.serpukhov.su](mailto:lera@fibkh.serpukhov.su) (Алексеевой В.В.), [ruk@fibkh.serpukhov.su](mailto:ruk@fibkh.serpukhov.su) (Рукавцовой Е.Б.)

Заражение растений фитопатогенными почвенными бактериями *Agrobacterium tumefaciens* индуцирует процесс образования опухоли, вызванного встраиванием в растительный геном агробактериальных онкогенов. Наиболее важными среди них считаются гены *ipt* и *iaaM*, ответственные за синтез фитогормонов – цитокинина и ауксина. Получение трансгенных растений, способных вызывать замолкание этих онкогенов, создает предпосылки для получения у растений устойчивости к агробактериям. Применение для этой цели стратегий антисмысловых РНК и РНК-интерференции является достаточно эффективным и безопасным подходом.

В нашей работе были использованы трансгенные растения табака с антисмысловыми копиями агробактериальных генов синтеза цитокининов и ауксинов под контролем одинарного и двойного промоторов CaMV 35S. С помощью скрещивания трансгенных растений с антисмысловыми копиями этих генов (*as-ipt*-растений и *as-iaaM*-растений) созданы двойные трансформанты (*as-ipt::as-iaaM*-растения). Процент гомологии введенных нами генов (ген *ipt* – из pTiBo542, ген *iaaM* – из pTiA6NC) с аналогичными генами плазмиды pTiC58 составляет для генов *ipt* - 88%, для генов *iaaM* - 95%.

При заражении всех форм трансгенных растений с антисмысловыми копиями онкогенов вирулентным штаммом *Agrobacterium tumefaciens* C58 (pTiC58) показано частичное ингибирование экспрессии этих генов. Частичное замолкание генов синтеза цитокининов и ауксинов приводило к изменениям в морфологии и физиологии опухолей. Так, ингибирование гена биосинтеза ауксина изменило гормональный баланс в некоторых опухолевых клетках в сторону преобладания цитокининов, стимулирующих образование побегов. В результате из опухолей, образованных на *as-iaaM*-растениях и двойных трансформантах, формировались побеги. Анализ антисмыслового ингибирования онкогенов в некоторых растениях, полученных из опухолевых тканей, проводили методом РНК-ДНК гибридизации. Обнаружено, что в этих побегах уровень мРНК гена *ipt* снижается меньше, чем уровень мРНК гена *iaaM*. Такой эффект может объясняться большей силой контролирующего этот ген двойного промотора CaMV 35SS, а также более высокой гомологией генов *iaaM*. Аналогичная картина получена при заражении листовых дисков двойных трансформантов вирулентным штаммом *Agrobacterium tumefaciens* A6 (pTiA6). В настоящее время для более эффективного ингибирования опухолеобразования проводятся исследования с использованием стратегии РНК-интерференции.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 06-08-00237.

## ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ РАСТЕНИЙ ОТ ФИТОСТЕРИНОВ КАК ОСНОВА МЕТОДА СЕЛЕКЦИИ УСТОЙЧИВЫХ РАСТЕНИЙ

Андреева Е.А., Богомаз Д.И., Сухоруков В.Н., Ганзен А.В., Лутова Л.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и селекции; 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, тел.: (812)4284009, факс: (812)4287733

E-mail: l\_andreeva@yahoo.com (Андреевой Е.А.)

Поиск новых подходов для селекции растений, устойчивых к болезням, является одним из главных направлений в области генетики и физиологии растений. Особый интерес представляет выявление растительных метаболитов, отсутствие или недостаток которых тормозит развитие возбудителя и предупреждает его размножение. Подобный эффект характерен для стериннов. По литературным данным к числу стерин-зависимых организмов относят виды рода *Phytophthora* (Hendrix, 1964), в частности, возбудителя заболеваний картофеля - патогена *P. infestans*. Для некоторых из видов р. *Phytophthora* описана зависимость от конкретных групп стериннов, однако, закономерности были выявлены в работах на искусственных средах (Marshall et al., 2001). В экспериментах с растениями показано (Khodjaiova et al., 2004), что изменения в соотношении групп стериннов изменяют уровень устойчивости к фитофторозу у растений картофеля и томатов, полученных методами клеточной селекции на устойчивость к полиеновым антибиотикам и ингибиторам биосинтеза стериннов. Однако не была выявлена четкая корреляция между содержанием определенных групп стериннов и устойчивостью. Использование метода клеточной селекции не позволяет получать мутации направленно. Поэтому был выбран метод изменения метаболизма стериннов за счет изменения экспрессии отдельных генов при индукции сайленсинга. Нами получены коллекции агробактериальных штаммов с последовательностями отдельных генов биосинтеза стериннов и трансгенных растений. Проводятся работы по оценке изменения экспрессии генов стеринового метаболизма у полученных растений. Результаты исследования расширят представления о молекулярно-генетических аспектах взаимодействий высших растений и патогенов, и позволят идентифицировать гены, вовлеченные в контроль устойчивости растений к стерин-зависимым патогенам.

Работа поддержана грантами РФФИ №06-04-49782а, №06-04-08354, Грант Президента РФ НШ-7623.2006.4, CRDF-Минобрнауки ST-012.

Hendrix, J. W., Science.- 1964.-V.144.-pp.1028-1029.

Marshall J.A. et al. Phytochemistry.- 2001.-V. 58(3).- pp. 423-428.

Khodjaiova L. et al. Proc. 11-th Intern. Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. Eds. Tikhonovich I.A., Lugtenberg B.J.J., Provorov N.A. IS-MPMI. St.-Petersburg, Russia, 2004. P. 166-168.

## **ИЗУЧЕНИЕ ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ТАБАКА, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ГЕНОМ $\Delta 9$ -АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ ДЕСАТУРАЗЫ ИЗ *Synechococcus vulcanus***

Антипина О.В.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва,  
Ботаническая ул. 35, тел.: (495)9039326, факс: (495)9778018

E-mail: trunova@ippras.ru (Антипиной О.В.)

В последнее время изменение климата на планете сопровождается усиливающейся нестабильностью, выражающейся, в том числе, и в резких перепадах температуры. В связи с этим возрастает актуальность проблемы устойчивости растений к гипотермии, поскольку продуктивность многих сельскохозяйственных культур связана с формированием этого свойства. Известно, что основной причиной повреждения и гибели теплолюбивых растений при пониженных температурах является снижение степени ненасыщенности жирных кислот и, как результат этого, неспособность предотвратить фазовый переход липидов. Цель работы состояла в изучении роли  $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы в формировании устойчивости теплолюбивых растений табака к гипотермии. В работе были использованы растения табака, трансформированные геном *desC*  $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы из термофильной цианобактерии *Synechococcus vulcanus*. Растения культивировали на агаризованной среде по прописи Мурасиге и Скуга, дополненной феруловой кислотой и антибиотиками, при 22°C и 16-ч фотопериоде. Холодостойкость трансформированных и контрольных растений оценивалась по индексу повреждения листьев, который определяли путем измерения выхода электролитов из поврежденной холодом ткани в водную фазу. Контрольные растения были более чувствительны к холоду, чем растения экспрессирующие ген ацил-липидной десатуразы. При 2°C (24 ч) коэффициент повреждения тканей контрольных растений достигал 50%, тогда как у трансформантов с геном ацил-липидной десатуразы не более 22%. Для определения ростовых характеристик исследуемых растений, семена контрольных и трансформированных растений табака высаживались на питательную среду и выдерживались трое суток при температуре 4°C, после чего их отращивали в оптимальных для роста условиях (20°C). Трансформированные геном *desC* растения табака обнаруживали более интенсивный рост семядолей и гипокотилы по сравнению с контрольными. Полученные данные продемонстрировали роль  $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы в формировании устойчивости трансформированных растений табака к низким положительным температурам.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 06-04-48291.

**COLD TOLERANCE AND FATTY ACID COMPOSITION IN LIPID OF TOBACCO PLANTS TRANSFORMED BY THE GENE  $\Delta 9$ -ACYL-LIPID DESATURASE FROM *Synechococcus vulcanus***

Antipina O.V., Merkulova N.V.

Institute of plant physiology Russian Academy of Science, Botanicheskaya street 35, 127276 Moscow, ph.:(495)9039326, fax: (495)9778018

E-mail:trunova@ippras.ru

It is known, that lipid content of membranes reacts to downturn of temperature very quickly. The attitude of unsaturated fatty acids to sated usually first of all varies. Ability of cells to adapt for a cold in many respects is defined by their opportunity to synthesize unsaturated fatty acids. Fatty acid desaturases are enzymes which introduce double bonds into fatty acids and consequently stability of membranes to action of low temperature promote. In this connection we used the plants of tobacco transformed by a gene  $\Delta 9$ -acyl-lipid desaturase from thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. Cold tolerance of the transformed plants was estimated on an index of damage of leaves which defined by measurement of an exit electrolytes from the fabric damaged by a cold in a water phase. Control plants were more sensitive to a cold, than plants expressed a gene acyl-lipid desaturase. At temperature zero of degrees the index of damage achieved 90 percents in the control and only 50 percents in the transformed plants. Transformed plants had higher lipid contents in comparison with the control. The index of fatty acids unsaturation was higher in transformed plants by 25 percents. The detailed analysis of structure of fatty acids shows, that a level of the main saturated fatty acids 16:0 and 18:0, has considerably decreased, whereas the level di- and three-unsaturated acids has increased. These results show, that desaturase from thermophilic cyanobacterium in leaves of tobacco actively expressed and cause significant changes in membranes concerning increase of a degree of unsaturation of fatty acids that results in increase of cold tolerance of the transformed plants.

This work was partially supported by grant from Russian Foundation for Basic Research 06-04-48291.

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ТАБАКА (*Nicotiana tabacum* L.), ПРИВОДЯЩАЯ К ДЛИТЕЛЬНОМУ ЦВЕТЕНИЮ

Баврина Т.В., Миляева Э.Л., Романов Г.А.

Институт физиологии растений им.К.А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая 35, 127276 Москва; тел.(495)9039361, E-mail: [gar@ippras.ru](mailto:gar@ippras.ru)

Данное исследование проведено на растениях табака (*Nicotiana tabacum* L.) двух линий: на инсерционном мутанте *tpd1*, полученным в результате агробактериальной трансформации в Институте физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ, и на исходной форме табака сорта Самсун. Трансформирующий вектор был создан на базе плазмиды *BIN 19* и содержал, среди прочих последовательностей, ген *nptII* под контролем 35S*CaMV* промотора. Эти две линии фенотипически различались, т.к. мутант *tpd1* обладал сверхпродолжительным цветением. Как показали наши исследования, продолжительное цветение связано с неспособностью мутанта *tpd1* образовывать семена при самоопылении, что в свою очередь вызвано полной стерильностью его пыльцы. Растения трансгенной формы могли образовывать семена (в меньшем количестве) только в случае опыления их рылец пыльцой исходной (нетрансгенной) формы. Из части таких семян в течение трех поколений вновь образовывались стерильные растения. Попытки преодолеть стерильность пыльцы с помощью обработок гормонами: ГК и ИУК,- не дали положительных результатов. В опытах *in situ* с взаимными прививками трансгенных и нетрансгенных растений после их переопылений был проведен учет семенной продуктивности. Обнаружено, что у растений исходной формы, привитых на трансгенные растения, семенная продуктивность была снижена за счет уменьшения фертильности пыльцы и фертильности пестика. В противоположность этому у трансгенных растений, привитых на исходные растения, семенная продуктивность увеличивалась за счет стимуляции фертильности только пестиков. Стерильность пыльцы трансгенных растений в этих прививках полностью сохранялась.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что *tpd1*-фенотип передается по крайней мере в трех поколениях, т.е. обусловлен генетическим изменением доминантного гена *TPDI*, необходимого для нормального развития пыльцевых зерен.



## ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСФОРМАНТОВ КАРТОФЕЛЯ С ГЕНОМ БИОСИНТЕЗА АУКСИНА *tms I*

Баврина Т.В.<sup>1</sup>, Юрьева Н.О.<sup>1</sup>, Наумкина Е.М.<sup>1</sup>, Махачкова И.<sup>2</sup>, Малбек Ю.<sup>2</sup>, Травничкова А.<sup>2</sup>, Добрев П.<sup>2</sup>, Романов Г.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276 Москва тел. (495)903-93-61, факс (495)977-80-18, E-mail [gar@ippras.ru](mailto:gar@ippras.ru)

<sup>2</sup> Институт экспериментальной ботаники Чешской Академии наук, Прага

Ауксин является одним из важнейших гормонов растений. Обладая плеiotропным действием, этот фитогормон участвует в управлении ростом, развитием, формированием запасующих органов и др. Несмотря на многочисленные данные, полученные в опытах с экзогенной обработкой растений ИУК, особенности ее действия остаются до конца не раскрытыми. Для выяснения этого вопроса все чаще используют трансгенные растения с измененным гормональным статусом. Однако к настоящему времени отсутствуют данные по трансгенным линиям ряда хозяйственно ценных растений, в том числе картофеля, экспрессирующих гены биосинтеза ауксина.

Нами получена новая трансгенная форма картофеля *Solanum tuberosum* L. сорта Дезире с повышенным содержанием свободного ауксина. Агробактериальную трансформацию клубневых эксплантов проводили с применением бинарного вектора, несущего целевой ген биосинтеза предшественника ауксина, *tms I*, под контролем 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты, и селективный ген *npt II* под контролем pos-промотора. Селекцию растений проводили на среде с канамицином и цефотаксимом. Присутствие трансгенов в растениях устанавливали методом полимеразной цепной реакции с использованием праймеров для маркерного и целевого генов, а также для других вспомогательных элементов конструкции ДНК. В результате отобрано восемь независимых клонов, устойчивых к канамицину и несущих оба трансгена: *npt II* и *tms I*. В надземной части трансгенных растений было обнаружено повышенное (на 20-60%) содержание свободной ИУК по сравнению с исходной формой. Это свидетельствует о способности растений картофеля превращать индолацетамид (ИАМ), синтезируемый с участием трансгена *tms I*, в ИУК при помощи собственных ферментов с амидогидролазной активностью.

Полученные трансгенные линии при выращивании в культуре проявляли характерные фенотипические особенности (вегетативный рост, корнеобразование, каллусогенез, клубнеобразование) в зависимости от уровня накопления ИУК. При умеренном увеличении (на 20%) содержания ИУК наблюдалось ускорение образования корневой системы, увеличение биомассы листьев и стеблей. При значительном (до 60%) повышении содержания ауксина у трансформантов, наоборот, отмечено уменьшение надземной и подземной биомассы. Эти растения были склонны к опухолообразованию в виде каллусной ткани. Клубни растений первой группы были значительно крупнее, чем клубни растений второй группы. Результаты свидетельствуют о том, что умеренное увеличение содержания ауксина при трансгеннозе улучшает, а значительное – наоборот, ухудшает ростовые и продукционные характеристики растений картофеля.

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ РАПСА (*Brassica napus*) ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ЭКСПРЕССИИ ЧУЖЕРОДНЫХ БЕЛКОВ НА СИМБИОТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Баймиев А.Х., Князев А.В., Вершинина З.Р.

Институт биохимии и генетики УНЦ РАН; Проспект Октября 71, 450054 Уфа, тел.: (347)2356088, факс: (347)2356088

E-mail: zilyaver@mail.ru (Вершининой З.Р.)

Недостаточная обеспеченность растений соединениями азота является одним из основных препятствий на пути повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. Создание небобовых трансгенных растений, вступающих в симбиоз с ризобиями, позволит в какой-то мере решить эту проблему. Одним из критических факторов на пути формирования бобово-ризобиального симбиоза являются лектины, которые обеспечивают узнавание растением-хозяином специфической для него бактерии. Эксперименты с трансгенными растениями, несущими различные гены лектинов бобовых, позволяют оценивать роль этих белков в симбиозе и расширять круг микросимбионтов растения.

В последние годы за рубежом рапсовое масло все шире используется для производства биотоплива. В перспективе и в России этот ресурсозобновляемый и экологически чистый источник энергии должен занять соответствующее место в общем объеме потребляемого моторного топлива. В ряде статей описывается образование клубеньков ризобиями при обработке целлюлазой и пектолиазой корневых волосков проростков рапса. Эти клубеньки обладали незначительной нитрогеназной активностью и были морфологически и структурно подобны клубенькам бобовых. Следовательно, если обеспечить специфическое взаимодействие ризобий с трансгенными по гену лектина корневыми волосками рапса, то можно добиться получения настоящих клубеньков без разрушения корневых волосков.

Полноразмерный ген лектина гороха посевного (*Pisum sativum*) был клонирован под управлением 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты в составе Т-ДНК вектора pCAMBIA 1304. Для трансформации рапса сорта Hanna была использована бинарная векторная система. Плазмида pCAMBIA 1304 была перенесена из *E. coli* методом электропорации в клетки *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGLO. Трансформацию рапса проводили используя методику, предложенную Moloney (1989), но с измененным гормональным составом сред. В качестве селективного антибиотика применяли гигромицин. В качестве эксплантов использовали семядоли 5-дневных проростков, растущих *in vitro*.

Трансгенность полученных растений была подтверждена активностью гена  $\beta$ -D-глюкоуридазы, а также ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих участок гена лектина гороха.

В дальнейшем корни трансгенных растений предполагается обработать несколькими видами ризобий гороха для исследования влияния экспрессии чужеродных белков на симбиотические реакции.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ И ВОПРОСЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

Баранов А.С.

Институт биологии развития РАН, ул. Вавилова 26, 119991 Москва, Россия

Тел/факс: (495) 744 5609, E-mail: asbaranoff@oagb.ru? asbaranoff@yandex.ru

Национальные интересы России в экологической сфере заключаются в сохранении и оздоровлении окружающей природной среды. Мировой опыт коммерческого использования генетически модифицированных сортов растений в агропромышленном производстве - этому полностью противоречит. Основываясь на опыте отечественных и зарубежных исследований, можно выделить основные экологические риски, которые превратились из потенциальных в реальные:

**1. Неконтролируемое распространение («горизонтальный перенос») чужеродных генов** в популяции культурных, традиционных сортов и дикорастущих форм растений, приведет к нарушению равновесия в биоценозах, а также к засорению традиционных сортов трансгенными вставками и, в дальнейшем, к их полному уничтожению. Избежать переопыления – невозможно! Речь может идти только о сведении его до минимально допустимого порога. **2. Негативное влияние токсинов вырабатываемых ГМ-растениями на жизнедеятельность почвенных насекомых и микроорганизмов.** Биоразнообразие почвенных живых организмов, при возделывании трансгенных сортов растений, на протяжении одного сезона уменьшается в три раза и приводит к деградации плодородного почвенного покрова. Оставленные на полях фрагменты ГМ растений не разлагаются на протяжении нескольких лет. **3. Появления суперсорняков** в результате развития устойчивости у сорных растений к гербицидам. **4. Быстрый отбор насекомых на устойчивость к энтомопатогенным токсинам,** продуцируемым трансгенными растениями. Уже некоторые с/х вредители (например, бабочка, *Plitela xylyostella*) образовали популяции невосприимчивых к Bt-токсину. **5. У насекомых происходит изменение типа питания** и они переходят на другие виды растений, что является прямым разрушением эволюционно сложившихся отношений в агроценозе и трофических связей. Происходит замена одних вредителей на другие. **6. Образования новых вирулентных штаммов** в результате генетической рекомбинации между трансгенами и генами природных вирусов. **7. Увеличение расхода химикатов и обострение проблемы химического загрязнения окружающей среды.** 8-летние исследования в США установили зависимость между выращиванием ГМ-сортов и использованием пестицидов. За исследуемый период времени возросла продажа химикатов активно используемых при выращивании устойчивых к гербицидам сортов. Полученные данные опровергают распространенное мнение о том, что использование ГМ-сортов снижает применение пестицидов. Таким образом, современная фактология убедительно доказывает существование экологических рисков при использовании ГМО. Эти риски связаны прежде всего, с появлением суперсорняков, формированием новых, устойчивых к ядам, популяций насекомых, загрязнением и полной (безвозвратной) потери традиционных сортов важнейших сельхозкультур, а также с возрастанием загрязнения окружающей среды ядовитыми для человека химикатами.

## **ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСГЕНА КАК ПОДХОД К БИОБЕЗОПАСНОСТИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

Беляев Д. В.,<sup>1,2</sup> Ралдугина Г. Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая, 35, 127276 Москва; тел.: (495)9039334, факс: (495)9778018

<sup>2</sup>Московский Физико-технический институт, Институтский пер. 9, 141700 Долгопрудный Московской обл., тел. (495)4088672, факс (495)4085677

E-mail: bdv@ippras.ru (Беляеву Д. В.)

Во многих случаях, целью создания трансгенных растений является придание им определённых признаков, проявляющихся в определённых тканях или органах. Использование конститутивных промоторов часто позволяет достичь нужного эффекта, например, устойчивости к гербицидам, однако, например, экспрессия гена биосинтеза этилена в томатах или гена, ответственного за опадание плодов, необходимо должна быть тканеспецифичной. При борьбе с вредителями растений, подавляющими рост вредителя, трансген желателен в ткани или органе, атакуемом вредителем, однако, его присутствие в съедобных частях растения часто не является необходимым и может усложнить выход трансгенного сорта на рынок.

Ранее, нами был клонирован тканеспецифичный промотор гена металлотионеина арахиса MT 1 (POD), экспрессирующегося в кожуре, но не в семенах арахиса. Этот тканеспецифичный промотор предполагается использовать для экспрессии антигрибных белков или пептидов, подавляющих рост гриба *Aspergillus flavus* на плоде арахиса. Продукт целевого гена экспрессировался бы только в кожуре арахиса и подавлял бы рост гриба, в то время как семена, то есть пищевой продукт, не содержали бы чужеродных белков. С целью выявления специфичности промотора нами была создана конструкция для экспрессии репортерного гена  $\beta$ -глюкуронидазы под контролем данного промотора. Однако трансформация арахиса трудоёмка и занимает около двух лет, поэтому конструкция была сперва использована в модельных системах – протопластах, выделенных из листьев табака, которые были транзистентно трансформированы путём инкубации с PEG, а также на трансгенных растениях табака, полученных с помощью агробактериальной трансформации. Результаты оказались неожиданными – промотор работал в протопластах, однако, у трансгенных растений активность бета-глюкуронидазы наблюдали только в пыльцевых зёрнах, причем как в зрелой, так и в развивающейся пыльце. В других тканях растений табака стабильная экспрессия гена  $\beta$ -глюкуронидазы, стоящего под промотором POD не была обнаружена, т.е. экспрессия была тканеспецифичной. Для проверки специфичности промотора POD для кожуры арахиса, мы планируем получение арахиса, содержащего репортерный ген под контролем этого промотора. Кассета с репортером под контролем этого промотора также может быть использована для быстрой проверки наследования трансгена в первичных трансформантах и для анализа числа копий трансгена.

## СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЛИЯНИЯ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА НА ПЕРВИЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ ЦИТОКИНИНА У ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЙ АРАБИДОПСИСА, ДЕФЕКТНЫХ ПО ДВУМ ИЗ ТРЕХ РЕЦЕПТОРОВ ЦИТОКИНИНОВ

Болякина Ю.П., Куликова В.В., Ломин С.Н., Романов Г.А.  
Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, ул. Ботаническая 35,  
127276 Москва, тел. (495)977-94-09, факс (495)977-80-18,

E-mail: [gar@ippras.ru](mailto:gar@ippras.ru)

Диметилсульфоксид (DMSO) – один из известных растворителей, широко используемый в биологии и химии. DMSO может воздействовать на биологические мембраны, способствуя их повышенной проницаемости. Мы изучали влияние DMSO на экспрессию промотора гена первичного ответа на цитокинин *ARR5*, соединенного с репортерным геном *GUS*, в трансгенном арабидопсисе (Romanov et al., FEBS Letters, 2002). Эксперименты на проростках показали, что DMSO влияет на первичный эффект цитокининов, и это влияние зависит от концентрации растворителя. Так, DMSO в концентрации 2-7% усиливал активность цитокинина в 2-3 раза. Чтобы выяснить, зависит ли эффект DMSO от типа рецептора цитокинина, исследовали влияние этого растворителя при использовании клонов трансгенного арабидопсиса, экспрессирующих лишь один из трех рецепторов цитокинина (Riefler et al., 2005). Опыты проводили на 3-4-дневных проростках двойных инсерционных мутантов арабидопсиса, экспрессирующих гены *CRE1/AHK4*, *AHK3* или *AHK2* рецепторов, а также репортерный трансген *ARR5::GUS*. Количественная оценка экспрессии гена *GUS* показала, что двойные мутанты различаются в их ответе на присутствие DMSO. У *AHK3*-экспрессирующего мутанта эффект цитокининов резко усиливался в присутствии DMSO, у *AHK2*-экспрессирующего мутанта DMSO был менее эффективен, а у мутанта, экспрессирующего лишь *CRE1/AHK4* рецептор, реакция на DMSO практически не проявлялась. Таким образом, эксперименты продемонстрировали специфику действия DMSO в зависимости от типа рецептора цитокинина. Параллельно с количественным анализом проведено гистохимическое окрашивание трансгенных проростков на *GUS* активность. Проростки двойных мутантов арабидопсиса выращивали на воде и инкубировали в течение 5 часов на растворах с BA (5 мМ), с DMSO (4%), или одновременно с DMSO и BA. В качестве отрицательного контроля использовали проростки, выращенные на воде. Для гистохимии использовали материал в свежем нефиксированном состоянии, что позволило провести детальный анализ активности трансгенной конструкции *ARR5::GUS* в разных органах проростка *in planta*. Наблюдение вели с помощью светового микроскопа Amplival (Carl Zeiss Jena), оборудованного специальной видеокамерой 04154–6 VEC-335. Полученные результаты гистохимического анализа качественно подтвердили количественные различия между разными линиями рецепторных мутантов по чувствительности к DMSO. Кроме того, выявлены более тонкие различия между линиями по паттерну *GUS*-окрашивания в присутствии и в отсутствие DMSO.

Работа поддержана грантами РФФИ 07-04-00331 и 07-04-91211-ЯФ

## ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ: НА ПУТИ ИЗБАВЛЕНИЯ ОТ “ГЕНЕТИЧЕСКОГО МУСОРА”

Бурьянов Я.И., Захарченко Н.С., Рукавцова Е.Б.

Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; пр. Науки 6, 142290 Пушкино Московская обл; тел.: (495)9252342, факс: (4967)330527

E-mail: buryanov@fibkh.serpukhov.su

Рассмотрены проблемы биологической безопасности современного поколения коммерческих трансгенных растений. Особое внимание уделено преодолению недостатков существующих методов отбора трансформированных регенерантов растений, связанных с переносом в их геном в дальнейшем бесполезных селективных маркерных генов устойчивости к антибиотикам и гербицидам и с риском неконтролируемой передачи их другим растениям и организмам. Рассмотрены существующие подходы получения трансгенных растений без традиционных селективных маркерных генов. Представлены данные разработки авторами приемов получения безмаркерных генетически модифицированных растений.

Сконструированы плазмиды pSSM и pBM с ori плазмиды широкого круга хозяев RK2 для использования в качестве векторов в агробактериальной бинарной системе генетической трансформации растений. Плазмиды содержат полилинкер с несколькими сайтами для клонирования и последовательности LB и RB агробактериальной T-ДНК, необходимые для интеграции целевой ДНК в растительный геном. Плазида pSSM содержит двойной промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV 35SS). Плазмиды лишены селективных генов устойчивости к антибиотикам и гербицидам, используемых для отбора растений-трансформантов.

На основе этих специализированных векторов получены рекомбинантные плазмиды трех типов, содержащие: 1) синтетический ген, кодирующий зрелую форму антимикробного пептида цекропина P1 млекопитающих (*cecP1*) под контролем одинарного промотора CaMV 35S; 2) синтетический ген *HBsAg*, кодирующий поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs-антиген) под контролем двойного промотора CaMV 35SS; 3) антисмысловую форму гена *hmg1*, кодирующего 3-окси-3-метилглутарил-КоА-редуктазу, ключевой фермент изопреноидного синтеза. Снижение экспрессии гена *hmg1* с помощью стратегии РНК-интерференции может влиять у растений на модификацию метаболизма изопреноидных соединений, жизненно необходимых для грибов-фитопатогенов.

Эта плазмиды перенесены методом электропорации в штамм *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (pAL4404), которым трансформированы растения картофеля и табака, и с помощью разработанных в настоящей работе методов среди регенерированных проростков отобраны трансформанты. В качестве эксплантов для агробактериальной трансформации использовали сегменты листьев картофеля и табака.

Прямой отбор трансформантов растений, содержащих ген цекропина P1, проводили по устойчивости трансгенных проростков к некоторым

фитопатогенным бактериям. Отбор трансформантов возможен также по образованию на агаризованной среде зоны отсутствия бактериального роста вокруг регенерантов. Таким образом, в качестве селективного и скринингового маркера использован целевой ген, выполняющий функцию защиты растений против микробных патогенов.

Для отбора трансгенных растений с геном *HBsAg* использовали метод иммуноферментного анализа, позволяющего проводить скрининг трансформированных регенерантов по развитию специфического окрашивания в иммунной реакции их клеточных экстрактов с антителами к HBs-антигену. Этот весьма чувствительный метод позволяет определять в экстрактах трансгенных растений HBs-антиген в концентрации 0,5 нг/мл. В наших работах получены трансгенные линии картофеля и табака, синтезирующие HBs-антиген на уровне 0,02-0,03% от общего белка, соответствующим его содержанию около 1мкг/г сырого веса растений. Это позволяет детектировать присутствие HBs-антигена в экстрактах трансгенных растений, разбавленных до 2000 раз экстрактами нетрансгенных растений. В выборке из 2000 регенерантов, первоначально разбитой на 40 групп по 50 проростков, отбирали приблизительно равные по весу экспланты каждого растения, которые объединяли, разрушали и определяли в их экстрактах присутствие HBs-антигена. Дальнейшее дробление каждой группы по принципу "поиска фальшивой монеты" делает возможным нахождение трансформантов, синтезирующих HBs-антиген. В проведенных экспериментах количество обнаруженных таким способом трансформантов составило 8 для картофеля и 36 для табака.

С помощью метода полимеразной цепной реакции у полученных регенерантов соответствующих трансформированных растений картофеля и табака показано наличие гена антимикробного пептида цекропина P1 и гена поверхностного антигена вируса гепатита В.

В исследованиях авторов настоящей работы впервые были получены данные о влиянии антисмысловой формы гена *hmg1* на модификацию состава стероидов, мужскую стерильность и изменение окраски цветков растений семейства *Solanaceae*. Таким образом, эти фенотипические эффекты антисмысловой формы гена *hmg1* можно использовать в биологически безопасных технологиях получения трансгенных растений

В дальнейшем предполагается сравнительный анализ физиолого-биохимических показателей полученных безмаркерных трансгенных растений и растений, содержащих исследованные целевые гены вместе с традиционными селективными маркерами.

Сделан вывод о принципиальной практической возможности получения безмаркерных трансгенных растений.

Работа поддержана грантами Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека» и РФФИ № 07-04-00235 и № 07-04-12140.

## ВЛИЯНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА ЭКСПРЕССИЮ АУКСИН-РЕПОРТЕРНОГО ТРАНСГЕНА DR5::*GUS*

Вершинкин Д.А., Романов Г.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая 35, 127227, Москва, тел.: (495)9779409, факс: (495)9778018, E-mail: [gar@ippras.ru](mailto:gar@ippras.ru)

Было показано, что под действием ауксина в растениях образуются свободные радикалы, такие, супероксид ( $O_2^-$ ) и гидроксил радикал ( $HO^\cdot$ ) (Schopfer et al., 2002). Однако оставалось неясным, участвуют ли они в трансдукции ауксинового сигнала или они задействованы на более поздних этапах.

Мы изучали влияние этих свободных радикалов на экспрессию *in planta* трансгенной ауксин-зависимой генетической конструкции Dr5::*GUS*, которая была создана на основе промотора гена первичного ответа на ауксин. Опыты проводили на 3-4-дневных проростках трансгенного арабидопсиса, при короткой (4 часа) экспозиции экспериментов. Индукторы и ингибиторы вносили в раствор, в котором инкубировали проростки. Влияние на экспрессию данных генетических конструкций определяли количественно по активности *GUS in vitro* флюорометрическим методом. Нами было изучено влияние активных форм кислорода: супероксида, гидроксил-радикала, пероксида водорода и пероксинитрита, - на экспрессию Dr5::*GUS*. Для получения супероксид-радикала использовали систему на основе феназинметасульфата. В качестве альтернативы был использован метилвиологен, который способен восстанавливаться гем-содержащими ферментами. Гидроксил-радикал получали с помощью реактива Фентона, а пероксинитрит - с помощью реакции нитрита и пероксида водорода в кислой среде.

Было показано, что только супероксид-радикал достоверно индуцировал транскрипцию этого репортерного трансгена (на 100-147%). Ни пероксинитрит, ни гидроксил-радикал не индуцировали Dr5::*GUS* и, наоборот, подавляли эффект ауксина на 48–58% и 34–62%, соответственно. Пероксид водорода вносили в раствор до конечной концентрации от 0.1 до 10 мМ, в качестве альтернативы использовали систему, генерирующую пероксид водорода на основе глюкозооксидазы. Пероксид водорода сам по себе не оказал заметного эффекта. В то же время система с глюкозооксидазой вызывала сильное ингибирование активности *GUS* как в контроле (от 38% до 95% в зависимости от концентрации фермента), так и в вариантах с ауксином (от 74 до 92 %). Дополнительно был поставлен ряд опытов со скевенджерами свободных радикалов и ингибитором НАД(Ф)Н-оксидазы. Было показано, что скевенджер супероксида  $CuCl_2$  подавлял эффект ауксина на экспрессию Dr5::*GUS* на 35–40%, а скевенджеры пероксида водорода KJ и пероксинитрита тиомочевина усиливали эффект ауксина на 72% и 62%, соответственно. Ингибитор НАД(Ф)Н-оксидазы  $ZnCl_2$  подавлял эффект ауксина на 24–54%.

Таким образом, если суммировать наши и литературные данные, можно предполагать, что супероксид принимает участие в ответе клетки на ауксин. Судя по влиянию супероксида на экспрессию гена первичного ответа, не исключено участие супероксида во внутриклеточной трансдукции ауксинового сигнала.



## ВЛИЯНИЕ ТИОЛОВ НА ЭКСПРЕССИЮ АУКСИН-ЗАВИСИМОЙ ТРАНСГЕННОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ DR5::*GUS*.

Вершинкин Д.А., Романов Г.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая 35, 127227, Москва, тел.: (495)9779409, факс: (495)9778018, E-mail [gar@ippras.ru](mailto:gar@ippras.ru)

В литературе приводится много данных о быстром изменении пула тиолов – низкомолекулярных антиоксидантов растительной клетки – под действием ауксина (Chueh et al., 1997). Но было неясно, связано ли это с трансдукцией ауксинового сигнала или представляет собой косвенные последствия действия ауксина.

Нами было изучено влияние этих низкомолекулярных антиоксидантов и их производных на экспрессию *in planta* ауксин-зависимой генетической конструкции Dr5::*GUS*, которая была создана на основе промотора гена первичного ответа на ауксин. Опыты проводили на 3-4-дневных проростках трансгенного арабидопсиса, при короткой (4 часа) экспозиции экспериментов. Индукторы и ингибиторы вносили в раствор, в котором инкубировали проростки. Влияние на экспрессию данных генетических конструкций определяли количественно по активности *GUS in vitro* флуорометрическим методом. Было показано что в концентрациях 0.1 – 1 мМ тиолы (L-цистеин, глутатион) имитировали эффект ауксина на экспрессию данной генетической конструкции, усиливая ее экспрессию в 2-4 раза. В то же время при совместном применении тиолов и ауксина, они подавляли его эффект на экспрессию на 30-47%. Дитиотреитол сам по себе не усиливал экспрессию, но (в концентрации 1 мМ) усиливал эффект ауксина на 44%.

L-цистин и окисленная форма глутатиона в концентрации 1 мМ усиливали эффект ауксина на 17 % и 143-154%, соответственно.

Также были изучено действие аскорбата в концентрации 1 мМ, в которой он не оказал заметного эффекта на экспрессию Dr5::*GUS*.

Было показано, что хлормеркурибензоат, связывающий (в концентрации от 0.01 до 1 мМ) тиольные группы, а также сульфит натрия, соединение, разрывающее дисульфидные мостики (в концентрации от 0.1 до 1 мМ) подавляли в зависимости от концентрации эффект ауксина на 28–90% и 22–57%, соответственно.

Эти результаты показывают, что изменение уровня тиольного пула оказывает заметное влияние на внутриклеточный сигналинг ауксинов.

## РОЛЬ РАЗНЫХ ФОРМ ОКСИДА АЗОТА В ДЕЙСТВИИ АУКСИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ DR5::GUS И ATFER1::GUS

Вершинкин Д.А., Романов Г.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая 35,127227, Москва, тел.: (495)9779409, факс: (495)9778018, E-mail: [gar@ippras.ru](mailto:gar@ippras.ru)

Одной из актуальных проблем физиологии растений является выяснение механизмов трансдукции гормональных сигналов. В последние годы установлено участие свободных радикалов, таких как разные формы оксида азота ( $\text{NO}^-$  и  $\text{NO}^+$ ) в передаче сигналов у эукариот и прокариот. В частности, было показано, что оксид азота ( $\text{NO}$ ) способен имитировать эффекты ауксина на деление и растяжение клеток, ризогенез ([Pagnussat et al., 2002, 2004](#), [Correa-Aragunde et al., 2006](#)). Однако оставалось неясным, участвует ли оксид азота в трансдукции ауксинового сигнала или вне этого процесса.

Нами было показано, что ауксин вызывал быстрое образование оксида азота в 3-4 дневных проростках арабидопсиса, что позволило предположить прямое влияние ауксина на  $\text{NO}$ -генерирующие ферменты.

Было изучено влияние разных форм оксида азота на экспрессию *in planta* ауксин-зависимой генетической конструкции Dr5::GUS, которая была создана на основе промотора гена первичного ответа на ауксин. Дополнительным объектом исследования являлась  $\text{NO}$ -зависимая генетическая конструкция Atfer1::GUS, которая была создана на основе промотора гена первичного ответа на оксид азота Atfer1. Опыты проводили на 3-4-дневных проростках трансгенного арабидопсиса, при короткой (4 ч) экспозиции экспериментов. Индукторы и ингибиторы вносили в раствор, в котором инкубировали проростки. Влияние на экспрессию данных генетических конструкций, определяли количественно по активности GUS *in vitro* флуорометрическим методом. Показано, что  $\text{NO}$ -доноры нитрозониум катион ( $\text{NO}^+$ ) и радикальной формы оксида азота ( $\text{NO}^-$ ) нитропруссид натрия (SNP), нитрозоцистеин, нитрозоглутатион, динитрозильное производное DTT ( $\text{DTT}(\text{NO})_2$ ) и NOR-3 усиливали экспрессию ауксин-зависимого генетической конструкции Dr5::GUS в зависимости от соединения 1,3-4 раза. Для повышения проницаемости использовали Triton X100 в концентрации 0,1%, это привело к усилению эффекта нитрозотиолов, в особенности короткоживущего донора оксида азота  $\text{DTT}(\text{NO})_2$ , активность которого возросла в 3,6-4 раза.

Донор нитроксил аниона ( $\text{NO}^-$ ) моонитрозильное производное DTT ( $\text{DTT}(\text{NO})$ ) ингибировал эффект ауксина на 65%, этот эффект снимался SNP.

Конкурентный ингибитор  $\text{NO}$ -синтазы L-NNA и скевенджеры (поглотители) оксида азота: сРТИО и гидроксикобаламин,- подавляли эффект ауксина на экспрессию Dr5::GUS на 83% и 56%, соответственно. Эти эффекты ингибирования в разной степени снимались с помощью SNP.

Ауксин в свою очередь усиливал экспрессию  $\text{NO}$ -зависимого промотора Atfer1 в 2,7-6 раз. Ингибитор  $\text{NO}$ -синтазы L-NNA подавлял этот эффект ауксина.

Таким образом, судя по влиянию оксида азота на экспрессию генов первичного ответа, не исключено участие отдельных форм  $\text{NO}$  во внутриклеточной трансдукции ауксинового сигнала.

## ВЛИЯНИЕ Vt-РАСТЕНИЙ НА ПОЧВЕННУЮ БИОТУ И ПЛЕЙОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТ $\delta$ -ЭНДОТОКСИН-КОДИРУЮЩИХ ГЕНОВ

Викторов А.Г.

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН  
119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33/

E-mail: aleviktorov@yandex.ru

Анализ работ, на основании которых делалось заключение об экологической безопасности трансгенных растений, показывает, что в ряде случаев использованные методики и тест-объекты не были адекватны поставленным задачам. Результатом широкого применения трансгенных Vt-растений может стать долгосрочное негативное воздействие на окружающую среду. Во-первых, они производят в 1500-2000 раз больше эндотоксина, нежели используется при однократной обработке полей химикатами содержащими Vt-токсин, во-вторых, их культивирование приводит к накоплению Vt-токсинов в почве, в-третьих, разложение трансгенных растений происходит значительно медленнее, нежели генетически немодифицированных линий, а биологическая активность почв под трансгенными растениями заметно ниже, чем на контрольных участках.

Десятилетнее использование трансгенных растений в промышленных масштабах показывает, что  $\delta$ -эндотоксин-кодирующие гены *Bacillus thuringiensis*, пересаженные в геном сельскохозяйственных культур, оказывают одновременное влияние на несколько совершенно различных признаков генетически модифицированных растений. В классической генетике подобное явление носит название интерференционной или истинной плейотропии, оно требует специального очень пристального изучения, поскольку уже сейчас наблюдается довольно парадоксальная ситуация: культуры, выведенные методами генетической инженерии устойчивыми к вредителям из одного отряда насекомых (*Lepidoptera*), оказываются более привлекательными для вредителей из другого отряда (*Homoptera*).

## ДИАГНОСТИКА ГМО – ОТ СКРИНИНГА ДО КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА

Вонский М.С.<sup>1</sup>, Пономарева Н.В.<sup>2</sup>, Крылов А.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН; Тихорецкий пр., 4, 194064 С.-Петербург; тел.: (812)2973803, факс: (812)2970328

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии имени Д.И.Менделеева; Московский пр., 19, 190005 С.-Петербург; тел.: (812)3239385, факс: (812)3279776

E-mail: [vonski@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:vonski@mail.cytspb.rssi.ru) (Вонскому М.С.), [n.v.ponomareva@gmail.com](mailto:n.v.ponomareva@gmail.com), [akrylov@b10.vniim.ru](mailto:akrylov@b10.vniim.ru)

Необходимость развития систем лабораторной диагностики, обеспечивающих контроль за применением и распространением ГМО, обусловлена существующими законодательными ограничениями на оборот агробиотехнологической продукции и получаемых из нее материалов. Существующие схемы лабораторной диагностики включают в себя скрининговую диагностику, идентификацию и количественный анализ содержания ГМО в тестируемом материале. Применяемые в настоящее время методы позволяют выявлять присутствие ГМИ не только в растительном сырье, но и в прошедших переработку и очистку ингредиентах и продуктах питания, а также проводить их количественное определение.

Развитие международной торговли требует гармонизации применяемых методов диагностики и взаимного признания результатов лабораторных измерений в области анализа ГМО. Достоверность проводимой лабораторной диагностики зависит от целого ряда факторов, таких как способ отбора пробы, выбор метода выделения ДНК, используемого оборудования и тест-систем и т.д., вплоть до интерпретации полученных результатов. Однако в Российской Федерации, как и в странах ЕС, до настоящего момента отсутствует нормативная база, регламентирующая отбор проб и масштабы тестирования для разных видов сырья растительного происхождения и готовых продуктов.

Работы по развитию метрологического обеспечения методов биологического анализа начаты во ВНИИ метрологии им. Д.И.Менделеева. В рамках этих работ были проведены первые национальные межлабораторные исследования, направленные на сличение результатов количественного определения ГМО, в которых приняли участие 13 лабораторий. Показано, что результаты, полученные участниками сличений с применением метода ПЦР в реальном времени в значительной степени зависят используемых в лаборатории калибраторов и тест-систем. Обеспечение достоверности количественного определения ГМИ и взаимного признания результатов измерений требует выполнения целого комплекса работ, включающего аттестацию образцов сравнения, разработку и валидацию референтных методов для различных матриц, проведения национальных и участия в международных межлабораторных сличениях.

## **МОНИТОРИНГ ТРАНСГЕННЫХ КОМПОНЕНТОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ПРОВЕДЕННЫЙ НА ОСНОВЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДНК**

Гетман И.А., Наумкина Е.М., Чижова С.И., Колотовкина Я.Б., Цыдендамбаев В.Д., Кузнецов В.В., Кузнецов Вл.В., Романов Г.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая 35, 127276 Москва, Россия, тел: (495)903-93-88, (495)977-80-18, E-mail: gar@ippras.ru

Быстрое распространение генетически модифицированных организмов (ГМО) и полученных из них продуктов питания и кормов остро ставит вопрос контроля за их потоками и оценки возможных экологических и биологических рисков. В большинстве европейских стран на законодательном уровне введены строгие ограничения выращивания ГМО, их использования в продуктах питания, а также правила обязательной маркировки пищевых продуктов, если содержание трансгенных добавок в них превышает 0.9%.

Современная методология выявления трансгенных компонентов осуществляется путем анализа ДНК растений или полученных из них продуктов. Поэтому крайне важен первый этап этой методологии, а именно выделение максимально интактной ДНК в количестве, достаточном для обнаружения трансгенов. И если выделение качественной ДНК из растений сейчас не представляет больших трудностей, то выделение ДНК из продуктов питания, особенно после их термической обработки, остается серьезной проблемой.

В нашей работе базовым методом выделения ДНК являлся модифицированный метод с применением катионного детергента цетилтриметиламмоний-бромид (СТАВ-метод). С помощью этого метода были выделены ДНК не только из растений, но и из различных продуктов питания. Пригодность выделенных препаратов ДНК для последующей идентификации ГМО проверялась с помощью электрофоретического анализа, а также полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами на фрагменты универсальных растительных генов (типа гена *rbcL*) или видоспецифичных генов, таких как гены зеина кукурузы, пататина картофеля или лектина сои.

Для выявления трансгенных компонентов мы использовали новый метод идентификации чужеродных ДНК с помощью олигонуклеотидного микрочипа (ГОСТ Р 52174-2003, введен в действие в 2004 г.). Используя данный подход, нами были получены и проанализированы препараты ДНК из большого набора различных продуктов питания. Положительным и отрицательным контролями служили заведомо трансгенная и заведомо нетрансгенная ДНК, соответственно. В результате в отдельных продуктах удалось достоверно обнаружить присутствие генетически модифицированных источников (трансгенов). Подтверждение наличия трансгенов в испытуемых образцах и количественный анализ их содержания проводили с применением ПЦР реального времени (RT PCR), при использовании наборов фирмы «Синтол» (Россия). Было проанализировано более 400 наименований продуктов, особенно тех, в составе которых на этикетках было указано наличие соевого белка. Список продуктов включал: паштеты, сосиски, колбасы, блинчики с мясом, мясную тушенку, крабовые палочки, пельмени, котлеты. Продукты закупались в сетевых магазинах Москвы и Подмосковья, а

также на продуктовых рынках. Из примерно 400 исследованных образцов в 111 было обнаружено наличие трансгенной сои, что составляет около 28%. В большинстве случаев массовая доля трансгенных компонентов была незначительной и составляла доли % по отношению к нетрансгенной сое.

Тем не менее, в ряде образцов генетически-модифицированные источники (ГМИ) содержались в значительном количестве. Так, среди мясных изделий, закупленных в гипермаркете «Ашан» (Алтуфьево), наггетсы куриные (производство Бразилии) содержали более 35% трансгенной сои; котлеты капустные постные (ОАО Бусиновский МПК) – более 35%; сосиски «Кампуша Дюймовочка» для детей (МПЗ Кампомос) – 2.9%; сосиски молочные (ОАО «Царицино») – 2.2%; сосиски «Докторские» (ООО «Озерецкие колбасы») – 1%. Закупленные в супермаркете «Седьмой континент» продукты: колбаса «Докторская» (Микояновский МПК) содержала 23.5% ГМИ, крабовые палочки резаные «Vici» (ООО «Вичунай-Русь») и колбаса вареная «Доктор» (ОАО «Лианозово») содержали более 1% трансгенной сои. Пельмени «Русский Хит» (ЗАО «Качественные продукты», г. Электросталь), закупленные на Багратионовском рынке, содержали 7.6% ГМИ, а лазанья по-болонски (производство Бразилия), закупленная в супермаркете Рамстор, содержала 1.2% ГМИ. При этом ни в одном из случаев никаких обозначений, свидетельствующих о присутствии в данных пищевых продуктах генетически модифицированных источников, на этикетках обнаружить не удалось. Это подчеркивает необходимость дальнейшего мониторинга пищевых продуктов на наличие ГМИ.

Работа частично поддержана программой Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов»

## ОБРАЗОВАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ГЕНОМ *ZsryA*, ОТВЕЧАЮЩИМ ЗА УСТОЙЧИВОСТЬ К КОЛОРАДСКОМУ ЖУКУ

Гладышко Т.О.<sup>1</sup>, Рыдлева Е.В.<sup>2</sup>, Юрьева Н.О.<sup>1</sup>, Живухина Е.А.<sup>2</sup>, Загоскина Н.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский педагогический государственный университет

E-mail: phenolic@ippras.ru

В последние годы трансгенные растения все больше используются в мировой пищевой индустрии. Однако последствия этого «внедрения» до сих пор не ясны.

Характерной и, можно сказать, визитной карточкой растений являются вторичные метаболиты. Наиболее распространенными их представителями являются фенольные соединения (ФС), образующиеся во всех клетках. Функции этих веществ чрезвычайно разнообразны и связаны с процессами фотосинтеза, дыхания, а также защиты от действия многих стрессовых факторов, в том числе насекомых и патогенов.

Целью нашего исследования являлось выяснение изменений в образовании ФС у растений картофеля, трансформированных геном *ZsryA*, отвечающим за устойчивость к колорадскому жуку.

Контрольные и трансгенные растения картофеля (сорт «Юбилей Жукова»), выращивали в условиях *in vitro* на питательной среде Мурасиге-Скуга при 16-час. фотопериоде. В конце третьего месяца культивирования их вынимали из колб и использовали для анализа. Для извлечения ФС растительный материал измельчали и экстрагировали 96%-ным этанолом в течение 1 часа. Экстракты центрифугировали (3000 об/мин; 15 мин.). В надосадочной жидкости определяли суммарное содержание ФС (с реактивом Фолина-Дениса) и содержание флавонолов (с 1%-ным водным раствором хлористого алюминия). Калибровочную кривую строили по рутину.

Контрольные и трансгенные растения картофеля по своим морфо-физиологическим характеристикам (высоте растений, расположению листьев и их размерам) были близки друг к другу. Что касается суммарного содержания ФС, то у трансгенных растений оно было на 20% выше по сравнению с контрольным вариантом. Уровень же флавонолов, являющихся наиболее распространенными в зеленых тканях растений представителями ФС, у них был одинаков. Следовательно, трансформация картофеля геном *ZsryA*, повышающим устойчивость к колорадскому жуку, практически не влияла на фенольный метаболизм.

## НОВЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

Голденкова-Павлова И.В.

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Россия,  
Москва 119991 ул. Губкина, 3; факс: (495) 132-53-62. E-mail: [irengold@vigg.ru](mailto:irengold@vigg.ru)

Проблемы биобезопасности трансгенных растений являются актуальными. Наиболее острым остается вопрос неконтролируемого переноса генетической информации и последующей экспрессии трансгена в дикорастущих растениях, в том числе сорных. В настоящее время для идентификации трансгенов, в основном, используются различные варианты ПЦР методов, которые позволяют определять наличие гетерологичной последовательности в геномной ДНК растений, а также уровень транскрипции чужеродного гена в растительных клетках. Следует, однако, подчеркнуть, что новые свойства трансгенных растений, в большинстве случаев, определяет именно белковый продукт перенесенного гена. При этом следует отметить, что большинство продуктов клонированных генов либо не имеют ферментативной активности либо их ферментативную активность можно определять, используя сложные методы исследования. В связи с этим разработка новых подходов, позволяющих быстро, точно и с минимальными затратами выявлять белковый продукт трансгена, является актуальной. Несмотря на многочисленные исследования, этот вопрос пока не до конца разработан.

Нами предложен новый подход для конструирования экспериментальных моделей с целью дальнейшего создания трансгенных растений перспективных для биотехнологии. Этот подход основан на конструировании гибридных генов, в которых целевой ген имеет трансляционное слияние с последовательностью репортерного гена, кодирующего термостабильную лихеназу. Репортерная система, выбранная нами и основанная на термостабильности лихеназы, имеет ряд преимуществ. Прежде всего, она обеспечивает использование более простых и чувствительных методов для анализа экспрессии гибридного гена, что позволяет проводить быстрый отбор трансгенных организмов, определять уровень экспрессии гибридных генов и, что самое важное, определять молекулярные массы белковых продуктов гибридных генов с использованием простых и чувствительных методов. Помимо этого, возможно использовать эту репортерную систему для мониторинга трансгенов в агроценозах.

Экспериментальное подтверждение адекватности такой стратегии было получено нами при конструировании и анализе прокариотических и эукариотических трансформантов, экспрессирующих гибридные гены, в которых целевой ген имеет трансляционное слияние с последовательностью репортерного гена. Так, были сконструированы гибридные гены, содержащие репортерный ген термостабильной лихеназы, и следующие модельные гены: *recA*, *recA1*, *sd2*, *sd2mod*, *desA*, *desC*, *cry3a* и *cry3aM*. Изучена их экспрессия в клетках про- и эукариот. Показано, что гибридный белок RecA-LicBM2 сохраняет свойство RecA-белка связываться с оцДНК и предохранять ее от действия нуклеазы S1. Известно, что белок RecA *E.coli* стимулирует гомологичную рекомбинацию у растений. Это позволяет полагать, что экспрессия в растениях гибридного гена *recA-licBM2* также может изменить уровень и спектр рекомбинации у растений, обеспечивая при этом использование более простых и чувствительных методов для анализа экспрессии гибридного гена.



Показано, что белки SD2 (нативный дефензин из подсолнечника) и SDmod (модифицированный дефензин) в составе гибридных белков SD2-LicBM2 и SD2mod-LicBM2 оказывают такое же ингибирующее действие на рост гифов *Fusarium culmorum*, как нативный и модифицированный белки. Это позволяет полагать, что экспрессия гибридных генов, содержащих гены дефензинов, могут изменить устойчивость растений к фитопатогенам. Продемонстрировано, что в составе гибридных Cry3aM-LicBM2 и Cry3a-LicBM2 белков Cry3aM и Cry3a белки сохраняют свою биологическую активность – инсекцитидное действие на личинки колорадского жука. На основании этого предлагается использовать гибридный ген *cry3aM-licBM2* для создания растений картофеля, устойчивых к колорадскому жуку. Сравнительный анализ экспрессии нативного и гибридного генов десатураз с различной субстратной специфичностью в клетках бактерий показал, что лихеназа в составе гибридных белков сохраняет активность и термостабильность, а десатуразы сохраняют способность катализировать введение двойной связи в соответствующие жирные кислоты. Известно, что десатуразы играют важную роль в устойчивости фотосинтезирующих организмов к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды и перенос в растения гибридных генов, содержащих последовательности генов десатураз, позволит увеличить устойчивость растений к стрессовым факторам. При изучении экспрессии всех гибридных генов было показано, что в клетках модельных организмов лихеназа в составе всех изученных гибридных белков сохраняет основные свойства трансляционного репортерного белка - термостабильность и активность, а также происходит образование белковых продуктов с молекулярной массой соответствующей теоретически рассчитанной для каждого гибридного белка.

При конструировании трансгенных растений исследователи обычно используют сильный конститутивный промотор 35S РНК СаMV, который обеспечивает высокий уровень экспрессии целевого гена во всех органах и тканях растения. Это не всегда оправдано и вызывает негативное отношение, прежде всего, к важным трансгенным сельскохозяйственным культурам. Экспрессии целевого гена в трансгенных растениях должна быть не только эффективной, но и направленной, то есть экспрессия целевого гена должна быть ткане- или органоспецифичной, что может быть достигнуто при использовании других, нежели промотор 35S РНК СаMV, регуляторных элементов. Использование такого подхода позволило нам предложить новую систему экспрессии *cry* генов в растениях. Эта система основана на экспрессии гибридных генов, в состав которых входит последовательность репортерного гена лихеназы, и использовании в качестве регуляторного элемента светоиндуцибельного промотора, который обеспечивает преимущественную экспрессию контролируемых генов только в зеленых тканях растения (листьях) – органах-мишенях для насекомых-вредителей. Молекулярно-биологический анализ и биотесты трансгенных растений картофеля продемонстрировали, что используемый подход позволил сконструировать более биобезопасные трансгенные растения.

Таким образом, показано, что использование современных методов генной инженерии и геномики позволяет разработать системы экспрессии с различными регуляторными элементами, создать оптимальные экспериментальные модели трансгенных растений, перспективные для биотехнологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (06-04-81009-Бел\_а, 05-04-49186-а).

## THE ENHANCEMENT OF PLANT TOLERANCE TO HYPOTHERMIC STRESS BY THE INTRODUCING OF $\Delta 12$ -ACYL-LIPID DESATURASE GENE

Demin I.N., Deryabin A.N., Sinkevich M.S., Antipina O.V., Trunova T.I.

Timiryasev Institute for Plant Physiology RAS, Moscow, 127276, Russia, tel.: +7(495)9039326

E-mail: [trunova@ippras.ru](mailto:trunova@ippras.ru)

Plants are affected by the complex of factors of different nature, causing stress reactions. Among abiotic factors unfavorable low temperatures occupy the exclusive place. The mechanisms of the temperature adjusting and behavior adaptation don't exist in plants, so they are forced constantly to adapt oneself to fluctuations in an ambient temperature. Successes of a modern molecular biology and biotechnology allow to create genetically modified plants with the promoted stability to the influence of unfavorable factors. It opens the large prospects to use such plants as models of research of the artificially entered genes effects.

As a result of intensive work of the Department of cell biology and biotechnology of Institute Plant Physiology the Russian Academy of Sciences gene *desA* and reporter gene *licBM3* were introduced into potato plants (*Solanum tuberosum* L.) cv. "Desnitsa". Both of genes were placed under the control of constitutive promoter 35S CaMV. *DesA* gene codes  $\Delta 12$ -acyl-lipid desaturase of fatty acids that enters double bond into position  $\Delta 12$  of acyl chains. As the control not transformed plants of the same grade have been presented. Plants grew up *in vitro* at 22°C and 16-hour light day on the MS nutrient containing 2% of sucrose.

Problem of our work was comparative study of transgenic and wild type plants' tolerance to hypothermia by means of electrolyte leakage measurement of water extracts from vegetative leaf tissues (Dexter method). This method allows to show a condition of vegetative cells membranes. Intensity of electrolytes leakage from leaves can serve as an estimating criterion of membranes damages under the hypothermia.

At comparison of different genotypes of a potato it was revealed, that both young, and old leaves of the transformed plants would show greater tolerance to low-temperature stress, in comparison with wild type. This is evident from the data, according to which electro conductivity of electrolytes solution from transgenic plants' leaf cells was lower than the control plants when 22°C, and in hypothermia. This can be attributed to expression of desaturase gene aimed to increase the level of polyunsaturated fatty acids in membranes, and thus to increase plant resistance to low temperatures.

Thus, it is necessary to mean, that the offered mechanism of testing plants chill resistant indicates their relative resistance to low temperature only.

## **ЗАЩИТНАЯ РОЛЬ САХАРОВ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА, ВЫЗВАННОГО ГИПОТЕРМИЕЙ (НА ПРИМЕРЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ С ИЗМЕНЕННЫМ УГЛЕВОДНЫМ МЕТАБОЛИЗМОМ)**

Дерябин А.Н., Синькевич М.С., Трунова Т.И.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая, 35, 127276 Москва; тел.: (495)9039326, факс: (495)9778018.  
E-mail: trunova@ippras.ru (Дерябину А.Н.)

Для изучения механизма антиоксидантного и стабилизирующего действия сахаров и их роли в формировании устойчивости к окислительному стрессу, вызванному гипотермией, были использованы трансгенные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L., cv. Desiree) с углеводным метаболизмом, измененным вследствие экспрессии гена инвертазы дрожжей, находящегося под контролем клубнеспецифичного пататинового промотора В33 класса I и содержащего последовательность лидерного пептида ингибитора протеиназы II для обеспечения апопластной локализации фермента. Растения отобраны из коллекции клонов, полученных в результате совместной работы сотрудников Института молекулярной физиологии растений им. Макса Планка (Germany) и Лаборатории роста и развития им. М.Х. Чайлахяна ИФР РАН. Экспрессия гена инвертазы дрожжей приводила к задержке оттока сахарозы из клеток вследствие ее распада в апопласте на нетранспортируемые гексозы. В результате возникал обратный поток гексоз, который приводил к удалению избытка сахарозы (в виде гексоз) из свободного пространства и к ее ресинтезу в клетках мезофилла. Таким образом, трансформанты картофеля представляют собой растения с такими донорно-акцепторными отношениями, которые способствуют накоплению сахаров в органах, наиболее уязвимых к действию гипотермии - листьях. Ранее нами было выявлено, что экспрессия введенного гена инвертазы дрожжей, сопровождающаяся повышением активности кислых инвертаз и накоплением сахаров, приводила к увеличению размера крахмальных зерен в хлоропластах, накоплению восстановленных эквивалентов (NADPH, Fd и др.) и реакционных центров ФСII, а также к усилению темнового дыхания, торможению роста растений и ингибированию фотосинтеза (по принципу обратной связи). Впервые показано участие сахаров в инактивации супероксидных радикалов и связанное с этим их компенсаторное влияние на активность ключевых ферментов антиоксидантной системы защиты клеток. Установлено, что сахара ослабляют окислительный стресс, вызванный гипотермией, и могут выступать в роли низкомолекулярных антиоксидантов, способствуя более эффективной работе системы антиоксидантной защиты клеток. С использованием модельных опытов (системы Фентон, генерирующей оксиданты H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и OH<sup>\*</sup>), экспериментально подтверждена способность растворимых углеводов (сахарозы, глюкозы) к участию в антиоксидантной системе клетки в качестве перехватчиков АФК. Таким образом, благодаря использованию трансгенных растений картофеля расширены представления о роли сахаров в формировании устойчивости растений к окислительному стрессу, вызванному гипотермией.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 07-04-00601).

## ИЗОФЕРМЕНТЫ КАК МАРКЕРЫ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТАТУСА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Егорова И.А., Лутова Л.А., Курдюков И. Д.

Санкт-Петербургский государственный университет; Университетская наб., 7/9, 199034 Санкт-Петербург, Россия; тел.: (812)3281590, факс: (812)3280541  
e-mail: [egorovai69@mail.ru](mailto:egorovai69@mail.ru) (Егоровой И.А.)

До сих пор изоферментные маркеры широко использовали для решения задач популяционной генетики и генетического картирования у различных организмов. В данной работе изоферменты являлись важными показателями в мониторинге метаболизма.

Объектами исследования были выбраны растения трех видов из двух семейств – *Solanaceae* (табак и картофель) и *Brassicaceae* (редис). Указанные растения были получены с использованием различных плазмид, содержащих гены *nptII* или *ipt* и *nptII* из *Agrobacterium tumefaciens*: GV3850 Tr4 (*ipt* и *nptII*) для картофеля, pGV3850 Km<sup>R</sup> (*nptII*), pART27::smt2 (*nptII*) для табака, pGV3850 Tr4 (*ipt* и *nptII*) для редиса. Таким образом, анализируемые растения содержали наиболее часто используемые в генной инженерии растений бактериальные гены.

Целью работы являлось изучение спектра ряда генетически детерминированных множественных молекулярных форм ферментов (изоферментов) указанных растений. В задачи исследования входил также вопрос, меняется ли каким-то образом спектр изоферментов трансгенного растения в ряду последовательных половых поколений, прошедших после процедуры трансформации. Для этого в эксперимент были вовлечены растения табака T<sub>1</sub>- и T<sub>2</sub>- поколений и редиса T<sub>2</sub>- и T<sub>3</sub>-поколений.

Все растения, несущие в составе генома чужеродную вставку, и контрольные (интактные) растения были вовлечены в соответствующее сравнение по спектрам двадцати изоферментных маркеров: аспаратаминотрансфераза, малатдегидрогеназа (НАДФ- и НАД- зависимая), шикиматдегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа, эстераза, супероксиддисмутаза, β-глюкозидаза, кислая фосфатаза, диафораза, изоцитратдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, фосфоглюкомутаза, пероксидаза, эндопептидаза, лейцинаминопептидаза, фосфоглюкоизомераза, аконитаза, ароматическая алкогольдегидрогеназа (НАДФ- и НАД- зависимая). Во всех рассматриваемых случаях проанализированные спектры ферментных систем у растений одного и того же вида совпадали.

Таким образом, отсутствие различий между трансгенными и контрольными растениями по зимограммам указанных выше ферментов свидетельствует об отсутствии изменений в метаболическом статусе растений, получивших чужеродную вставку. Сравнение исходных и самоопыленных трансформированных растений табака и редиса свидетельствует не только об отсутствии указанных изменений в ряду поколений, но и об отсутствии влияния дозы трансгена на изоферментные спектры трансформанта. Более того, растения двух семейств с разной биологией размножения совершенно одинаково - без изменений в исходном спектре изозимов – перенесли процедуру трансформации. Из этого с большой степенью вероятности можно заключить, что механизмы горизонтального переноса генов одинаково строго не затронули ключевые моменты в метаболизме у этих растений.

## ТРАНСГЕННОЕ РАСТЕНИЕ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ СТРЕССОВОЙ ФИЗИОЛОГИИ

Еникеев А.Г.<sup>1</sup>, Копытина Т.В.<sup>1</sup>, Семенова Л.А.<sup>1</sup>, Натяганова А.В.<sup>2</sup>, Гаманец Л.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Лермонтова 132, 664033 Иркутск, тел.: (3952) 426676, факс: (3952)510754

<sup>2</sup>Лимнологический институт СО РАН, Улан-Баторская 3, 664033 Иркутск, тел.: (3952)426504, факс: (3952)425405

E-mail: [enikeev@sifibr.irk.ru](mailto:enikeev@sifibr.irk.ru) (Еникееву А.Г.)

В 2007 году исполнилось 35 лет генетической инженерии растений. Однако до сих пор нет четкого ответа на вопрос: что такое трансгенный организм с точки зрения физиолога. Развитие физиологии трансгенного растения в значительной степени тормозится отсутствием соответствующих методологических подходов. Оценка последствий трансформации фактически сводится к подтверждению факта переноса и экспрессии целевого гена. Изучение множественных эффектов трансгенеза носит, как правило, описательный характер и они интерпретируются, преимущественно, как следствие инсерции Т-ДНК, а также случайности места встройки вектора. В докладе будет представлен подход к оценке последствий трансгенеза, интегрирующий разные уровни организации (растение в почве, растений *in vitro* и культура ткани) и комплексное исследование фенотипических, физиологических и цитогенетических изменений с позиций стресс-физиологии. При агробактериальной трансформации прослеживаются как минимум 4 вида стрессов: 1) поранение, 2) контакт с патогенным микроорганизмом, 3) культивирование *in vitro*, 4) собственно трансгенез, т.е. инсерция Т-ДНК в хозяйский геном. Разграничение последствий того или иного стрессового воздействия среди того эффекта, который мы называем последствием трансгенеза, крайне затруднено из-за наложения множественных реакций и трудности их интерпретации. Наблюдаемая при агробактериальной трансформации активация стрессовых ферментов, интенсификация метаболизма, усиление роста и развития, изменение морфометрических и цитогенетических параметров рассматривается как биотический стресс, имеющий очень сложные множественные эффекты, а трансгенное растение - как организм в состоянии перманентного биотического стресса.

## **НОВЫЕ ДАННЫЕ О ВЛИЯНИИ ГМО НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ И ВЫСШУЮ НЕРВНУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

Ермакова И.В.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, ул. Бутлерова, д.5а, Москва, тел.: (495)117485; факс: (495) 334-70-00.

E-mail: i\_ermakova@mail.ru.

Существуют многочисленные данные о негативном воздействии генетически модифицированных организмов (ГМО) на организм млекопитающих. Так, были выявлены патологические изменения в органах при добавлении в корм животных ГМ-картофеля, ГМ-кукурузы, ГМ-гороха и ГМ-сои (Puzstai, 1999; Ewen and Puzstai, 1999; Malatesta et al., 2002, 2003; Prescott et al., 2005; Seralini et al., 2007 и др.). Однако практически нет данных о том, как влияют ГМО на физиологическое состояние и поведение животных. Нами были проведены исследования по изучению влияния диеты, содержащей генетически модифицированную сою, устойчивую к гербициду раундапу (Ready Roundup, линия 40.3.2, трансген EPSPS CP4), на физиологическое состояние и высшую нервную деятельность крыс линии Вистар и их потомства (группа «ГМ-соя»). Полученные данные опытных групп (ГМ-соя) сравнивали с аналогичными показателями крыс других групп к корму которых добавляли в таком же количестве традиционную сою (группа «Трад-соя», Arcop SJ 91-330), или изолят белка ГМ-сои той же линии (группа «Изолят белка»), или ничего не добавляли (группа «Контроль»). Сою добавляли к виварному корму в виде соевой муки, разведенной водой, за две недели до спаривания, во время спаривания, беременности и выкармливания крысят из расчета 5-7г на одну крысу за одно кормление. В качестве виварного корма использовали как обычный корм, так и корм, в состав которого уже входила ГМ-соя (14%). С помощью ПЦР выявляли наличие трансгенов в сое и в корме. У животных исследовали уровень тревожности по модели «свет-темнота», эмоционально-исследовательскую активность в «открытом поле» и поведение животных в домашних клетках.

Полученные результаты показали, что количество рожденных крысят было одинаковым у самок всех групп: в среднем 10-11 крысят на одну самку. Однако при этом был выявлен высокий уровень смертности в течение первых трех недель после рождения крысят первого поколения в группе ГМ-соя (51,6%) по сравнению с крысятами из групп «Трад-соя» (10%), «Изолят белка ГМ сои» (15%) и «Контроль» (8,1%). Кормление крыс виварным кормом, в состав которого уже входила ГМ-соя (линия 40.3.2), также приводила к повышенной смертности крысят в первом поколении (33,3%). Высокий уровень смертности крысят был обнаружен как при добавлении ГМ-сои к обычному виварному корму (51,6%), так и к корму, в состав которого уже входила ГМ-соя (51,7%). Через две недели после рождения значительно большее количество крысят из группы ГМ-соя были недоразвитыми и весили меньше 20г. (33,3%) по сравнению с крысятами из групп Трад-соя (12,9%), «Изолят белка ГМ-сои» (7%) и «Контроль» (12,2%). При спаривании половозрелых самок первого поколения из группы ГМ-соя с самцами

первого поколения от других самок из группы «ГМ-соя», получить потомство не удалось. Однако, при спаривании самок первого поколения из группы «ГМ-соя» с самцами из группы «Контроль» у 75% самок было получено потомство. Количество крысят на одну самку было меньше (8 крысят), чем в других группах (10-11 крысят).

Исследование поведения показало отсутствие статистически значимых различий между группами при тестировании эмоционально-исследовательской активности в «Открытом поле». Однако при тестировании животных по методике «свет-темнота» был выявлен высокий уровень тревожности и беспокойства у животных в группе «ГМ-соя». При этом были обнаружены половые различия в поведении. Так, у самцов наблюдалось более длительное пребывание в темном отсеке (высокий уровень тревожности), а у самок, повышенная двигательная активность и частые переходы из темного отсека в светлый и обратно (беспокойство) по сравнению с самцами и самками из других групп. Аналогичная картина наблюдалась при анализе поведения крысят разного пола из групп «ГМ-соя». Возможно, что половые различия в поведении были обусловлены высоким уровнем фитоэстрогенов в ГМ-сое (Pusztai, 1997). Анализ поведения в домашних клетках показал повышенную агрессивность самок, самцов и их детенышей из группы ГМ-соя: они набрасывались и кусали друг друга. Были случаи, когда крысы из группы «ГМ-соя» нападали и кусали работника вивария, ухаживающего за ними. У 20% самок из групп «ГМ-соя» наблюдалось нарушение материнского инстинкта: они не сооружали «гнездо» для своих детенышей как другие крысы, а разбрасывали их по клетке.

Полученные данные свидетельствуют об ухудшении физиологического состояния, нарушении репродуктивных функций и изменении поведения крыс и их потомства при добавлении в корм ГМ-сои (RR, линия 40.3.2). Выдвигается несколько версий возможных механизмов, лежащих в основе негативного воздействия ГМ-сои (RR, линия 40.3.2) на животных и их потомство.

## ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ГЕН АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ПЕПТИДА ЦЕКРОПИНА P1, ОБЛАДАЮТ ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ФИТОПАТОГЕНАМ

Захарченко Н.С.<sup>1</sup>, Гапеева Т.А.<sup>3</sup>, Рукавцова Е.Б.<sup>1</sup>, Юхманова А.А.<sup>1</sup>, Гудков А.Т.<sup>2</sup>, Волоотовский И.Д.<sup>3</sup>, Бурьянов Я.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН; пр-т Науки, 6, 142290 Пущино; тел.: (495)730921, факс: (4967)330527.

<sup>2</sup>Институт Белка РАН; пр-т Науки, 3, 142290 Пущино; тел.: (495)733714.

<sup>3</sup>Институт биофизики и клеточной биологии НАН Беларусь; ул. Академическая 27, 220072 Минск; тел: (017)2841749.

E-mail: [zachar@fibkh.serpukhov.su](mailto:zachar@fibkh.serpukhov.su) (Захарченко Н.С.)

Повышение устойчивости сельскохозяйственных растений к различным биотическим и абиотическим стрессам является важнейшей задачей современной агробиотехнологии. Одним из средств защиты растений от патогенов может быть использование генов антибактериальных пептидов, которые обладают широким спектром бактерицидной и фунгицидной активности. В настоящее время исследовано более 800 генов антимикробных пептидов, они обнаружены практически у всех живых организмов и представляют значительный интерес для использования в генноинженерной биотехнологии растений.

Целью нашей работы было получение и анализ трансгенных растений, экспрессирующих синтетический ген антибактериального пептида цекропина P1. В качестве источника генов были использованы плазмиды серии pET21d, содержащие синтетический ген цекропина P1. Ген антибактериального пептида был заново синтезирован при помощи ПЦР. Ген цекропина P1 был встроен в промежуточный вектор pRT103 под сильный конститутивный промотор 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV 35S). Затем кассету 35S-сесP1-poliA клонировали в бинарный вектор pGA482, который переносили в клетки агробактерий GV3101 (pMP90RK). Полученный штамм агробактерий использовали для трансформации 6 сортов картофеля российской и белорусской селекции. Проведен молекулярно-генетический анализ полученных растений. Присутствие и экспрессия гена цекропина P1 в геноме трансгенных растений было подтверждено методом ПЦР, Вестерн- и Нозерн-блот анализами. Результаты биотестирования по устойчивости показали, что трансгенные растения картофеля, проявляли антибактериальную и антифунгальную активность к патогенам *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*, *Sclerotinia sclerotiorum* и *Phytophthora infestans*. Полученные трансгенные растения были высажены в теплицу и доведены до конца вегетации. Проведенные эксперименты, показали возможность использования гена цекропина P1 в качестве селективного и скринингового маркера в трансформации растений.

Работа поддержана грантами РФФИ № 06-08-81008 Бел\_а, № 07-04-00235, № 07-04-12140-офи.



## СОЗДАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ РЕДИСА (*Raphanus sativus* L.), ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ОТДЕЛЬНЫЕ ГЕНЫ Т-ДНК АГРОБАКТЕРИЙ

Ильина Е.Л., Егорова И.А., Монахова В.А., Додуева И.Е., Лутова Л.А.

Санкт-Петербургский государственный Университет, кафедра генетики и селекции; Университетская наб., д. 7/9, 199034, Санкт-Петербург, тел./факс.: (812)3280541.

E-mail: [substrat@yandex.ru](mailto:substrat@yandex.ru) (Ильиной Е.Л.), [Wildtype@yandex.ru](mailto:Wildtype@yandex.ru).

Инбредные линии генетической коллекции редиса (*Raphanus sativus* L.), созданной сотрудниками кафедры генетики и селекции СПбГУ, служат моделью для изучения генетически детерминированного опухолеобразования у высших растений. Исследование механизмов опухолевого роста (как у животных, так и у растений) относится к числу важных фундаментальных задач генетики развития, так как напрямую связано с изучением системного контроля деления и дифференцировки клеток. С целью изучения роли отдельных генов Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* и *Agrobacterium rhizogenes* в развитии опухолей у растений была проведена работа по созданию трансгенных линий, стабильно экспрессирующих отдельные гены Т-ДНК, на основе имеющихся безопухолевых и опухолевых инбредных линий редиса. Были разработаны высокоэффективные методы трансформации редиса *in planta*, дающие большой выход трансгенных растений по сравнению с используемыми для трансформации этой культуры методом floral-dip и вакуумной инфльтрацией агробактерий в семена. С помощью разработанных методов были получены трансгенные растения безопухолевых и опухолевых линий, несущие гены *ipt* *Agrobacterium tumefaciens* или *rolC* *Agrobacterium rhizogenes* под конститутивным промотором 35S CaMV. Продукт гена *ipt* - фермент изопентенилтрансфераза, катализирующий ключевой этап биосинтеза цитокининов. Ген *rolC*, точная функция которого неизвестна, по литературным данным, повышает активность  $\beta$ -D-глюкозидаз, расщепляющих неактивные связанные формы цитокининов, или меняет их спектр в тканях трансгенных растений. Ранее при изучении физиологических механизмов опухолеобразования у линий редиса было показано, что индукция опухолевого роста связана с повышением концентрации цитокининов зеатинового типа. Трансформация линий редиса генами *ipt* и *rolC*, связанными с контролем метаболизма цитокининов, вызывала изменения опухолевого фенотипа, а также изменение содержания цитокининов в тканях растений. Так среди растений Т1, полученных при трансформации безопухолевых линий 3 и 30 генами *ipt* или *rolC*, 40-60% имели опухолевый фенотип. В индивидуальных семьях Т2 и Т3 от опухолевых растений Т1 наблюдалось расщепление по признаку «опухолеобразование» (30-80% опухолевых растений). Трансформация геном *ipt* линии 19, в норме образующей опухоли с частотой близкой к 100%, приводила к обратному эффекту – снижению частоты опухолеобразования до 60%. В индивидуальных семьях Т2 и Т3 от безопухолевых трансгенных растений линии 19 также наблюдалось расщепление по опухолеобразованию. С помощью ОТ-ПЦР у почти 80% изученных трансгенных растений выявлена экспрессия

перенесенных генов, что свидетельствует о вставках Т-ДНК в транскрипционно активные районы генома. Для *ipt*-трансгенных растений безопухолевых линий показан высокий уровень экспрессии гена *ipt* по сравнению с безопухолевыми трансгенными растениями. В то же время, для *rolC*-трансгенных растений четкой корреляции между экспрессией гена *rolC* и опухолообразованием выявить не удалось. С помощью ИФА было измерено содержание цитокининов в молодых листьях трансгенных растений. Было показано повышение содержания зеатина у *ipt*-трансгенных растений, тогда как у *rolC*-трансгенных растений отмечено снижение содержания зеатина и резкое повышение содержания зеатин-рибозида. При этом у большинства опухолевых трансгенных растений содержание цитокининов было повышено в 1.5-3 раза по сравнению с родительскими линиями редиса, а у безопухолевых практически не отличалось от такового у родительских линий. Таким образом, мы можем предположить, что образование опухолей у трансгенных растений безопухолевых линий редиса связано с изменением содержания цитокининов в результате экспрессии перенесенных генов Т-ДНК. Для изучения влияния перенесенных генов Т-ДНК на метаболизм растений мы проводили сравнение трансгенных растений и родительских линий редиса по спектрам двадцати изоферментов, отвечающих за некоторые ключевые моменты метаболизма: аспаратаминготрансферазы, НАДФ- или НАД-зависимой малатдегидрогеназы,  $\beta$ -глюкозидазы и т.д. Отличий трансгенных растений от родительских линий редиса по изоферментному спектру выявлено не было.

## ИЗМЕНЕНИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ РЕПОРТЕРНЫХ ГЕНОВ У РАСТЕНИЙ-ТРАНСФОРМАНТОВ КАРТОФЕЛЯ

Карачинская Н.В.<sup>1</sup>, Петюх Г.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт агроэкологии и биотехнологии УААН, ул. Метрологическая 12, Киев, 03148, Украина, тел./факс: (38044)5264038

<sup>2</sup>Институт сахарной свеклы УААН, ул. Клиническая 25, Киев, 03141, Украина, тел./факс: (38044)2755000  
E-mail: gpetjuch@ukr.net

Проблема стабильной экспрессии интродуцированных генов в трансгенных растениях картофеля является достаточно серьезной фундаментальной проблемой не только в генетических исследованиях, но и при изучении особенностей метаболизма и физиологического статуса таких растений.

Известные эффекты «гомологозависимого молчания генов» и «эффект положения», а также разная копияность полученной вставки и ее неспецифическая активность в процессе онтогенеза растений приводят к нарушениям в стабильной работе трансформированных генов у растений-трансформантов. Более изученным механизмом эффекта «молчания генов» считают метилирование цитозиновых остатков в CCGG сайтах после регенерации растений в культуре *in vitro*

С этой целью проводили изучение наличие метилирования у растений-трансформантов семи сортов картофеля украинской селекции после агробактериальной трансформации вектором p35SGUSInt (Vanccanet et al., 1990). Из 952 растений-регенерантов, устойчивых к повышенным концентрациям канамицина, у 3,57% (34 растения) не наблюдали характерной реакции фермента  $\beta$  глюкуронидазы с соответствующим субстратом, что проявлялось в отсутствии характерной синей окраски. Появление таких отклонений было характерно для 5 из 7 сортов.

Для изучения возможных причин наблюдаемых отклонений были проведены анализы наличия гена *gus* в таких растениях с использованием ПЦР-реакции и соответствующих праймеров. Результаты показали, что у одного растения с.Радич, вообще, не наблюдали сигнал, свидетельствующий о наличии гена *gus*, хотя канамициновый ген присутствовал и обеспечивал устойчивость к данному антибиотику. Вероятно, это может быть связано с возможными разрывами в генетической конструкции и последующей делецией гена *gus*.

Проведение рестрикционного анализа с использованием изошизомеров MspI и HpaII у остальных 33 клонов продемонстрировало наличие метилирования у 28 растений. Природа «молчания» у оставшихся 5 растений еще не установлена. Возможно, это связано с посттранскрипционной и/или посттрансляционной инактивацией данного гена.

Изучение особенностей наследования гена *gus* и *prt* после самоопыления у растений картофеля продемонстрировало наличие расщепления как по признаку устойчивости к канамицину, так и по активности гена *gus* у 8 клонов трех сортов и оказалось близким к 3:1. Подобное расщепление у картофеля соответствует хромосомному расщеплению гетерозиготы Aaaa (AAaа), что в данном случае, скорее всего, является следствием интеграции одной или нескольких копий генов в одну из четырех гомологичных хромосом.

## **ФОТОРЕГУЛЯЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА *IN VIVO* И *IN VITRO***

Карначук Р.А., Гвоздева Е.С., Ефимова М.В.

Томский государственный университет, Биологический Институт, кафедра физиологии растений и биотехнологии; пр. Ленина, 36, 634045, Томск; тел./факс (3822) 529765

E-mail: [karnach@mail.tsu.ru](mailto:karnach@mail.tsu.ru) (Карначук Р.А.), [stevia555@mail.ru](mailto:stevia555@mail.ru)

Физиология генетически модифицированных растений мало изучена и практически нет данных по фотоморфогенезу. Изменение структурной организации генома растений инсерцией экзогенной Т-ДНК может происходить в транскрипционно активные районы растительного генома, что приводит к возможной экспрессии некоторых собственных генов и нарушениям в физиологии этих растений. Известно, что свет является не только источником энергии для фотосинтеза, но и сигналом, активирующим и изменяющим программу развития целого растения. Регуляторное действие света на морфогенез растений реализуется через систему фоторецепторов, воспринимающих свет разного спектрального состава и интенсивности, а также систему специфических посредников, роль которых могут выполнять экзогенные гормоны. Между светом и фитогормонами существуют сложные взаимодействия. Введение чужеродного фрагмента ДНК может также изменить баланс эндогенных фитогормонов в растении, что приведет к существенному изменению метаболизма клетки и развития растения. Наша задача заключалась в исследовании морфогенеза интактных растений табака и в культуре *in vitro* при адаптации к селективному свету.

В работе были использованы растения табака *Nicotiana tabacum* L. родительской линии SR1 (контроль) и трансгенные линии IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3, любезно предоставленные коллегами Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) методом агробактериальной трансформации с применением генетической конструкции, включающей ген интерлейкина-18 человека, маркерный ген *nptII* и репортерный ген *uidA*. Линии №7 и №28 отличаются друг от друга локусом встройки генетической конструкции.

Фотоморфогенез генетически модифицированных проростков на зеленом (ЗС) и красном свету (КС) существенно отличался от родительских на ранних стадиях онтогенеза, что проявилось в преобладании роста гипокотилей, семядолей на ЗС и семядолей на КС. Ростовые ответы на свет были сопряжены с изменением уровня зеатина, индолилуксусной кислоты (ИУК) и абсцизовой кислоты (АБК). Так, удлинению гипокотилей и увеличению площади семядолей трансгенных растений на ЗС соответствовало повышение уровня зеатина и снижение свободной АБК. Большая площадь семядольных листьев генмодифицированных проростков на КС была сопряжена с увеличением уровня зеатина и свободной ИУК. Рост каллусных клеток трансгенных линий табака нулевого пассажа отличался от контрольной в темноте и на СС у линии IL18№28-3, а в 1-м и 2-м пассажах наблюдалось увеличение объема клеток у линий IL18№7-1 и IL18№7-11 на ЗС. Таким образом, трансгенез растений табака изменяет функционирование систем фоторегуляции на ранней стадии онтогенеза.

Работа поддержана ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы», государственный контракт № 02.512.11.2035.

## ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ФОСФОЛИПАЗ В ПЕРЕДАЧЕ СИГНАЛА ЦИТОКИНИНОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ АРАБИДОПСИСА

Карпова Г.М., Ломин С.Н., Рифлер М., Романов Г.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая 35, 127276 Москва; тел.:(495)9039334, факс: (495)9778018, E-mail [gar@ippras.ru](mailto:gar@ippras.ru)

Гормональная регуляция является одним из важнейших факторов, определяющих развитие растений на протяжении всей их жизни. Поэтому много внимания уделяется изучению молекулярных основ действия фитогормонов. В соответствии с данными, полученными в последние годы, считается, что при передаче сигнала цитокининов работает так называемая двухкомпонентная система. В нее входят рецепторы гибридных гистидинкиназ (АНК), фосфотрансмиттеры (АНР) и активаторы транскрипции регуляторов ответа (ARR В) (Романов, 2002; Heyl, Schmulling, 2003). В трансдукцию может быть также вовлечен элемент фосфолипидного сигналинга – фосфолипаза D (PLD) (Romanov et al., 2002). В нашей работе мы проверяли возможность участия фосфолипаз С и D (PLC и PLD) в передаче сигнала цитокининов. Во многих процессах фосфолипазы С и D работают совместно (Meijer, Munnik, 2003). Есть свидетельства активации PLC цитокининами (Kravets et al., 2005). Работу проводили на трансгенных растениях *Arabidopsis thaliana* pARR5::*GUS*. Использование конструкции ДНК pARR5::*GUS* позволяет количественно оценить ответ растения на генном уровне на обработку цитокининами. Фармакологические исследования проводили на 3-х дневных проростках, как описано в работе Romanov et al., 2002. В качестве ингибитора PLC использовали U73122 (контролем являлся неактивный аналог U73343). При обработке ингибитором в концентрации 30 мкМ экспрессия трансгена pARR5::*GUS* подавлялась на 60%. В последующих экспериментах было определено влияние ингибитора на передачу сигнала индивидуальными рецепторами цитокининов. Для этого использовали двойные инсерционные мутанты по рецепторам цитокининов (в таком растении работает лишь один рецептор из трех) (Riefler et al., 2005) с трансгеном pARR5::*GUS*. Использовали 4-х дневные проростки. В случае мутантов, в которых функционировали только рецепторы АНК3 или АНК2, U73122 и U73343 подавляли действие цитокинина в одинаковой степени, т.е. неспецифично. А у мутанта с экспрессией одного рецептора АНК4 U73122 (5-30 мкМ) действовал существенно сильнее своего неактивного аналога и при концентрации 30 мкМ снимал эффект цитокининов на 100%. На двойных мутантах испытывали также ингибитор PLD бутан-1-ол и его неактивный аналог бутан-2-ол. В диапазоне концентраций 0,3-1% бутан-1-ол специфически подавлял экспрессию гена pARR5::*GUS* у всех мутантов. Таким образом, PLD по всей видимости вовлечена в передачу сигнала цитокининов от всех рецепторов арабидопсиса, а PLC может быть важна для сигналинга рецептора АНК4. Можно предположить, что фосфолипазы могут запускаться рецепторами через общий посредник. Так, недавно было показано, что рецептор АНК2 способен взаимодействовать с PI4K  $\beta$ 1 – первым ферментом биосинтеза фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (PIP<sub>2</sub>) (Dortay et al., 2006). PIP<sub>2</sub> в свою очередь является субстратом для PLC и активатором многих типов PLD.

Работа поддержана грантами РФФИ 07-04-00331 и 07-04-91211-ЯФ

## ФИЗИОЛОГИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ И ПРОБЛЕМЫ БИОБЕЗОПАСНОСТИ

Кершанская О.И.

Институт биологии и биотехнологии растений, Национальный центр биотехнологии; ул. Тимирязева, 45, Алматы, 050040, Казахстан; тел./факс +7 (327) 2638394  
E-mail: [gen\\_o.kersh@mail.ru](mailto:gen_o.kersh@mail.ru) (Кершанской О.И.)

Генетические модификации фотосинтеза посредством введения генов, кодирующих ферменты  $C_4$  метаболизма из кукурузы в пшеницу, являются первым шагом к трансформации пшеницы на повышение ее урожайности до 30% и созданию новых форм, устойчивых к абиотическим и биотическим стрессовым факторам, которые возможно использовать в качестве модельных систем для исследования физиологии и анатомической структуры трансгенных растений пшеницы.

Методы трансформации пшеницы посредством бомбардмента и *Agrobacterium tumefaciens* были оптимизированы для 5 яровых Американских и 15 яровых и озимых Казахстанских сортов. Разработаны схемы введения гена, кодирующего ключевой фермент  $C_4$  метаболизма – фосфоэнолпируват карбоксилазу (ФЭПК), из кукурузы в пшеницу с использованием современных методов генетической инженерии. Обсуждаются преимущества и недостатки данных методов. Разрабатывается метод germ-line трансформации, основанный на уникальном для пшеницы механизме дистанционного трансфера пыльцы, содержащей большое количество флавоноидных глюкозидов, которые действуют как индусеры *vir* зоны T1 плазмид. Высокий уровень экспрессии этого  $C_4$ -специфического гена кукурузы в трансгенной пшенице подтвержден пробами активности ФЭПК в экстрактах из листьев с последующим ПЦР анализом.

Трансгенные растения пшеницы с интродуцированным геном ФЭПК демонстрировали повышение экспрессии ФЭПК активности, увеличение интенсивности фотосинтетического газообмена листьями, снижение доли фотодыхания при фотосинтетическом поглощении  $CO_2$ . Активизация фотосинтетической функции у трансгенных растений пшеницы связана с повышением устьичной проводимости и увеличением концентрации межклеточной  $CO_2$ , обусловленной открытием устьиц. Результатом повышения концентрации внутриклеточной  $CO_2$  является увеличение фиксации  $CO_2$  из атмосферы и подавление оксигеназной активности РБФК и фотодыхания. Возможно, повышенная экспрессия ФЭПК в guard клетках позволяет фиксацию большей концентрации атмосферной  $CO_2$  в малат в вакуоле, калий движется к guard клеткам, стимулируя осмотический приток воды и повышение тургора для открытия устьиц. Сравнительный анализ изменения анатомической структуры листа при генетической модификации фотосинтеза у трансгенной пшеницы с экспрессией гена ФЭПК, проведенный в сравнении с  $C_3$  контролем – пшеницей и  $C_4$  кукурузой, с последующим измерением анатомических структур срезов, позволил обнаружить признаки проявления синдрома  $C_4$  Кранц анатомии листа у трансгенов пшеницы. Таким образом, впервые доказана уникальная возможность активизации фотосинтетической функции по  $C_4$ -типу метаболизма и проявление признаков Кранц анатомии листа у трансгенных растений пшеницы вследствие введения в пшеницу гена ФЭПК из  $C_4$  кукурузы. Обсуждаются проблемы биобезопасности трансгенных растений в Казахстане.

## **СУПРЕССИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНА ПРОЛИНДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПОВЫШАЕТ НЕСПЕЦИФИЧЕСКУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ**

Колодяжная Я.С., Коваль В.С., Романова А.В., Титов С.Е, Кочетов А.К.

Институт цитологии и генетики СО РАН, пр. Лаврентьева 10, Новосибирск,  
630090, тел.: (383)3333468, факс: (383)3301278  
E-mail: [kovalvs@bionet.nsc.ru](mailto:kovalvs@bionet.nsc.ru) (Ковалю В.С.)

Неблагоприятные факторы внешней среды оказывают отрицательное воздействие на рост и развитие растений, вызывая осмотический и оксидативный стрессы. Растения реагируют на воздействие внешних стрессорных факторов изменением экспрессии генов, интенсивности метаболизма, проницаемости клеточных мембран и др. При стрессовом воздействии на растения в клетках начинают синтезироваться белки, участвующие в транскрипционном контроле, белки теплового шока, совместимые осмолиты (пролин, бетаины, полиамины и т.д.), что обеспечивает нормальное протекание клеточных процессов. Пролин является одним из самых распространенных совместимых осмолитов, считается, что накопление пролина защищает растения от воздействия различных абиотических стрессов. В последнее время активно используются методы генной инженерии, позволяющие изменять содержание пролина и исследовать взаимосвязи этого параметра с устойчивостью растений к различным видам стресса. Нами были получены трансформанты табака, экспрессирующие фрагмент гена пролиндегидрогеназы арабидопсиса, расположенный в антисмысловой ориентации. Анализ трансформантов показал, что генетически модифицированные растения характеризуются увеличенным содержанием пролина и повышенным осмотическим давлением клеточного сока. Благодаря повышенному содержанию пролина изучаемые трансформанты обладают повышенной устойчивостью к его токсичному аналогу (L-азетидин-2-карбоксилловая кислота). Показано, что линии ГМ растений табака, экспрессирующие антисмысловой супрессор гена ПДГ, характеризуются повышенной устойчивостью солевому стрессу. Проводилась оценка устойчивости ГМ растений к засолению (50, 100 и 150 мМ NaCl). Уровень солеустойчивости ГМ растений существенно выше, чем у исходного сорта. В контрольных условиях (без засоления) ГМ растения фенотипически идентичны растениям исходного сорта SR1.

Известно, что уровень пролина увеличивается в присутствии солей тяжелых металлов. Предполагают, что защитное действие пролина обусловлено его взаимодействием с макромолекулами, что приводит к сохранению их пространственной структуры и биологической активности. Поэтому был проведен анализ устойчивости к тяжелым металлам ГМ растений с повышенным содержанием пролина. Показано, что по токсическому действию тяжелые металлы можно расположить в следующий ряд: Cd > Ni > Pb. Во всех случаях ГМ растения показали большую устойчивость, чем растения исходного сорта.

Таким образом показано, что вследствие экспрессии антисмыслового супрессора гена ПДГ повышается уровень пролина, что обеспечивает устойчивость растений к различным абиотическим стрессам. Этот подход может быть использован для модификации растений с целью получения новых форм, устойчивых к стрессовым воздействиям.

## **МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ОСОБЕННОСТИ СПЕКТРА ФЕРМЕНТОВ КРОВИ МЫШАТ, ПОЛУЧАВШИХ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННУЮ СОЮ**

Коновалова М.А., Блинов В.А.

Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И.Вавилова;  
ул. Театральная площадь, 1, 410600, г.Саратов, тел.: (8452)233293, факс:  
(8452)264781

E-mail: [m\\_konovalova@list.ru](mailto:m_konovalova@list.ru) (Коноваловой М.А.)

Ранее нами было установлено негативное воздействие генетически модифицированной (ГМ) сои на мышат, родители которых потребляли ГМ соевый изолят. У некоторых из этих мышат наблюдался экзофтальм, гиперактивность и паралич задних конечностей, гидронефроз.

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния белкового изолята, полученного из ГМ сои (линия 40-3-2 «Монсанто», США) на некоторые морфометрические показатели и ферментный спектр крови мышат первого и второго поколений, полученных от матерей, потреблявших ГМ сою.

Для проведения эксперимента было сформировано три группы. Мышата первой группы получали обычный рацион вивария. Мышата второй группы (первое поколение) получены от самок, потреблявших ГМ сою, а третьей группы – от мышей первой генерации. Подросшие мышата первого и второго поколений получали ГМ соевый белок в количестве 10% от суточного рациона на протяжении 5 месяцев.

Установлено, что потребление ГМ сои ведет к достоверному увеличению массы тела подопытных животных. Особенно отчетливо это прослеживается у мышат 1 и 2 поколения. У мышат 1 поколения увеличение массы составило 16,7% ( $P < 0,2$ ), а у мышей 2 поколения – на 18% ( $P < 0,01$ ). А также мы наблюдали различные отклонения массы внутренних органов. Так, у мышат первого поколения, статистически достоверно уменьшилась селезенка - на 39,5% и увеличилась печень на 18,5% по сравнению с массой тех же органов мышей, получавших обычный рацион.

Нами установлено, что в крови у мышей первого поколения на 65,8% ( $P < 0,005$ ) снизилась активность щелочной фосфатазы и на 35,8% ( $P < 0,001$ ) - активность амилазы по сравнению с животными первой группы, и наметилась тенденция к уменьшению активности ферментов трансаминирования.

Что касается активности ферментов крови мышат второго поколения, то у них наблюдалось снижение активности пероксидазы на 22,2% ( $P < 0,005$ ) и продолжала оставаться низкой (на 23,8%;  $P < 0,01$ ) активность амилазы по отношению к мышам первой группы.

Таким образом, у мышат как первого, так и второго поколений, родившихся от самок, длительно получавших ГМ сою, наблюдалось достоверное увеличение массы тела по отношению к контрольным животным, дисбаланс массы внутренних органов, а также ферментного спектра крови, выразившийся в статистически достоверном снижении активности амилазы, щелочной фосфатазы и пероксидазы.



## **ЗОНЫ, СВОБОДНЫЕ ОТ ГМО, КАК ФЕНОМЕН И ОТВЕТ ГЛОБАЛЬНОГО СООБЩЕСТВА НА РАСПРОСТРАНЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ КУЛЬТУР**

Копейкина В.Б.

Экологический клуб «Эремурус»/Альянс СНГ «За биобезопасность»; ул. Чечулина 16-59, 105568 Москва, тел. (495) 308-89-33, факс -

E-mail: [Eremurus@mtu-net.ru](mailto:Eremurus@mtu-net.ru) (Копейкиной В.Б.)

Широкое распространение генетически модифицированных (ГМ) растений и продуктов из них продолжает оставаться одной из острейших проблем современного общества. Это признано было на самом высоком уровне, в частности, во время встречи с общественностью Президента РФ Владимира Путина на конференции «Гражданская восьмерка» в 2006 году, когда он заявил, что поддерживает требования НПО по регулированию ГМО. Опыт использования ГМ-культур в разных странах позволяет говорить о том, до сих пор отсутствуют данные подтверждающие преимущества ГМ - культур перед традиционными культурами. Уже существуют многочисленные факты негативного влияния ГМО на окружающую среду, здоровье человека и социально-экономическое развитие регионов.

В настоящее время только на территории ЕС более 175 регионов, более 4500 муниципалитетов, а также тысячи фермерских хозяйств объявили себя «свободными от ГМ-организмов (ГМО)», как правило это как минимум означает, введение местных запретов на выращивание трансгенных растений на государственных землях. Движение по созданию зон, свободных от ГМО (ЗСГМО) уже стало всемирным. Такие зоны созданы на всем земном шаре – от Австралии до Ирландии. В целом, Движение ЗСГМО основывается на союзе местных властей, фермерских ассоциаций и неправительственных организаций. Всемирная торговая организация и транснациональные корпорации, заинтересованные в распространение генетически модифицированных сельскохозяйственных культур, пока не имеют прямых механизмов влияния ни на местные власти, ни на общественные организации.

По какой причине зоны ЗСГМО получили в современном мире свое развитие? Не продиктовано ли это желанием людей по привычке противиться всему новому и малоизученному? Масштаб движения и мотивация его участников говорят о том, что у этого уникального всемирного феномена есть серьезные основания. Некоторые аргументы, которые приводят сторонники в пользу создания таких зон:

- местные власти получают возможность избежать практических трудностей, связанных с совместным выращиванием ГМО и традиционных культур, а также избежать возможных затрат;
- участники продовольственного рынка – от фермеров до производителей продуктов питания и дистрибьюторов – смогут сохранить свою репутацию и повысить качество продукции;
- общество получит уверенность, что власти заботятся об окружающей среде и его благополучии, и реальную возможность покупать продукты, не содержащие ГМО.

ГМО являются источником генетического загрязнения диких и культурных растений. В Докладе, опубликованном Центром продовольственной безопасности США в июне 2006 г., анализируются данные отчета Агентства по охране окружающей среды США за 2004 г. В нем, в частности, говорится об обнаружении генетического загрязнения диких растений на расстоянии 13 миль (более 20,9 км) от испытательного участка с трансгенной травой полевицей, тогда как по нормам Департамента сельского хозяйства США для предотвращения такого загрязнения должно было быть достаточно 900 футов (около 275 м). За последние десять лет в различных странах мира зафиксировано более ста фактов подобного загрязнения.

## ВКЛАД ТРАНСГЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В РЕШЕНИЕ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Кузнецов В.В.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая, 35, 127276  
Москва; тел.: (495)9039344, факс: (495) 9778018, E-mail: [vkusnetsov2001@rambler.ru](mailto:vkusnetsov2001@rambler.ru)

Несмотря на то, что применение трансгенных технологий с целью повышения урожайности и «улучшения» качества получаемых продуктов питания вызывает далеко не однозначную оценку, огромная роль трансгенов в изучении фундаментальных вопросов жизнедеятельности растительных организмов ни у кого не вызывает сомнения. В настоящее время невозможно назвать область физиологии растений, в которой использование трансгенных растений не привело бы к получению принципиально новых результатов. Особенно широко и успешно применяются трансгенные растения для изучения структуры и функционирования растительного генома.

Прежде всего, следует отметить важнейшую роль применения трансгенных растений на протяжении последних двух десятилетий для идентификации и изучения цис-элементов промоторов растительных генов. Создание трансгенных растений с 5'- и 3'- делеционными конструкциями регуляторных зон в сочетании с использованием сайт-специфического мутагенеза позволило идентифицировать многие цис-элементы, регулируемые как экзогенными, так и эндогенными факторами. Эти результаты, в свою очередь, способствовали ускоренному изучению транс-факторов, участвующих в регуляции экспрессии генов.

После определения полной нуклеотидной последовательности геномов *Arabidopsis thaliana* L и *Oryza sativa* L, большого количества плазмидных и митохондриальных геномов наступил период так называемой функциональной геномики, то есть определения функции секвенированных открытых рамок считывания, которые кодируют полипептиды или РНК неизвестной биологической функции. Предшественниками новых подходов явились, с одной стороны, трансгенные растения с антисмысловыми конструкциями, которые позволяли снизить или практически исключить экспрессию изучаемого гена, с другой стороны - растения с суперэкспрессией интересующего гена, которые отвечают на вопрос, что произойдет с растением, если продукта изучаемого гена будет в растительной клетке слишком много. Для изучения особенностей органо-, ткане-, видо- и стадиоспецифичной экспрессии генов большую роль имели трансгенные растения, содержащие генетические конструкции из промоторной зоны растительных генов соединенные со структурной зоной одного из маркерных генов.

Совершенно новым исключительно плодотворным оказался Т-ДНК инсерционный мутагенез, который позволяет полностью инактивировать ген за счет встройки обычно в его структурную зону большого фрагмента Т-ДНК с известной нуклеотидной последовательностью (в результате трансформации растений), что приводит к получению так называемых knock out мутантов. Применяемые подходы позволяют получать растения, имеющие такую вставку только в одном гене генома, что дает возможность более точно говорить о влиянии инактивации гена на фенотип растения. Очень важно, что существует международный банк семян таких мутантов *A. thaliana* доступный для всех исследователей. Этот банк постоянно пополняется и не далек тот день, когда, вероятно, будут получены мутанты по каждому из генов *A. thaliana*. В

таких трансгенных растениях можно легко локализовать положение вставки в геноме и клонировать этот ген. В настоящее время получение и анализ трансгенных растений является наиболее эффективным подходом изучения не только функции генов, но и механизмов их замолкания. Таким образом, трансгенные технологии внесли огромный вклад в изучение механизмов регуляции физиологических процессов у растений и их роль в дальнейшем будет постоянно увеличиваться.

Работа поддержана программой Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов», а также грантом НШ-3692.2006.4

## **ИСТОЧНИКИ НАУЧНОЙ НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ ПРИ ОЦЕНКЕ РИСКА КОММЕРЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ И ПРОДУКТОВ ИХ ПЕРЕРАБОТКИ**

Кузнецов Вл.В.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая, 35, 127276 Москва; тел.: (495) 977-94-00, факс: (495) 977-80-18

E-mail: vlkuzn@ippras.ru

Развитие генно-инженерных технологий является одним из важнейших достижений молекулярной биологии и молекулярной генетики, которые открывают перед человечеством огромные перспективы. Эти технологии нашли «постоянную» прописку в фундаментальной науке; они могут сыграть важную роль при генотерапии наследственных заболеваний, создании лекарственных препаратов, производстве фармакологических и косметических средств, получении технического сырья. Значительный прогресс достигнут в сознании генетически модифицированных (ГМ) сортов сельскохозяйственных культур. Широкомасштабное коммерческое использование ГМ сортов растений и полученных из них продуктов допустимо лишь тогда, когда производитель предоставит исчерпывающие доказательства их полной безопасности для здоровья человека и природных биоценозов. Это требование базируется на Международной конвенции по устойчивому развитию и окружающей среде (Рио-де-Жанейро, 1992 г.), принятой мировым сообществом и подписанной Россией, в соответствии с которой вся тяжесть доказательства безопасности ГМО и ГМ продуктов ложится на производителя. Помимо этого многие международные соглашения содержат требование соблюдения принципа принятия мер предосторожности, в соответствии с которым «перед лицом научной неопределенности или отсутствия необходимых знаний лучше ошибиться в сторону избыточности мер безопасности по отношению к здоровью человека и окружающей среде, чем ошибиться в оценке риска» (Минск, 2005, под ред. Ерминшина). В полной мере это требование относится к оценке риска при использовании ГМ сортов растений и полученных из них продуктов. Однако достоверно предсказать вероятность и масштабы возможного негативного воздействия ГМО на человека и окружающую среду в сколь-то отдаленной перспективе крайне сложно из-за наличия большого числа источников научной неопределенности, которая является следствием несовершенства генно-инженерных технологий, недостаточности наших фундаментальных знаний о функционировании и регуляции генома и сложности биологических и экологических систем. К наиболее важным источникам научной неопределенности оценки рисков ГМО, реализуемых лишь на молекулярном уровне, относятся следующие: (1) Непредсказуемость места интеграции рекомбинантной ДНК в геном организма-донора и числа встроенных ее копий; (2) Слабая изученность механизмов регуляции и функционирования генома высших растений; (3) Плейотропный эффект встроенного гена; (4) Нарушение стабильности генома и изменение его функционирования вследствие

трансформации; (5) Нарушение стабильности встроенного в геном чужеродного фрагмента ДНК; (6) Наличие во встраиваемом фрагменте ДНК (генетической конструкции) «технологического мусора» (неполные и дефектные копии плазмид, «незаконные» инсерции, бактериальные и вирусные промоторы и терминаторы, гены устойчивости к антибиотикам и пестицидам; (7) Аллергические и токсические эффекты трансгенного белка. При отсутствии доказательств безопасности ГМО и продуктов их переработки все перечисленные выше и целый ряд других ограничений методов получения ГМО и современных фундаментальных знаний являются источниками научной неопределенности при оценке риска использования ГМО и серьезным основанием необходимости строгого соблюдения принципа принятия мер предосторожности.

## ГЕНЕТИЧЕСКИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ КОРНИ РАСТЕНИЙ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИСТОЧНИК ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ

Кузовкина И.Н., Альтерман И.Е., Вдовитченко М.Ю.

Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН; ул. Ботаническая, 35, 127276 Москва; тел.: (495)9779211, факс: (495)9778018. E-mail: [kuzovkin@ippras.ru](mailto:kuzovkin@ippras.ru)

Ri-плазмида почвенной агробактерии используется в генно-инженерных разработках не только как источник дополнительных векторов при создании определенных конструкций, но и как непосредственный инструмент копирования в лабораторных условиях тех событий, которые постоянно происходят в природе при контактах *Agrobacterium rhizogenes* с подземными частями растений, а именно, направленной индукции образования так называемых hairy roots на explантах опытных растений. Результатом генетической трансформации растений с помощью T-ДНК Ri-плазмиды является получение корневой массы, которая способна практически к непрерывному и интенсивному росту в контролируемых условиях, причем на питательных средах, не содержащих растительные гормоны. Наибольшее внимание исследователей ряда стран сконцентрировано на введении таким путем в культуру *in vitro* корней ценных и редких лекарственных растений, у которых образование физиологически активных вторичных соединений происходит непосредственно в подземной части. К настоящему времени введены в культуру *in vitro* корни более 185 видов двудольных растений, относящиеся к 42 семействам. Ценным качеством полученных таким путем дифференцированных корневых культур, помимо интенсивного роста и быстрого ветвления, является их генетическая стабильность и способность к сохранению синтеза корнеспецифичных вторичных метаболитов в условиях *in vitro*. Недостаток корневых культур, полученных с помощью T-ДНК Ri-плазмиды, состоит в невозможности реализации этого способа генетической трансформации на однодольных растениях и в неспособности корневых культур к вторичному росту (утолщению) в условиях *in vitro*. Корневые культуры, полученные с использованием диких, не модифицированных штаммов почвенной агробактерии, представляют большой практический интерес с точки зрения их биологической безопасности потому, что они не содержат искусственно созданных генетических конструкций и способны к непрерывному росту лишь в строго контролируемых условиях. Независимость роста корневых культур от присутствия в питательной среде ростовых гормонов делает их привлекательным объектом для получения экологически чистого лекарственного сырья нового типа, особенно в случае исчезновения естественно произрастающих ценных лекарственных растений или при неблагоприятном состоянии почвы в регионах, где производится сбор традиционного растительного сырья. Способность корневых культур к синтезу типичных для целого растения вторичных метаболитов, причем в количествах, сравнимых с их содержанием в корнях интактного растения, доказана на примере ряда растений, корни которых входят в коллекцию генетически трансформированных корней растений ИФР РАН. Перспективность использования таких культур как источника альтернативного лекарственного сырья показана на примере исчезающего вида сибирского растения - шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi). Подтверждением целесообразности и биологической безопасности практического применения свойств корневых культур, полученных с помощью T-ДНК Ri-плазмиды, доказывает создание в Германии промышленной фирмы ROOTec, которая планирует широкомасштабное выращивание hairy root культур, инициированных от таких ценных лекарственных растений как *Camptotheca acuminata* и *Linum flavum* для получения дорогостоящих противоопухолевых препаратов, содержащих камптотексин и подофиллотоксин.

## **РИСКИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГМО И НОВЫЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ ЧИСЛЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ НАСЕКОМЫХ – ВРЕДИТЕЛЕЙ**

Куликов А.М.

Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН, Москва, ул. Вавилова, 35.  
Тел.: (095)9527590; Факс: (095)1358012.

E-mail: kulikov@genego.com

Использование биотехнологий и вообще научных достижений в народном хозяйстве является основой устойчивого и прогрессивного развития общества. Однако в каждом конкретном случае необходима строгая научная и экономическая оценка целесообразности и допустимости применения новых разработок. Помимо оценки обоснованных медицинских и экологических рисков, существуют экономические и агротехнические риски использования таких разработок. Долгосрочная экономическая целесообразность применения сортов, устойчивых к вредителям, ставится под сомнение, в связи с быстрым, в течении 2-х – 3-х лет отбором среди этих вредителей форм, обладающих высокой устойчивостью к таким сортам. Показано сокращение биоразнообразия фауны и нарушение пищевых цепей за счет нецелевого действия токсинов, продуцируемых трансгенными сортами, на различные виды насекомых. Экономичность использования ядохимикатов для ГМ-сортов, обладающих повышенной устойчивостью к ним, также является мифом, который развеян опытом применения таких сортов Аргентиной. В общем плане использование ГМ-сортов, предлагаемых международными корпорациями, предполагает (по правилам использования таких сортов, находящихся в чужой интеллектуальной собственности) либо отсутствие собственного семенного фонда, либо ежегодное отчисление прибыли за урожай в пользу собственника.

В мировой научной литературе известны данные, подтверждающие обоснованность пищевых рисков использования ГМО. Отметим, что существуют: риски непосредственного действия токсичных и аллергенных трансгенных белков ГМО; риски, связанные с нецелевым действием трансгенных белков на метаболизм растений; риски, опосредованные накоплением гербицидов и их метаболитов в устойчивых сортах и видах сельскохозяйственных растений; риски горизонтального переноса трансгенных конструкций, в первую очередь в геном симбионтных для человека и животных бактерий, таких как кишечная палочка, кислотолюбивые бактерии и др.

Принципиально новый подход к контролю численности насекомых – вредителей с использованием ГМ-самцов данного вида вредителей, несущих доминантные обусловленные летальные мутации, позволяет избежать практически все перечисленные риски. Создание метода стало возможным с появлением кассетных конструкций, содержащих последовательности тетрациклин – зависимых транскрипционных факторов, специфичных для них промоторов и находящихся под их контролем последовательностей киллерных генов, в том числе токсинов и факторов эмбриональной детерминации. Метод предусматривает автоматический сексинг, или избирательное выживание самцов в ходе массового разведения вредителей на искусственных средах, и постоянную



высокую жизнеспособность самцов – носителей киллерной конструкции, за счет комбинирования различных антибиотиков тетрациклинового ряда и использования разных кассетных конструкций для сексинга и экспрессии киллерных белков в природных условиях. Несомненным плюсом метода является строгая специфичность для конкретного вида вредителей и контроль численности вредителей на локальных территориях, ограниченных сельскохозяйственными угодьями. Вместе с тем метод исключает распространения конструкций в природе за счет 100%-ой гибели гетерозиготного потомства.

## СОЗДАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ ПРОМОТОРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С ИЗМЕНЕННЫМИ РАЗМЕРАМИ ОРГАНОВ

Кулуев Б.Р.

Башкирский государственный университет; ул. Фрунзе 32, 450074 Уфа, тел.:(3472)356088, факс.:(3472)356100. E-mail: [Kuluev@bk.ru](mailto:Kuluev@bk.ru)

При получении трансгенных растений для обеспечения высокоуровневой экспрессии целевого гена, часто используют 35S промотор вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК). Однако эффективности данного промотора для оптимального уровня экспрессии белковых продуктов не всегда достаточно. Кроме того, при получении трансгенных растений, 35S промотор контролирует не только экспрессию целевого гена, но и часто селективного и маркерного генов. При получении трансгенных по нескольким генам растений, число копий 35S промотора возрастает, что может приводить к уменьшению уровня экспрессии, ввиду того, что с данным промотором взаимодействуют одни и те же физиологически активные транскрипционные белковые факторы, ресурс которых исчерпаем. В некоторых случаях описанный выше процесс может приводить к так называемому “молчанию” трансгена. Исходя из этих соображений, были выделены и исследованы родственные 35S промотору промоторы других каулимовирусов, некоторые из которых оказались очень эффективными. Нами также были выделены новые промоторы каулимовирусов, а именно вируса кольцевой гравировки гвоздики (ВКГГ) и вируса мозаики георгина (ВМГ). Эти промоторы показали приблизительно равную с 35S промотором “силу” в трансгенных растениях табака. Промоторы ВМЦК, ВКГГ и ВМГ были переведены в одноцепочечную форму с помощью ДНК-полимеразы фага  $\phi$  29. Полученные цепи ДНК были использованы для создания химерных форм промоторов методом ДНК шаффлинга. Исследуемые промоторы были смешаны во всех возможных комбинациях, и в итоге было получено около 30 ти химерных форм промоторов каулимовирусов, которые были секвенированы и клонированы в фагмидном векторе pKRX. Три химерных промотора были клонированы в вектор pCambia 1304, где они могли управлять экспрессией гена GUS. Была показана транскрипционная активность полученных конструкций в клетках *E.coli* и *A.tumefaciens*. Планируется использовать полученные химерные промоторы для создания трансгенных растений с увеличенными и уменьшенными органами. Для этого нами был амплифицирован и клонирован ген Aintegumenta (ANT) *A.thaliana*, белковый продукт которого, являясь ДНК-связывающим белком, координирует увеличение числа клеток, поддерживая меристематическую компетентность, тем самым, вызывая увеличение органов растения. При создании трансгенных растений с рабочим вариантом этого гена под контролем 35S промотора наблюдалось увеличение всех органов, причем эти данные были получены не только на трансгенных *A.thaliana*, но и с табаком, относящимся к другому семейству, что говорит об определенной универсальности этого гена, а также свидетельствует о его консервативности. Нами же были получены трансгенные растения табака с геном ANT в “антисмысловой” ориентации под контролем 35S промотора, некоторые формы которых, как и ожидалось, сильно отставали в росте в начальный период развития. Это должно быть связано со значительным подавлением на уровне трансляции присутствующих в самом растении эндогенных копий генов ANT.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНА GUS ПОД УПРАВЛЕНИЕМ ПРОМОТОРОВ КАУЛИМОВИРУСОВ В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ И ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА

Кулуев Б.Р.

Башкирский государственный университет; ул. Фрунзе 32, 450074 Уфа, тел.: (3472)356088, факс.: (3472)356100. E-mail: [Kuluev@bk.ru](mailto:Kuluev@bk.ru)

Нами были амплифицированы, клонированы и секвенированы промоторы вируса кольцевой гравировки гвоздики (ВКГГ) [Accession number EF513492] и вируса мозаики георгина (ВМГ) [Accession number EF513491], родственные 35S промотору вируса мозаики цветной капусты из группы каулимовирусов. Для анализа экспрессионной эффективности и сравнения “сил” выделенных нами промоторов с классическим 35S промотором, они были клонированы в бинарном векторе pCambia 1304, где могли управлять экспрессией генов GUS и GFP, одновременно. Этими конструкциями трансформировали компетентные клетки *E.coil* и *A.tumefaciens* и анализировали экспрессию гена GUS при помощи субстрата x-gluc. В качестве контроля использовали не модифицированный вектор pCambia 1304 с генами GUS и GFP под управлением 35S промотора. Все анализируемые промоторные последовательности показали примерно одинаковую активность как в клетках *E.coil*, так и в клетках *A.tumefaciens*. При трансформации протопластов табака этими конструкциями, мы наблюдали приблизительно одинаковый уровень транзientной экспрессии как гена GUS, так и гена GFP для всех трех исследуемых промоторов каулимовирусов. Для анализа экспрессионной активности гена GUS под управлением исследуемых промоторов в трансгенных растениях табака, они были клонированы в бинарные векторы pCambia 1281Z и pCambia 1291Z. Как и ожидалось, исследуемые промоторы, также как и 35S промотор, не проявили тканеспецифичности. Была показана конститутивность и высокая экспрессионная эффективность промоторов ВКГГ и ВМГ. После проведения гистохимического анализа, было осуществлено количественное флюориметрическое определение эффективности промоторов с помощью субстрата 4-MUG. Флюоресценцию, образующегося под воздействием  $\beta$ -глюкуронидазы 4-MU, определили на спектрофлюориметре. Для каждого промотора были отобраны по четыре разных трансгенных растения табака и измерения проводили после 30 мин работы фермента. Концентрацию 4-MU определяли по калибровочной кривой, которую построили заранее. Результаты выразили в виде концентрации образующегося 4-MU в нмоль/л. После определения концентрации тотального белка во всех образцах, разделили полученные результаты на это число (в мг/л) и затем поделили на время работы фермента в минутах. В итоге результаты были выражены в pmol 4-MU мин<sup>-1</sup>мг<sup>-1</sup> белка. Для разных трансгенных растений активность гена GUS различалась, но в среднем для 35S промотора мы получили 482.6 pmol 4-MU мин<sup>-1</sup>мг<sup>-1</sup> белка, для промотора ВМГ: 480.1 pmol 4-MU мин<sup>-1</sup>мг<sup>-1</sup> белка, а для промотора ВКГГ: 442.1 pmol 4-MU мин<sup>-1</sup>мг<sup>-1</sup> белка. По полученным данным можно делать выводы о том, что клонированный нами промотор ВМГ не уступает по экспрессионной эффективности 35S промотору, а промотор ВКГГ немного “слабее” их. Выделенные нами промоторы каулимовирусов могут быть применены при создании трансгенных растений в качестве заменителя 35S промотора, когда возникают проблемы по “молчанию” трансгена.

## TRANSPLASTOMIC PLANTS: OBTAINING AND PERSPECTIVES OF USING

Kuchuk N.V.

Institute Cell Biology and Genetic Engineering,  
Zabolotnoho 148, Kiev 03143, Ukraine

kuchuk@iicb.kiev.ua

The plastid genome has become a very attractive target for genetic manipulation compared to the nuclear genome of the plant for several reasons. Since proteins in plastids may be expressed at a very high level up to 40% TSP. DNA integrates randomly into the nuclear genome of a plant. Integration of heterologous DNA in plastome occurs via homologous recombination mechanism. There is no gene silencing or so-called position effects, so the level of expression is much more predictable. The risk of gene release into the environment is essentially eliminated because chloroplasts do not move into pollen in most agronomically important plants. Since the chloroplast is the site of most important biosynthetic pathways e.g., starch, amino acids and fats, it is relatively easy to insert genes and have them function in the organelle of interest without a need for special targeting sequences.

However, plastid transformation of higher plants has been proven extremely difficult, particularly in agronomically valuable crops. Most transformation methods are species- and variety-specific. Starting with pioneer works with *Nicotiana tabacum* only the few plastomes have been transformed successfully by particle bombardment or PEG treatment of protoplasts. It seems behavior in cell culture of plant species is complex of traits mostly determined by nuclear genome. However, plastomes can be transferred from one plant species to another with using somatic hybridization or sometimes by sexual hybridization. It is finally led to production of so-called cybrids keeping of all main genomic traits including the capabilities to grow and regenerate in plant cell culture like a nuclear donor plant but having the plastids from species of interest. The successful plastid transfer has been shown between species of *Solanaceae*, *Umbelliferae*, *Brassicaceae*, *Rutaceae*, *Compositae*, *Gramineae* families.

To develop transformation methods for plastomes of interest we propose to use cybrids as object for plastid transformation. In our opinion the comparatively restricted number of transformed plastomes are explained by limitations of *in vitro* cultivation of species carrying plastomes of interest as their own. Hereby, we like to propose another idea of plastome transformation work. Many of plastomes can be easily transferred from their own nuclear background on another one producing so-called cybrids. It can be done by somatic hybridization or sometimes by interspecies sexual hybridization. Capabilities to growth and regeneration *in vitro* culture are usually determined by nuclear genome and in many cases phenotypes of cybrids are very similar with nuclear genome donor. Other hand, cybrid's plastome is genetically same as plastome of donor plants and can be easily recovered on own nuclear genome.

It will be discussed the chloroplast transformation of different plastomes of species represented *Solanaceae* and *Brassicaceae* families.

## РЕГУЛЯЦИИ ПЕРЕХОДА К ЦВЕТЕНИЮ ИНСЕРЦИОННЫХ МУТАНТОВ АРАБИДОПСИСА

Миляева Э.Л., Гарлик Ю.А., Романов Г.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая, 35, 127276 Москва; тел.(495) 9039388;

E-mail: e\_milyaeva@mail.ru

Переход растений к цветению является одним из важнейших этапов в жизни растений, во многом определяющий их продуктивность. Хотя поиски физиологических, биохимических, биофизических и молекулярных механизмов, приводящих к зацветанию, велись много десятилетий, эти механизмы до сих пор остаются не вполне ясными.

Согласно гипотезе, выдвинутой М.Х. Чайлахяном, зацветание фотопериодически чувствительных растений происходит под влиянием флоригена - вещества гормональной природы, образующегося в листьях на благоприятном фотопериоде, которое затем транспортируется по флоэме в стеблевые апексы. В последние годы молекулярные генетики подтвердили теорию М.Х. Чайлахяна о мобильном стимуле цветения и выявили целый каскад генов, участвующих в зацветании растений, однако до сих пор точно не установлен характер их взаимодействия и последовательность активации.

Целью нашей работы было изучить особенности роста, развития и цветения двух линий инсерционных мутантов арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) по гену *CONSTANS* (*CO524* и *CO526*), который, как предполагают, может участвовать в образовании стимула цветения. Инсерционные мутанты были получены из Nottingham Arabidopsis Stock Center (Англия). Для их получения был использован метод вакуумной инфльтрации растений арабидопсиса в присутствии *Agrobacterium tumefaciens*, содержащей вектор pROK2. У инсерционного мутанта *CO524* инсерция произошла в 3'-UTR области, а у *CO526* – в 5'-UTR области.

Изучение особенностей роста и развития этих мутантов выявило значительные различия. Количество, размер и скорость роста розеточных листьев у линии *CO526* значительно превосходили дикий тип, а растения линии *CO524* по этим показателям значительно отставали от дикого типа. Зацветание растений дикого типа на длинном дне происходило после образования 8-ми розеточных листьев в возрасте 30 дней. Мутанты *CO524* на длинном дне зацветали уже через 7-8 дней после посева при наличии 6-и розеточных листьев, а мутанты *CO526* - в возрасте 45 дней, их розетка содержала к моменту цветения приблизительно 20-25 листьев.

Таким образом, полученные нами различия в скорости зацветания растений арабидопсиса дикого типа и инсерционных мутантов по гену *CO* свидетельствуют о важной роли этого гена в фотопериодической регуляции перехода растений арабидопсиса к цветению.

## ПРОБЛЕМЫ ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ РОССИИ ПОСЛЕ ВСТУПЛЕНИЯ В ВТО

Монастырский О.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений РАСХН; Краснодар-39, 350039 Краснодар, тел. (861) 2281770, факс (861) 2281787

E-mail: [omon36@mail.ru](mailto:omon36@mail.ru)

В настоящее время на государственном уровне окончательно решен вопрос о вступлении России во Всемирную торговую организацию. Членство в ВТО создает опасные риски для агропромышленного комплекса, который должен обеспечивать продовольственную безопасность и продовольственную независимость страны. Риски обусловлены существующей слабой материальной базой и низкой технологической оснащенностью производства сельскохозяйственного пищевого сырья, пищевых продуктов и кормов. Сейчас АПК обеспечивает только около 60 % государственной потребности в пищевом сырье и продуктах. Нестабильно положение зернового хозяйства – главной отрасли растениеводства и основы продовольственного благополучия страны. Агроэкономическая эффективность производства зерна варьирует по годам с размахом в 1000 %. Наибольшие потери от чрезвычайных ситуаций в сельском хозяйстве – 72,4 % несет зерновое хозяйство. Износ основных средств в растениеводстве составляет 80 %. Энергоемкость производства зерна в 3,5 раза выше, чем в странах ЕС. Отсутствие государственной политики в регулировании зернового хозяйства привело к постоянно возрастающему объему экспорта высококачественного зерна из страны. В период 2006-2007 гг. он составил около 14 млн. тонн, или 20 % от общего производства. Одновременно в 3 раза сократился импорт ценного зерна – улучшателя муки. Доля экспорта составила 73 % от общего объема внутригосударственных перевозок зерна, а в 2000 г. она была 14 %. При этом следует учитывать, что всего 14 субъектов РФ обеспечивает себя зерном и поэтому очень велики межрегиональные перевозки зерна. Российская торговля сильно монополизирована, что приводит к постоянному росту цен на зерно, и соответственно, на все зернопродукты и остальные пищевые продукты. Зерновое хозяйство не отвечает требованиям ФАО, определяющим продовольственную безопасность страны.

Основная деятельность ВТО направлена на развитие экспортноориентированных отраслей сельского хозяйства, где роль России долгое время будет скромной. Стоимость всего нашего сельскохозяйственного экспорта составляет 1,7 % от общемирового, а рост стоимости импорта пищевых продуктов втрое опережает их внутригосударственное производство. Стратегически опасным является то, что Россия импортирует 97 % всех используемых в растениеводстве пестицидов. Доля сельского хозяйства в ВВП снизилась с 6,3 % в 2003 г. до 4,5 % в 2006 г. Уровень господдержки сельского хозяйства в России в 2 раза ниже чем даже в странах ОЭСР.

В настоящее время Россия развивается как страна крупного капитала. Идет быстрая глобализация экономики. В 2000 г. 80 % ВВП создавали 1200 компаний,

а в 2006 г. уже только 500 компаний. Доля малого и среднего бизнеса в России составляет 17 %, а в США – 62 %, Японии – 74 %. Существующие в России 18 млн. личных подсобных хозяйств, которые производят 60 % всей сельскохозяйственной продукции, а вместе с фермерскими хозяйствами и небольшими коллективными хозяйствами дают от всего внутрисударственного производства 90 % картофеля, 70 % мяса, 60 % молока и более 75 % овощей, в силу низкой материальной, финансовой и сбытовой обеспеченности не смогут конкурировать с иностранными поставщиками сельскохозяйственного сырья и продуктов. Сегодня Россия 50 % всех съедаемых овощей и фруктов импортирует. При вступлении в ВТО доля импортируемых всех пищевых продуктов будет возрастать, т.к. страна включится в глобальную систему.

В мире быстро нарастает глобализация систем производства и распределения пищевых продуктов. Они концентрируются в небольшом числе транснациональных корпораций. ВТО в наибольшей степени способствует ТНК в концентрации всех звеньев пищевой цепи: от производства семян до реализации готовой продукции. Так, 10 зарубежных компаний контролируют около 60 % мирового коммерческого производства семян; 5 компаний контролируют 75 % мирового рынка зерна и цены на него; 4 компании контролируют 90 % производства и продажи семян овощных, причем фирма Монсанто – более 30 % и при этом она контролирует 88 % мировых посевов генно-инженерно-модифицированных культур. Более 85 % всей торговли пищевыми продуктами и сырьем контролируют 5 американских, французская, голландская, германская, английская и японская фирмы. Скоро к ним добавится Китай и объем этой глобализированной торговли достигнет более 90 %. Всего 10 ТНК контролируют 90 % всего мирового производства пестицидов и удобрений. Естественно, что все эти компании контролируют и мировые цены и доминируют во всех звеньях пищевой цепи.

После вступления в ВТО Россия полностью попадает в сферу интересов этих фирм, что может привести к депрессии отечественного сельскохозяйственного производства.

Особую опасность для России представляет потеря прав интеллектуальной собственности на сельскохозяйственные технологии, сорта, культуры, семена, которые станут объектом биопиратства. Соглашения по сельскому хозяйству, по санитарным и фитосанитарным мерам, по техническим барьерам в торговле, равно как и другие соглашения не гарантируют России при нынешнем состоянии ее сельского хозяйства ни в переходный период, ни в последующие годы устойчивого развития и продовольственной безопасности и независимости. В стране пока не создана стратегия подготовки агропромышленного комплекса к вступлению ВТО и она не проводится. Россияне будут покупать дешевые импортные продукты, если будут иметь работу.

## СОЦИАЛЬНО-ЭКОНОМИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ РЕГУЛИРОВАНИЯ ОБОРОТА ГМО И ГМИ В РОССИИ

Монастырский О.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений РАСХН, Краснодар-39, ВНИИБЗР, 350039 Краснодар, тел.(861)2281770, факс (861)2281787

E-mail: [omon36@mail.ru](mailto:omon36@mail.ru)

Одним из основных прав человека в цивилизованном обществе есть право знать, что он ест, насколько это полезно и безопасно. Это право распространяется, в первую очередь, на нетрадиционные продукты, которыми являются пищевые генно-инженерно-модифицированные организмы и продукты их переработки. В настоящее время в России они уже могут занимать до 5-7 % в пищевом рационе, но конкретные сведения о их присутствии в пищевых продуктах, как правило, отсутствуют, как отсутствуют и сведения о количестве и ассортименте их содержащих продуктов, находящихся в реализации населению. Даже разрешенные для реализации 13 видов пищевой продукции, полученные с применением ГМО и ГМИ, не маркируются на их наличие. Распространенная иллюзия, что в зарубежных странах существует добровольность маркировки таких продуктов неоправданна опытом стран ЕС, Китая и др. Маркировка таких продуктов введена в 130 странах. В России не созданы стандарты на пищевые продукты, содержащие ГМО и ГМИ. В то же время, эти продукты в большой мере являются источником фальсификации молочных и мясных продуктов, хлебобулочных и кондитерских изделий.

Замена в пищевых продуктах натуральных растительных и животных белков на ГМИ имеют отрицательные социально-экономические последствия. Значительно снижается биологическая полноценность и безопасность таких продуктов, что ухудшает и без того не соответствующий медицинским нормам рацион подавляющего числа россиян. Из государственного оборота изымаются замещаемые ГМИ полноценные белки, жиры и углеводы, последующие пути движения которых неизвестны.

В «Основах государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации до 2010 г. и дальнейшую перспективу» предписывается «Обеспечение безопасности продуктов питания... производимых из генетически измененных материалов...». В стране это положение, как и утвержденная Президентом поправка к закону «О защите прав потребителей» не реализуются и на государственном уровне не предпринимаются серьезные действия к их реализации. Это наносит явный вред конституционным правам российских граждан, т.к. идет фактическое их материальное ограбление, поскольку за фальсифицированные продукты они платят как за натуральные, и разрушение здоровья нации, поскольку медицинские аспекты потребления фальсифицированных продуктов ясны даже в силу потери такими продуктами биологической полноценности.

Проблема контроля оборота в России пищевых продуктов, содержащих ГМО и ГМИ как государственная социально-экономическая проблема не может быть решена сразу для всей страны. Решение этой проблемы должны осуществлять региональные программы качества. Инициацию таких программ и контроль за их выполнением должны осуществлять Министерства с ежегодными отчетами в докладах Президенту страны по их выполнению.



## **АКТИВНОСТЬ ПРОМОТОРА ГЕНА ПАТАТИНА КЛАССА I КАРТОФЕЛЯ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ АРАБИДОПСИСА**

Наумкина Е.М., Романов Г.А.

Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН; ул. Ботаническая, 35, 127276 Москва; тел.: (495)9779409, факс: (495) 9778018

E-mail: gar@ipgras.ru

Промотор гена пататина класса I (V33-промотор) – сильный тканеспецифичный промотор картофеля, экспрессирующий ген пататина главным образом в клубнях. Данный промотор может быть индуцирован в других органах сахарозой или светом. Анализ промоторной активности в условиях гетерологичной экспрессии позволяет выявлять как высококонсервативные универсальные системы регуляции генной активности, так и механизмы, свойственные отдельной группе растений или данному виду. Исследовали активность V33-промотора, соединенного с репортерным геном, в условиях гетерологичной экспрессии в V33::GUS трансгенных растениях арабидопсиса. Объектом сравнения для трансгенного арабидопсиса служил трансгенный картофель с той же самой встроенной конструкцией ДНК (гомологичная экспрессия). Уровень активности V33-промотора количественно определяли флуорометрическим методом на основе активности β-глюкуронидазы (GUS). Установлено, что при гетерологичной экспрессии в проростках арабидопсиса тканеспецифичность и индуцибельность V33-промотора сохранялись, хотя проявлялись иначе, по сравнению с гомологичной экспрессией в картофеле. Основным органом функционирования V33-промотора в неиндуцированном арабидопсисе являлся корень, а наиболее отзывчивыми к воздействию экзогенно добавленной сахарозы органами проростков оказались семядоли. Степень индуцибельности пататинового промотора в проростках арабидопсиса строго органоспецифична и резко возрастала в ряду корень<гипокотиль<семядоли. 10 мМ сахарозы достаточно для повышения во много раз активности V33-промотора в целых проростках. При воздействии 150-250 мМ сахарозы активность V33-промотора в семядолях увеличивалась до 200-300 раз. Известно, что индукция пататинового промотора не является строго сахарозо-специфичной, так как глюкоза и ее аналоги также способны активировать пататиновый промотор. Наши опыты продемонстрировали гораздо большую индукционную способность сахарозы по сравнению с ее прямыми производными: глюкозой и фруктозой. Следует отметить, что при гетерологичной экспрессии различия в индукционной способности сахаров проявлялись сильнее, чем в условиях гомологичной экспрессии. Фитогормоны, влияющие на клубнеобразование у картофеля (гиббереллины, ауксины, цитокинины), не оказали заметного влияния на функционирование V33-промотора в арабидопсисе. При индукции сахарами активации V33-промотора предшествовал лаг-период длительностью примерно 6 ч, что служит указанием на то, что пататиновый промотор не является первичной мишенью для сахарозного сигнала. Этот вывод следует из того, что для генов первичного ответа характерна гораздо более быстрая активация транскрипции, в течение минут или десятка минут после действия индуктора. Выявленные новые

количественные закономерности гетерологичной экспрессии пататинового промотора класса I картофеля способствуют лучшему пониманию его базовых функциональных характеристик и позволяют точнее прогнозировать его поведение при переносе в другие виды растений. Трансгенный арабидопсис предоставляет хорошие возможности для физиологических, молекулярно-биологических и генетических исследований свойств чужеродного промотора/гена.

Работа поддержана программой Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВЕРТИКАЛЬНОГО ПЕРЕНОСА ТРАНСГЕНОВ ОТ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ (ГМ) ГИБРИДОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ К ЕЁ ДИКИМИ РОДСТВЕННИКАМИ

Негрецкий В.А.<sup>1</sup>, Новожилов О.В.<sup>2</sup>, Блюм Я.Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины  
01601, Киев, ул. Терещенковская 2, Украина  
тел/факс 234-3539? e-mail: negretsky@ukr.net

<sup>2</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины  
03134, Киев, ул. Акад. Заболотного, 148, Украина  
тел/факс 266-7104 e-mail: novozhylov@nas.gov.ua

Согласно рекомендациям ОЕСД исследования вертикального переноса трансгенов от ГМ растений к их близким родственникам, приобретение ими преимуществ в конкурентной борьбе за выживание должны проводиться в каждом регионе отдельно, поскольку биологическое поведение одного и того же ГМ вида отличается в зависимости от географических условий и природных ареалов их дикорастущих родственников. В последние годы на северо-западе Европы появилась сорняковая свекла. Это произошло посредством перекрёстного опыления *Beta vulgaris* подвид *maritima* с *Beta vulgaris*. Цветет эта сорняковая свекла на 1-2 месяца раньше чем культурная. Она имеет некоторое преимущество перед культурной и если получит за счет вертикального переноса генов устойчивость к гербициду, борьба с сорняками будет существенно затруднена. Будущее использования трансгенной сахарной свеклы должно быть предсказуемым, и работа с применением методов биологического ограничения соприкосновения трансгенных растений с дикими родственниками на сегодняшний день является актуальной.

Целью нашей работы было изучение возможности гибридизации между трансгенной сахарной свеклой ХМ 1807 (ЕММА RR), устойчивой к гербициду-глифосату (Раундап) и родственным диким видом Вm (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*), а также устойчивости этих гибридов к гербициду. Трансгенный гибрид сахарной свеклы содержал генетическую конструкцию состоящую из синтетического гена EPSPS, созданного на основе гена, изолированного из *Agrobacterium tumefaciens*, гена фермента бета-глюкуронидазы *gus* и гена устойчивости к канамицину *nptII*.

В результате перекрёстного опыления трансгенной сахарной свеклы и дикого родственника Вm получены гибриды F<sub>1</sub> (Вm x ЕММА RR) и F<sub>2</sub> (Вm/ЕММА RR x Вm). Сбор семян проводили индивидуально с каждого семенника. Снижения семенной продуктивности после опыления растений диких форм пыльцой трансгенной сахарной свеклы не отмечалось, что подтверждает их генетическую совместимость. Всхожесть гибридных семян F<sub>1</sub> составила 71%. Отбор по фенотипу раундап-толерантных растений проводили путем опрыскивания растений раствором препарата Раундап в фазе развития 2-3 пар настоящих листков. Количество глифосат-толерантных и неустойчивых к гербициду растений было в соотношении 1 : 1.

Таким образом, генетически совместимые с сахарной свеклой дикие формы могут быть индуцированы трансгеном EPSPS вследствие гибридизации с

глифосат-толерантным материалом. Уровень экспрессии гена в полученных гибридах достаточен для обеспечения устойчивости к рекомендованным нормам расхода гербицида. С целью проверки возможности потери трансгена при переходе на другую генетическую основу из материала F<sub>1</sub> методом сестринских скрещиваний получен F<sub>2</sub> семенной материал. Результаты анализа показали, что трансген интегрируется стабильно, обеспечивая толерантность к обработкам Раундапом у последующих поколений. Гибриды диких сородичей с трансгенной сахарной свеклой проявляли признаки двухлетних травянистых растений. Потенциальный риск использования трансгенной сахарной свеклы в Украине минимален, поскольку дикий родственник *Beta vulgaris* ssp. *maritima* распространен в Крыму и на побережье Черного моря, а основные регионы выращивания сахарной свеклы на Украине находятся в центральной и северо-западной её части.

## ТРАНСФОРМАЦИЯ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ *Thalictrum minus* L. ГЕНОМ *ipt* В СВЯЗИ С СИНТЕЗОМ ПРОТОБЕРБЕРИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ

Осипова Е.А., Смирнова Е.А., Степанова А.Ю.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая, 35,  
127276 Москва; тел.: (495)9039334, факс: (495)9778018,

E-mail: gsc@ippras.ru

Трансгенная культура клеток лекарственных растений может быть использована как источник сырья для получения биологически активных соединений и как модель для изучения регуляции вторичного метаболизма. Кроме того, получение и выделение целевого комплекса из трансгенной культуры клеток растения, не создает экологических и медицинских проблем. Целью нашей работы было получение трансгенной культуры клеток лекарственного растения *Thalictrum minus*. Это растение имеет широкий спектр биологической активности, которая определена наличием в растении протобербериновых алкалоидов, в частности берберина, наиболее изученного из них. Нами применялся агробактериальный метод трансформации штаммом *Agrobacterium tumefaciens*, содержащий плазмиду GV3850Tr4 (целевой ген *ipt* и маркерный ген *nptII*). Ген *ipt* ответственный за активность изопентенилтрансферазы и синтез цитокининов в клетках. По литературным данным, экзогенные цитокинины повышали активность фермента норкоклаурин-О-метилтрансферазы, которая катализирует основной интермедиат в биосинтезе протобербериновых алкалоидов. В нашей работе проводили трансформацию 4-5-недельной каллусной культуры, что соответствовало середине ростового цикла, на газоне и в суспензии агробактерии. В суспензии агробактерии оценивали длительность инкубирования с клетками растения и влияние возраста бактериальной суспензии от одного до трех суток. В течение первых двух суток наблюдали увеличение плотности бактериальной суспензии, и ее снижение - к третьим. Эффективность метода агробактериальной трансформации каллусной культуры определяли по канамицинуустойчивости (90 мг/л) и методом ПЦР. Было выявлено, что наиболее эффективной для трансформации является односуточная суспензия при длительности инкубирования - одни сутки. С увеличением возраста до двух суток канамицинустойчивых каллусных линий получено не было, а при инкубировании в течение двух суток канамицинустойчивые линии получены были, но с эффективностью в три раза ниже. С увеличением возраста и длительности инкубирования до трех суток эффективность трансформации вновь повышалась, но не достигала уровня односуточной бактерии при суточном инкубировании. Эффективность канамицинустойчивости в лучшем варианте составила 10%. Трансформация на газоне была менее эффективной, на уровне 2%. Таким образом, можно отметить, что на эффективность трансформации оказывает влияние длительность инкубирования в суспензии агробактерии и ее плотность. Методом ПЦР показано, что 90% канамицинустойчивых каллусных линий содержали ген *ipt*. Из полученных трансгенных каллусных линий шесть проверяли на содержание протобербериновых алкалоидов. У всех из них содержание

протобербериновых алкалоидов было выше, чем у исходного (нетрансформированного каллуса) в 2-3 раза. Таким образом, была разработана эффективная схема агробактериальной трансформации каллусной культуры *Thalitrum minus* и получены трансгенные каллусные линии с более высоким уровнем содержания протобербериновых алкалоидов.

## ВЛИЯНИЕ ГИББЕРЕЛЛИНА НА ЗАЦВЕТЕНИЕ МУТАНТОВ АРАБИДОПСИСА ПО ГЕНУ *CONSTANS*

Петрова М.А., Миляева Э.Л., Романов Г.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая 35, 127276 Москва; тел.(495)9039388; e-mail: [e\\_milyaeva@mail.ru](mailto:e_milyaeva@mail.ru)

В настоящее время изучение перехода растений к цветению проводится на основе молекулярно-генетических методов, которые позволяют выявить основные гены, участвующие в переходе к цветению. Предполагается, что очень важно взаимодействие генов цветения между собой и с внешними факторами, такими как: фотопериод, температура и воздействие гиббереллином. Согласно гормональной теории цветения академика М.Х.Чайлахяна, зацветание растений происходит под влиянием флорального стимула, образующегося в листьях на благоприятном фотопериоде и передвигающегося в стеблевые апексы. Одним из компонентов этого стимула является фитогормон гиббереллин. По современным молекулярно-генетическим концепциям, гиббереллин ускоряет цветение *Arabidopsis thaliana* L., вызывая активацию гена *LEAFY*, функционирующих в стеблевых апексах.

Целью нашей работы было выявление особенностей перехода к цветению мутантных растений *Arabidopsis thaliana* L. под влиянием обработки гиббереллином.

Объектами исследования были количественно длиннодневные растения мутантных линий по гену *CONSTANS*, который является ключевым для фотопериодической реакции цветения. В работе использовали растения дикого типа экотипа Columbia и его мутанты №3325, №3122 и дикого типа экотипа Lansberg erecta и его мутанты №176, №179. Семена получены из Nottingham Arabidopsis Stock Center (Великобритания). Все мутанты отличались различной степенью задержки цветения.

Мы сравнивали скорости зацветания растений дикого типа *Arabidopsis thaliana* L. расы Columbia на длинном и коротком дне и мутантных растений *Arabidopsis thaliana* L. расы Columbia и линии Lansberg Erecta на коротком дне. Гиббереллин наиболее эффективно повлиял на ускорение цветения растения дикого типа: ускорение составило 41 день. Также было ускорено цветение мутантов 3122 и 3325: ускорение составило 17 и 30 дней, соответственно. На 11 дней гиббереллин ускорил зацветание мутанта 176, но практически не повлиял на сроки цветения мутанта 179.

В результате проделанной работы установлено, что цветение мутантов по гену *CO* ускоряется гиббереллином. Степень ускорения зависит от особенности мутации, и, соответственно, от генетического статуса растений. Разная скорость зацветания мутантов при обработке гиббереллином, вероятно, свидетельствует о том, что при переходе к цветению гиббереллин способствует экспрессии не только гена *LEAFY*, локализованного в стеблевых апексах, но и, по-видимому, связан с цепью генов фотопериодической индукции цветения, главным из которых является ген *CO*.

## **ПРИМЕНЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *Arabidopsis thaliana* L. DR5::GUS ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ ИУК**

Пожванов Г.А., Батов А.Ю., Медведев С.С.

Биологический НИИ СПбГУ; Ломоносовское ш., 2, Ст. Петергоф, 198054, Санкт-Петербург, тел.: (812)4506288, факс.: (812)4507310

E-mail: [pozhvanov@gmail.com](mailto:pozhvanov@gmail.com) (Пожванову Г.А.)

Широко распространённые в настоящее время трансгенные растения, трансформированные конструкцией с гормон-чувствительным промотором, с успехом применяются для изучения локализацию соответствующего фитогормона в ткани. Среди таких трансформантов наиболее часто используются DR5::GUS-трансгенные растения с репортерным ферментом глюкоксидазой. Присутствие фитогормона легко выявляется с помощью гистохимической реакции GUS, но до сих пор было возможно лишь качественное определение присутствия гормона.

Целью работы являлась разработка метода, позволяющего количественно анализировать содержание ИУК в ткани с помощью компьютерных микрофотографий растений, гистохимически окрашенных на GUS-активность.

Объектом исследования служили 7-дневные проростки *Arabidopsis thaliana* L. DR5::GUS, выращенные на агаризованной питательной среде с различной концентрацией ИУК. Гистохимическое окрашивание корней производили по методике R. Jefferson с помощью реактива X-Glc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucopyranoside, Fluka № 16667). Микрофотосъёмку образцов производили зеркальной цифровой фотокамерой Canon EOS 350D, монтированной на микроскоп Биолам Р13 (ч/з МФН-11). Компьютерный анализ изображений производили в программах ImageJ и Adobe Photoshop CS2.

Показано, что отклик по каналам цифрового изображения зависит от концентрации ИУК в среде, отклик в канале R достоверно увеличивается с ростом концентрации ИУК и отличается от отклика в каналах G и B. Получено математическое выражение зависимости значений в R от концентрации ИУК в среде от  $10^{-8}$  до  $10^{-5}$  М. Проиллюстрированы возможные варианты применения предлагаемого метода на примере исследования количественных характеристик перераспределения ИУК в кончике гравистимулированного корня арабидопсиса.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 05-04-49619.



## **ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР: СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

Поляков А.В., Чикризова О.Ф., Зонтикова С.А.

ГНУ ВНИИ овощеводства Россельхозакадемии; 140153, Московская обл.,  
Раменский район, Верея, 500; тел.: (496)4624413, факс: (496)4624364  
E-mail: [pakao@mail.cnt.ru](mailto:pakao@mail.cnt.ru) [vita100plus@yahoo.com](mailto:vita100plus@yahoo.com) (Поляков А.В.)

В последние годы в США, Канаде, Китае и ряде других стран широко возделываются генетически модифицированные организмы (ГМО) для производства пищевых продуктов, кормов и сырья для изготовления тканей, бытовой химии, смазочных и других материалов.

Посевные площади, занятые под трансгенными сортами сои, кукурузы, хлопчатника, сахарной свеклы, картофеля, рапса, льна масличного увеличиваются из года в год примерно на 10%, а число вновь созданных трансгенных сортов и культур растет еще стремительнее. В большинстве стран мира начаты и активно ведутся разработки по созданию и изучению генетически модифицированных плодовых, ягодных, декоративных, а также овощных и бахчевых культур. Наиболее часто, в качестве объекта трансформации, используют томат, капусту, редьку, горох, перец, баклажан, салат, морковь, огурец, тыкву, дыню спаржу, горох, фасоль. Главным направлением по трансгенезу овощных культур является создание сортов устойчивых к гербицидам (томат, капуста белокочанная, перец, морковь, горох, спаржа, салат) и вирусам (томат, кабачок, огурец, дыня, перец, горох, фасоль, салат), Большое внимание уделяется созданию растений, устойчивых к насекомым (томат, капуста белокочанная, баклажан, горох), фитопатогенным грибам (томат, морковь), бактериям (томат, дыня), повышенной концентрации солей в почвенном растворе (дыня), повышенной лежкости плодов (томат, перец, дыня), растений с улучшенным аминокислотным составом (фасоль), пониженным содержанием нитратов и повышенным содержанием железа (салат), созданию форм с мужской стерильностью (кабачок, капуста белокочанная).

Из всего разнообразия разработанных методов переноса чужеродной генетической информации при создании трансгенных растений овощных культур наиболее широко применяются методы агробактериальной и биобаллистической трансформации, переноса чужеродных генов с помощью пыльцы. Методы же, предусматривающие прямое введение генов в изолированные протопласты, упаковку ДНК в липосомы, микроинъекции ДНК, электропорацию, использование векторов на основе вирусов, вакуумную инфльтрацию ДНК в незрелые соцветия, трансформацию хлоропластов, создание цистенных растений, не получили должного распространения.

Современные методы позволяют манипулировать с геномами в широком диапазоне, в частности, вводить в геном растений искусственно синтезированные гены, гены, изолированные из человека, животных, рыб, микроорганизмов. Это настораживает общественность и не всегда оправдано с биологической точки зрения. На данном этапе при создании трансгенных растений, используемых в пищу и корм необходимо шире использовать огромное разнообразие генов и коадаптированных генных блоков, созданных природой и нашедших распространение в культурной и дикой флоре.

## ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ Vt-ГЕНОМ

Пузина Т.И., Король В.В.

Орловский государственный университет; ул. Комсомольская 95, 302026 Орел, тел.:(4862)777332, факс:(4862)777318

E-mail: prudnicov@inbox.ru (Пузина Т.И.)

Используя исходные и трансгенные растения картофеля сорта Суперитор, было проанализировано содержание и соотношение фитогормонов и их влияние на элементы продукционного процесса. В опытах использовали выращенные в лабораторных условиях и почвенной культуре (вегетационные опыты) растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.). Трансформированные Vt-геном растения, выделенным из почвенной бактерии *Bacillus thurengiensis* и встроенным с маркерным геном npt-II, были предоставлены ВНИИ картофельного хозяйства (Коренево). Иммуноферментный анализ фитогормонов показал, что апикальные глазки клубней трансгенных растений, находящихся в состоянии вынужденного покоя, содержат значительно больше абсцизовой кислоты, меньше зеатина и ИУК. Соответственно, было ниже и соотношение фитогормонов (зеатин/АБК – 0,23 против 0,71 у исходных растений, ИУК/АБК – 0,09 против 0,25). На этом фоне покоящиеся глазки трансгенов характеризовались меньшей интенсивностью дыхания и более длительным пребыванием в состоянии покоя. К концу третьих суток прорастания почек апикальных глазков отмечено снижение уровня АБК у растений с Vt-геном, однако соотношение зеатина и ИУК к АБК оставалось ниже контрольных растений. Предобработка клубней сернокислым цинком ( $3 \cdot 10^{-3}$ М) повысила соотношение фитогормонов с положительным знаком действия к АБК до уровня исходных растений, что способствовало переходу трансформантов к более активному росту. Листья модифицированных растений, в отличие от прорастающих глазков, содержали меньше АБК против исходных, поэтому соотношение ИУК/АБК несколько увеличилось. Одновременно возросла фотосинтетическая активность (фотофосфорилирование, интенсивность фотосинтеза), однако продуктивность трансгенных растений была на 23% ниже исходных, что возможно связано с уменьшением транспорта ассимилятов в формирующиеся клубни.

## ПРОБЛЕМЫ, ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРИ СОЗДАНИИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ – ПРИ ТРАНСФОРМАЦИИ, НАСЛЕДОВАНИИ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ ГЕНОВ, А ТАКЖЕ ПРОБЛЕМА СОХРАНЕНИЯ ПРИОБРЕТЕННЫХ ПРИЗНАКОВ В ХОДЕ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *in vitro* (НА ПРИМЕРЕ РАСТЕНИЙ РОДА *Brassica* И *Linum*)

Ралдугина Г.Н., Кунда М.С., Белоногова М.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая, 35, 127276 Москва; тел.: (495)9039334, факс: (495)9778018. E-mail: [galina@ippras.ru](mailto:galina@ippras.ru)

Как известно, для создания генетически модифицированных растений кроме наличия подходящих векторов для внедрения чужеродных генов в реципиентные растительные клетки необходимо соблюдение ряда требований, таких как выбор подходящего для трансформации данного вида растения экспланта, отбор растений с сильной экспрессией введенных генов, а также тех, в которых наследование введенных генов было бы стабильным и не происходило их элиминирования. Если эти требования не актуальны для, так называемых, «модельных» растений, таких как табак или *Arabidopsis*, то они очень существенны для сельскохозяйственно-значимых растений.

Целью нашей работы было получение трансгенных растений родов *Brassica* и *Linum*, трансформированных генетическими конструкциями, содержащими различные гены. Все использованные конструкции содержали селективный ген устойчивости к канамицину *nrpII*, а также маркерные (*gfp*, *gus*) и/или целевые гены. Трансформацию и *B. napus*, и *B. juncea* и *B. campestris*, а также *Linum usitatissimum* проводили методом совместного культивирования растительных эксплантов с агробактериями, находящимися на агаризованной питательной среде (метод «газона» по С. Даниловой).

Нами было показано, что для представителей этих родов наиболее существенным для трансформации является выбор экспланта, на котором бы не образовывались химерные растения. Было показано, что такими эксплантами являются семядоли 5 – 7-дневных проростков, на которых с достаточно высокой эффективностью образуются регенеранты.

После селекции в каждом из опытов были отобраны трансгенные растения с наилучшей экспрессией встроенных генов, с которыми и продолжалась дальнейшая работа по изучению их свойств.

Было показано, что из полученных нами разнообразных линий трансформантов рапса (*Brassica napus*) с различными встроенными конструкциями большинство из них в процессе длительного культивирования *in vitro* полностью сохранили признаки, полученные в результате трансформации, что подтвердило их истинную трансгенность. К сожалению, для трансформантов льна подтвердить эти данные не удалось, так как лен не размножается черенкованием *in vitro*.

При изучении последующих поколений полученных трансформантов как рапса, так и льна было показано, что встроенные гены, содержащиеся в одной конструкции, могли наследоваться как вместе, так и отдельно, что усложняет отбор в потомстве трансгенных растений, содержащих оба встроенных целевых гена. Таким образом, подтверждается необходимость проверки при отборе растений-потомков полученных трансформантов по всем встраиваемым генам, а не только по селективному признаку, как это обычно практикуется.

## **ЗАКОНОДАТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ОХРАНЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ТРАНСГЕННЫХ СОРТОВ РАСТЕНИЙ И ПОРОД ЖИВОТНЫХ**

Роговский Ю.А.

ФГУ «Государственная комиссия Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений», отдел Методики, тел.: (495) 207 6827.

E-mail: gossort@gossort.com

Законодательство Российской Федерации по охране сортов растений и пород животных соответствует Акту 1991 г. Международной конвенции по охране новых сортов растений. В настоящее время – это Закон РФ «О селекционных достижениях», а с 1 января 2008 г. – часть четвертая Гражданского кодекса РФ. Россия является членом Международного союза по охране новых сортов растений (УПОВ) с 24 апреля 1998 г.

Сорта растений и породы животных не могут охраняться патентом на изобретение, но могут охраняться патентом на селекционное достижение.

Охрана может быть предоставлена на сорта растений и породы животных всех ботанических и зоологических родов и видов, отвечающие требованиям по новизне, отличимости, однородности, стабильности (ООС) и удовлетворяющие требованиям по их наименованию. Обязательна уплата патентных пошлин. Предъявление дополнительных условий для предоставления охраны недопустимо.

Биоинженер вправе безвозмездно использовать охраняемый сорт для создания трансгенного сорта и получить на него патент. Однако к такому трансгенному сорту, являющемуся сортом, существенным образом наследующим признаки охраняемого (исходного) сорта, применяются права патентообладателя исходного сорта. Биоинженеру при использовании своего сорта потребуются обратиться за лицензией к патентообладателю исходного сорта.

По трансгенным селекционным достижениям начало проведения полевых испытаний на ООС возможно лишь при наличии свидетельства о биобезопасности. Таких свидетельств два от 20 марта 2002 г. на два устойчивых к колорадскому жуку сорта картофеля фирмы Монсанта: Супериор Ньюлиф и Руссет Бурбанк Ньюлиф. Эти сорта отвечают требованиям охраны и на них выданы патенты, но они не были допущены к использованию на территории РФ, так как оба сорта показали низкую хозяйственную ценность.

На рассмотрении находятся заявки на выдачу патента от Центра «Биоинженерия» на три ГМ сорта картофеля: Невский плюс, Елизавета плюс и Луговской плюс. Из-за отсутствия свидетельств о их биобезопасности работа с ними в открытой среде в настоящее время не проводится.

Чтобы выращивать трансгенный сорт на территории России, необходимо получить свидетельство о биологической, пищевой и экологической безопасности этого сорта, а также решение о его включении в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Трансгенных сортов растений и пород животных в названном реестре сейчас нет.

К большому сожалению, в части четвертой Гражданского кодекса РФ по охране интеллектуальной собственности отсутствует положение о порядке допуска селекционных достижений к использованию.

Необходимо добиваться, чтобы положение о Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию, было включено в Федеральный закон «О семеноводстве» и Федеральный закон «О племенном животноводстве».

Однако, похоже, существует лобби по беспрепятственному завозу в Россию любой сельскохозяйственной продукции, в том числе любых семян сортов растений, что чревато почти беспрепятственному поступлению семян трансгенных сортов.

## ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ – ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГЕПАТИТА В

Рукавцова Е.Б., Шульга Н.Я.<sup>1</sup>, Бурьянов Я.И., Гапеева Т.А.<sup>2</sup>, Волоотовский И.Д.<sup>2</sup>

Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова; пр. Науки, 6, 142290 Пущино; тел.: (4967)730921; факс: (4967)330527

<sup>1</sup>Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений; ул. Грина, 7, 113916 Москва; тел.: (095)7120936; факс: (095)3885727

<sup>2</sup>ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»; ул. Академическая, 27, 220072 Минск, Белоруссия; тел.: (1037517)2841568; факс: (1037517)2842359

E-mail: [ruk@fibkh.serpukhov.su](mailto:ruk@fibkh.serpukhov.su) (Рукавцовой Е.Б.)

Нами получены растения табака, экспрессирующие рекомбинантный ген поверхностного антигена вируса гепатита В (*HBsAg*) под контролем одинарного и двойного промоторов 35S РНК вируса мозаики цветной капусты, а также под контролем гибридных агробактериальных промоторов (Aocs)<sub>3</sub>AmasPmas. Проведено сравнение уровня синтеза поверхностного антигена вируса гепатита В в трансгенных растениях, экспрессирующих ген *HBsAg* под контролем различных промоторов. Количество HBs-антигена в растениях с геном *HBsAg* под контролем промоторов (Aocs)<sub>3</sub>AmasPmas было максимальным в корнях растений и достигало 0.01% от общего растворимого белка. Количество HBs-антигена в растениях с геном *HBsAg* под контролем двойного промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты оставалось одинаковым во всех органах растений и достигало 0.06% от общего растворимого белка. На основе растений с геном *HBsAg* получены культуры каллусов и «косматых корней», синтезирующие HBs-антиген.

Получены трансгенные растения картофеля, экспрессирующие ген *HBsAg* под контролем двойного промотора CaMV 35SS и промотора гена пататина клубней картофеля. Количество поверхностного антигена вируса гепатита В в листьях, микроклубнях и клубнях трансгенных растений картофеля, выращенных в условиях *in vitro* и *in vivo*, составляло до 0,05% от общего количества растворимого белка. Содержание HBs-антигена в клубнях картофеля достигало 1 мкг/г массы клубня и было максимальным в растениях, экспрессирующих ген *HBsAg* под контролем двойного промотора CaMV 35SS.

Для увеличения степени экспрессии HBs-антигена в клетках трансгенных растений, проведен химический синтез гена *HBsAg* в соответствии с частотой использования триплетных кодонов в растениях. Проводится трансформация растений генетическими конструкциями, содержащими оптимизированный для растений ген *HBsAg*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Динамика генофондов растений животных и человека", а также грантов РФФИ № 05-08-01473 и 06-04-81022.

## ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ АНТИТЕЛ К HER1 (EGFR)

Семенюк Е.Г.<sup>1</sup>, Стрёмовский О.А.<sup>2</sup>, Ширшикова О.В.<sup>1</sup>, Эдельвейс Э.Ф.<sup>2</sup>,  
Глоба Е.Б.<sup>3</sup>, Баландин Т.Г.<sup>2</sup>, Носов А.М.<sup>3</sup>, Бурьянов Я.И.<sup>1</sup>, Деев С.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; пр. Науки, 6, 142290 Пущино; тел.: (4967)730921; факс: (4967)330527

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ул. Миклухо-Маклая, 16/10, 117997 Москва; тел.: (495)3305692; факс: (495)3350812

<sup>3</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая, 35, 127276 Москва; тел.: (495)9779400; факс: (495)9778018

E-mail: [centaurea@mail.ru](mailto:centaurea@mail.ru) (Семенюк Е.Г.)

Осуществлена экспрессия одноцепочечных (scFv) антител большой клинической значимости, направленных против белка - опухолевого маркера HER1 (EGFR) в трансгенных растениях, суспензионных клеточных культурах и культурах косматых корней (hairy roots) *Nicotiana tabacum*. Для агробактериальной трансформации растений была использована генетическая конструкция, включающая гены переменных доменов антител к HER1 и бактериального белка барстара. Конститутивная экспрессия слитых генов контролировалась двойным промотором CaMV 35S.

Разработан оригинальный метод количественной оценки содержания целевого белка в клетках трансгенных растений, основанный на иммунодетекции взаимодействия барстара с его клеточным партнером – белком барназой. Показано, что в белковых экстрактах растений различных трансгенных линий содержание антител составляет 0.001-0.05% от общего растворимого белка (ОРБ).

Для выделения антител из растительного материала использована реакция аффинного взаимодействия слитого с антителами барстара с барназой-His<sub>6</sub>, иммобилизованной на колонке с Ni-NTA-сефарозой.

Функциональная активность очищенных антител подтверждена при помощи FACS-анализа и иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием клеток линии A431, содержащих на поверхности рецептор HER1 в количестве 0.5-3x10<sup>6</sup> на клетку.

Уровень синтеза одноцепочечных антител в клетках трех линий трансгенной суспензионной культуры был приблизительно одинаков. В среднем количество антител, синтезируемых суспензионными культурами, варьировало в пределах 0.001-0.006 % от ОРБ клетки в период активного роста культуры, а во время стационарной фазы роста (14-15 сутки) уровень синтеза антител снижался по крайней мере в три раза. После повторной трансформации трансгенных растений, экспрессирующих рекомбинантные антитела, диким штаммом *Agrobacterium rhizogenes* A4 получены три линии культуры косматых корней, в клетках которых также показано присутствие антител.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 05-04-48399.

## ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРОИЗВОДСТВА ГЕННО-ИНЖЕНЕРНО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ (ГМР): МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ И ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ РЕШЕНИЯ

Соколов М.С., Марченко А.И., Боровик Р.В.

(ФГУН Центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов ФМБА,  
Россия, 142253, г. Серпухов Московской обл., ул. Ленина, 102А;

E-mail: [toxic@online.stack.net](mailto:toxic@online.stack.net))

Требования **биобезопасности производства ГМР** включают *медико-биологические, ветеринарно-санитарные и экологические (эколого-токсикологические)* аспекты. Посевы ГМР – важный средообразующий фактор, ранее отсутствовавший в агросфере. Производство ГМР можно считать экологичным при поддержании биоразнообразия агроландшафта и сохранении его функциональных генетических ресурсов. Реализуется ли это на практике пока подтвердить затруднительно, поскольку критерии **экологической оценки безопасности производства ГМР**, обязательные при их государственной регистрации, как **на международном уровне, так и в РФ до сих пор не согласованы**. В то же время, государственная экологическая экспертиза ГМР должна базироваться на научно обоснованных критериях, объективно учитывающих основные риски их производства. Чтобы их минимизировать, а также исключить субъективизм эспертов, следует неукоснительно осуществлять перманентное, законодательно санкционированное **государственное регулирование производства ГМР**. При этом имеется в виду следующее. 1. **Оценке подлежит каждый вид ГМР**, отличающийся от изогенного аналога одной и/или несколькими трансгенными вставками. 2. На всех этапах оценки ГМР должны неукоснительно реализовываться: а) **принцип единственного различия**, б) **“принцип соответствия” их изогенному аналогу**, в) вариант **“отрицательный контроль”** (в опытах с теплокровными тест-животными). 3. К оценке инсектицидных *Bt*-ГМР должны **предъявляться требования не ниже принятых при госрегистрации микробных *Bt*-препаратов**. 4. Основные показатели оценки экологической безопасности ГМР по значимости и последовательности реализации группируются в блоки: а) **“долгосрочное действие на теплокровных”**, б) **“экологическое тестирование”**, в) **“экологическое моделирование и прогнозирование”**. Входящие в их состав критерии должны: быть экономически приемлемыми, не дублировать показатели медико-биологической и ветеринарно-санитарной оценок, обеспечивать получение воспроизводимых данных в любое время года. 5. Протоколы (методики) экологической оценки ГМР **должны быть максимально гармонизированы** с уже действующими международными документами, регламентирующими производство и оборот ГМР. 6. По получении временной регистрации на производство ГМР их разработчик обязан осуществлять пострелизный мониторинг всех производственных посевов. 7. Государственные законодательные акты регулирования оборота и производства ГМР **должны быть законами прямого действия**. Концептуальный подход к обсуждаемой проблеме и общая методология экологической оценки *Bt*-ГМР подробно изложены нами ранее (Соколов М.С. и др. ж. «Агрохимия», 2006, № 9). Предложены 11 **агроэкологических и эколого-гигиенических критериев**, сгруппированных в блоки. По



блоку **”долгосрочное действие на теплокровных”** предлагается оценивать: *хроническую токсичность ГМР, их аллергенность, иммунотоксичность и мутагенность*. При этом оценке подлежит вся надземная фитомасса ГМР. В случае положительной реакции хотя бы по одному из названных показателей ГМР снимаются с испытаний. Создаваемая в интересах отечественного агропроизводства и законодательства современная **нормативно-методическая база государственного регулирования оборота, безопасного производства и пострелизного мониторинга ГМР** может быть успешно реализована в России только при условии консенсуса трех основных государственных ведомств, ответственных за регистрацию и рациональное (эффективное и безопасное) производство ГМР – Минсельхоза, Минздравсоцразвития и Минприроды.

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ПШЕНИЦЫ

Терешонок Д.В., Степанова А.Ю., Осипова Е.С., Долгих Ю.И.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая, 35,  
127276 Москва; тел.: (495)9039334, факс: (495)9778018

E-mail: [gsc@ippras.ru](mailto:gsc@ippras.ru)

Затопление является одной из существенных проблем, приводящей к потере урожая сельскохозяйственных культур, так как подавляющее большинство из них неустойчивы к переувлажнению почвы. Для получения устойчивых к затоплению растений в последнее время применяются современные методы биотехнологии, в частности, генетическая инженерия. В нашей работе для трансформации использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens*, несущий в качестве целевого - *ipt* ген (изопентениладенин трансфераза – ключевой фермент биосинтеза цитокинина). В литературе имеются данные о положительном влиянии экзогенных цитокининов при затоплении растений, в связи с чем было выдвинуто предположение, что повышение уровня эндогенных цитокининов повысит устойчивость растений при затоплении. Трансформированные растения пшеницы получали разработанным нами методом, при этом в качестве эксплантов использовали семена, что значительно упрощало процедуру трансформации, так как отсутствовала стадия каллуса. Для подтверждения встраивания и экспрессии чужеродного гена проводили ПЦР и ОТ-ПЦР, соответственно. Растения пшеницы, содержащие ген *ipt*, отличались от контроля по ряду морфологических характеристик. Трансформанты первой группы по общей высоте растения превосходили контроль на 26,4%, напротив, трансформанты второй группы по общей высоте растения в среднем уступали контролю на 37,9%, у данной группы растений происходило образование стерильных колосков или же их не было вовсе. Трансформанты обеих групп превосходили контроль по диаметру стебля и максимальной ширине листовой пластинки. Кустистость у первой и второй группы трансформантов была в 3,2 и 5,5 раз выше чем у контроля. Цвет листьев трансформантов был темно-зеленый, а контроля светло-зеленый. Отличия трансформантов от контроля и между собой, возможно, связаны с разной экспрессией встроенного гена и, соответственно, с разным уровнем цитокинина в растениях. По предварительным данным трансформированные растения показали более высокую устойчивость к корневому затоплению по сравнению с контролем, что свидетельствует о защитном действии цитокининов при стрессе.

## РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЬЯХ ТРАНСГЕННОГО *Arabidopsis thaliana* L.

Федорин Д.Н., Бондаренко М.А, Попов В.Н., Епринцев А.Т.

Воронежский государственный университет; Университетская пл., д.1., 394006, Воронеж; тел.: (4732)208877, (4732)208755

E-mail: [bc366@bio.vsu.ru](mailto:bc366@bio.vsu.ru), [rybolov@mail.ru](mailto:rybolov@mail.ru)

Использование генмодифицированных организмов в научных исследованиях дает большую перспективу для создания целостной картины происходящих процессов в клетке на основе изучения отдельных ее компонентов. Применение мутантных форм организмов является важным для изучения вклада отдельного компонента генетической системы в адаптации организма к стрессовым условиям и тд. Знание механизмов регуляции клеткой конструктивного и энергетического метаболизма находит применение в повышении урожайности культурных растений. Для решения этой задачи использовали в качестве объектов исследования генмодифицированные организмы, в генетическом аппарате которых отсутствует ген, кодирующий один из типов фитохромов. В связи с этим целью данной работы явилось изучение роли фитохромной системы в регуляции экспрессии сукцинатдегидрогеназы в листьях арабидопсиса.

Полученные данные по влиянию светового режима на функциональное состояние сукцинатдегидрогеназы (СДГ, КФ. 1.3.99.1) свидетельствуют об участии фитохромной системы в данном процессе. Установлено, что СДГ из растений арабидопсиса мутантных по гену фитохрома А является нечувствительной к действию красного света, что, вероятно, связано с отсутствием в них фитохрома А, влияющего на активность фермента.

Однако, данные по влиянию красного света (КС) на активность СДГ в растениях арабиопсиса мутантных по гену *phyb-1*, кодирующего фитохром В, свидетельствуют, что исследуемый фермент ингибировался красным светом.

Результаты исследований по влиянию красного и дальнего красного света на активность СДГ в мутантных растениях арабидопсиса свидетельствуют, что фитохром В не принимает участия в данном процессе. Регуляция СДГ активной формой фитохрома А осуществляется через воздействие на генетический аппарат клетки, блокируя экспрессию генов, кодирующих сукцинатдегидрогеназу. Данное предположение основано на результатах оценки экспрессии гена *sdh1-2* субъединицы А СДГ арабидопсисана в условиях различного светового режима.

Т.о., показано снижение функциональной активности цикла Кребса на свету. Механизм ингибирования ЦТК в листьях арабидопсиса опосредован через рецепцию красного света с длиной волны 660 нм фитохромом А, блокирующего экспрессию гена *sdh1-2*.

## **ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОРГАНИЗМЫ (ГМО) – ТЕХНОЛОГИИ ДВОЙНОГО НАЗНАЧЕНИЯ**

Цыдендамбаев В.Д.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,  
ул. Ботаническая 35, 127276 Москва, тел.:(095)9778355, факс:(095)9778018

E-mail: vdt@ippras.ru

Научно-технический прогресс нашел применение результатам фундаментальных биологических и молекулярно-биологических исследований в сельском хозяйстве, пищевой промышленности и фармацевтике, медицине и приборостроении. Особенно широко в последнее время эксплуатируются достижения генетики и молекулярной биологии в сфере производства новых сортов сельскохозяйственных растений и пород животных, обладающих разнообразными новыми признаками, отсутствовавшими у родительских сортов и видов. Быстрое и массовое производство таких сортов, легкость и научная предсказуемость приобретения ими заданных свойств привели к их широкому использованию. В последнее время на страницах отечественных СМИ все чаще поднимается тема новых угроз безопасности России, связанных с небывалым скачком в развитии новейших технологий, и среди прочего – с настоящим прорывом в области геномной инженерии. В числе таких угроз чаще всего рассматривается широкое и во многих случаях практически бесконтрольное распространение ГМ продукции. Гораздо реже обсуждается неизвестное ранее, но сегодня уже почти ставшее реальностью генетическое оружие в силу присущей ему высокой степени избирательности воздействия и поражающего цель с определенным генетическим кодом. Стала появляться информация о ведущихся в секретных лабораториях различных стран мира, прежде всего США, исследованиях и работах по созданию генетического оружия. Есть данные, что уделено внимание подобным планам и в проекте «Новый американский век», в котором, в частности, говорится о необходимости преобразования в вооруженных силах США, чтобы воспользоваться преимуществами технической революции и побеждать в будущих нетрадиционных войнах.

По признанию американских ученых, 90% исследований в области молекулярной биологии и генетики можно в любой момент перепрофилировать на создание генетического оружия. Так, существует некий документ, поступивший из Исследовательского управления ВМС США, в котором предлагается выращивать генетически измененных насекомых, которые разъедали бы дороги и взлетно-посадочные полосы на территории противника, а также целенаправленно разрушали металлические части, покрытия, топливо и смазочные материалы у военной техники и вспомогательного оборудования. Известно, что группа ученых уже запатентовала микроорганизмы, которые разлагают полиуретан, содержащийся в краске, покрывающей корабли и самолеты. Другая военная биотехнологическая лаборатория занимается разработкой «антиматериального биокатализатора», который разрушает топливо и пластик.

В основе научного подхода к идее создания генетического оружия лежит избирательность воздействия такого оружия на индивида определенной расы, определенного этноса или определенной нации. Специалисты в области безопасности считают, что генетическое оружие – это искусственно созданные штаммы бактерий и вирусов (или других организмов, например, насекомых), измененные с помощью технологий геной инженерии таким образом, что они могут негативным образом влиять на организм человека. Генетическое оружие действует в зависимости от пола, возраста и различных антропологических признаков, которые можно связать путем анализа с хранящей генетический код структурой ДНК. Множество организаций во всем мире заняты сегодня работами в области идентификации отличительных генов. На сегодняшний день известно уже около 50 человеческих этносов, различимых на генетическом уровне. Это значит, что, оказавшись в руках террористов генетическое оружие, под угрозой физического исчезновения может оказаться целый этнос. Британская медицинская ассоциация предупреждает, что с помощью генетического оружия можно уничтожать даже отдельные группы внутри этих этносов, а её специалисты открыто заявляют о реальности создания такого оружия. По данным западных спецслужб, в Израиле уже несколько лет ведутся активные работы над созданием биологического оружия, которое могло бы поражать только арабов, но не евреев. В рамках создания так называемой «этнической бомбы» израильские ученые используют успехи медицины по идентификации отличительных генов, которыми обладают некоторые арабы, с тем, чтобы затем создать генетически измененные бактерии или вирусы. Они пытаются использовать способность вирусов и некоторых бактерий изменять ДНК внутри клеток своего проживания и конструируют смертельные микроорганизмы, атакующие только носителей отличительных генов.

Генетическое оружие по своему суммарному воздействию сегодня значительно превосходит все другие виды оружия массового поражения – его легко распространить (достаточно распылить содержимое небольшой ампулы в местах массового скопления людей), боевые штаммы могут преодолевать по воздуху большие расстояния в «поисках» субъекта с нужными генетическими отличиями, а выявить и отследить эти штаммы и поражённые ими существа, не обладая соответствующими технологиями, очень сложно. К тому же это оружие не имеет обратного адреса – если можно зафиксировать старт ракет с ядерными боеголовками или попытки применения химических отравляющих веществ, то действие генетического оружия нередко сказывается спустя долгое время после его незаметного распространения.

Если генетическое оружие с выборочным воздействием только на людей определенного национального генотипа, действительно будет разработано, то последствия могут оказаться просто ужасающими. И его применение может стать воистину нетрадиционной войной. Вернее, войны, как таковой в ее современном понимании, может не быть вовсе. Ведь для доставки такого вирусного оружия не нужны ни снаряды, ни бомбы. Вирус может быть помещен, например, в какой-нибудь экспортируемый по всему миру пищевой продукт. Потреблять его будут все, а разрушительное воздействие он будет оказывать только на ярких представителей какой-либо нации. Если извращенный ум сможет пойти еще дальше, то воздействие вируса может быть скрытым и проявляться через большой промежуток времени после попадания в человеческий организм. Тогда получится

«абсолютно гуманная» война без крови, ужасов, разрушений, страха и насилия. А вдруг такой вирус сможет «просто» заблокировать у объекта поражения способность к воспроизведению? В результате у определенных наций начнёт резко падать рождаемость и, через несколько десятков лет... И страшно представить, что такое оружие, попадет в руки террористам или в распоряжение лидеров авторитарных режимов.

Так что вполне объяснимо, что генетически модифицированные источники (ГМИ) попали в поле зрения экспертов не случайно. Если говорить о ГМИ, то их использование производителями продуктов питания уже само по себе потенциально опасно, тем более что сейчас в России большинство производителей и импортёров нарушают все постановления, касающиеся маркировки продуктов с ГМИ. При этом сегодня практически на любом этапе производства продуктов питания может произойти как нарушение технологии, так и вмешательство злоумышленников. И это даже, если абстрагироваться от рисков, связанных с несовершенством технологии получения самих ГМИ. А в результате можно столкнуться с последствиями, аналогичными тем, с которыми столкнулись в 2003 году в Израиле при использовании детского питания Numana, или в 1989 году в США при употреблении в качестве пищевой добавки аминокислоты L-триптофана, произведённой с помощью генно-инженерной версии бактерии *Bacillus amyloliquefaciens* V.

## НОВЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Черемных Е.Г.

МГУ Прикладной биотехнологии; ул. Талалихина, 33, 109316 Москва, тел.: (495)6770708.

E-mail: egcher2005@mail.ru

В последние 2 десятилетия наблюдается кардинальное изменение состава и качества пищи. Однако токсикологический подход к оценке безопасности пищевых продуктов остался прежний, разработанный для натуральной пищи.

Но регулярный пересмотр списка разрешенных пищевых добавок в ФАО/ВОЗ и исключение из него уже широко используемых, говорит о недостаточности токсикологического контроля при оценке их безопасности. Этот тезис подтверждается также статистикой онкологических заболеваний и в нашей стране, и во всем мире.

Для предотвращения «биологического Чернобыля», опасность которого чрезвычайно актуальна сегодня в России, необходимо изменить систему оценки безопасности пищевых продуктов и добавок, как при первоначальной сертификации, так и при мониторинговой оценке всего продовольственного рынка.

В основе такого изменения - следующие положения:

1. Увеличение количества используемых методик биологических испытаний на различных организмах и многосторонняя оценка действия исследуемого объекта на живую клетку.

2. Оценка рисков внедрения новых пищевых технологий на основе фундаментальных исследований биохимических процессов в клетке и в целостном организме.

3. Создание системы биологических и биохимических методов оценки безопасности пищевых продуктов и добавок, основанной на новейших методах молекулярной биологии, энзимологии, цитохимии.

Пищевые продукты, имеющие в своем составе ГМ - объекты, нуждаются в особом контроле, поэтому для них наиболее важна системная биологическая оценка. Необходимо оценить все факторы риска, связанные с их использованием.

В системе оценки безопасности на первом этапе комплексного исследования рационально использовать быстрые и технологичные биотесты. Этими качествами обладает автоматизированный биотест оценки безопасности пищевых продуктов, кормов и экологических объектов на инфузориях *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena rugiformis*. Он основан на автоматическом подсчете тест-организмов в пробе исследуемого объекта в течение заданного периода экспозиции.

За 3 года апробации этого биотеста был выработан методический подход, состоящий в проведении двух уровневого исследования, и накоплены результаты о сравнительной токсичности пищевых добавок, таких как подсластители, усилители вкуса, ароматизаторы и красители.

Эта разработка - первый шаг на пути к системному контролю безопасности пищи. Для создания эффективно работающей системы необходима консолидация научных коллективов и разработка новых токсикологических методов.

## **ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТРАНСГЕННЫХ КОМПОНЕНТОВ В СОЕВОМ ШРОТЕ С ПОМОЩЬЮ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

Чижова С.И.<sup>1</sup>, Гетман И.А.<sup>1</sup>, Наумкина Е.М.<sup>1</sup>, Колотовкина Я.Б.<sup>1</sup>, Монастырский О.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН; ул. Ботаническая 35, 127276 Москва; тел.: (495)9779409, факс: (495) 9778018

<sup>2</sup>Всесоюзный научно-исследовательский Институт биологической защиты растений РАСХН; Краснодар-39, 350039; тел.: (861)2281770, факс (861)2281787

E-mail: gar@ippras.ru

Выращивание генетически модифицированных культур за рубежом, в том числе используемых для кормов животным, создает возможность их несанкционированного проникновения в Россию. Замена натуральных растительных белков на генетически модифицированные в трансгенных кормах может приводить к возникновению новых экологических и биологических рисков и создает необходимость проведения контроля за распространением генетически модифицированных источников.

В данной работе провели анализ соевого шрота, полученного из Германии (г. Гамбург) на наличие генно-модифицированных компонентов. Современные методы позволяют выделить из анализируемых образцов достаточное количество интактной ДНК удовлетворительного качества, необходимой для идентификации трансгенов. Качество и количество ДНК из соевого шрота определяли модифицированным методом с применением катионного детергента цетилтриметиламмоний-бромид (СТАВ-метод). Для выявления трансгенных компонентов использовали метод идентификации чужеродных ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (RT-PCR). Предварительно качественная ПЦР с праймерами на фрагмент видоспецифичного гена лектина сои и на стандартные элементы трансгенных конструкций (35S-промотор, pos-терминатор), показала присутствие анализируемых последовательностей. Количественный анализ проводили с набором реактивов фирмы «Синтол» по прописи производителя. В результате в анализируемых образцах выявлено присутствие генетически модифицированной (ГМ) сои Roundup Ready<sup>TM</sup> (Monsanto Inc., линия GTS 40-3-2, устойчивая к глифосату). Содержание ГМ сои в соевом шроте было существенно больше 10%, что означает необходимость обязательной маркировки на наличие ГМО данного кормового продукта.

Работа частично поддержана программой Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».



## ВЛИЯНИЕ ФОРМ АЗОТНОГО ПИТАНИЯ НА GUS-РЕАКЦИЮ *Arabidopsis thaliana*, ТРАНСГЕННОГО ПО ГЕНУ *ARR5::GUS*

Штратникова В.Ю.<sup>1,2</sup>, Кулаева О.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12, Биологический факультет, 119992, Москва,

<sup>2</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая, 35, 127276, Москва; тел.: (495) 9039394. Факс: (495) 9778018.

E-mail: [vtosha@yandex.ru](mailto:vtosha@yandex.ru) (Штратникова В.Ю.)

Растения *A. thaliana* трансформированы конструкцией, содержащей бактериальный ген β-глюкуронидазы (*GUS*-ген) под контролем цитокинин-зависимого промотора *ARR5*-гена, относящегося к генам первичного ответа на цитокинины у *A. thaliana* (D'Agostino et al., 2004). Система позволяет оценить различные влияния на экспрессию гена *ARR5::GUS* и получить представление о содержании в растениях активных форм цитокининов (Aloni et al, 2005). Экспрессию *GUS*-гена оценивали 1) по появлению синей окраски продукта *GUS*-реакции с субстратом X-Gluc, 2) по флуоресценции продукта *GUS*-реакции с субстратом 4-MUG.

Растения выращивались на трёх агаризованных средах, основанных на среде Мурасиге-Скуга (MS) с половинным содержанием солей, pH=5,7-6,0. Азот в них был представлен в эквивалентном количестве либо ионом аммония, либо ионом нитрата, либо поровну ионом нитрата и аммония. Изменение *GUS*-активности в растениях наблюдалось в ходе их развития в течение месяца.

Растения, развивающиеся на аммонийной среде, показали более высокую по сравнению с остальными вариантами *GUS*-активность на второй неделе развития (12—15 день), что подтверждено в опытах с двумя различными способами измерения *GUS*-активности (флуоресцентный и колориметрический методы).

Обсуждаемый подъём *GUS*-активности у растений на аммонийном азоте совпадает с периодом формирования латеральных корней, зоны закладки которых характеризуются *GUS*-активностью, указывающей на участие цитокининов в этом процессе. У растений других вариантов развитие боковых корней начиналось позже, и количество их было меньшим, но длина их постоянно увеличивалась.

У растений аммонийного варианта с 10 дня начинает проявляться отставание в развитии побега, и к 30 дню растения погибают. Развитие побегов в вариантах, содержащих нитрат, было сходным; но в нитратном варианте ко времени цветения на растениях образовалось большее количество листьев.

Анализ содержания зеатина (в сумме с зеатинрибозидом), измеренного методом ИФА, показал, что содержание цитокининов в расчёте на сырую массу в корнях выше, чем в листьях, а в аммонийном варианте — выше, чем в других вариантах. Эти данные сходны с данными по *GUS*-активности, хотя и не всегда совпадают полностью.

Таким образом, к 10 дню развития происходит переход от питания веществами зерновки к питанию из окружающей среды. На растениях аммонийного варианта среда сказывается неблагоприятно, и они проявляют активность в поиске питательных веществ, усиливая закладку боковых корней и

снижая скорость роста надземной части, чем, по-видимому, объясняется рост GUS-активности у этих растений. Затем GUS-активность аммонийного варианта падает по сравнению с другими вариантами, что связано с общим ослаблением растений.

Работа выполнена в рамках гранта президента Российской Федерации по поддержке ведущих научных школ НШ-3692.2006.4.

### **Литература**

1. D'Agostino I. B., Deruère J., Kieber J. J. Characterization of the Response of the Arabidopsis Response Regulator Gene Family to Cytokinin. // *Plant Physiology*, 2000, vol. 124, pp. 1706–1717.
2. Aloni R., Langhans M., Aloni E., Ullrich. C. I. Role of cytokinin in the regulation of root gravitropism. // *Planta*, 2004, vol. 220, pp. 177–182.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *Arabidopsis thaliana* ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЛИЯНИЯ КОМПОНЕНТОВ СРЕДЫ ВЫРАЩИВАНИЯ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ЦИТОКИНИНАМ

Юдина А.В., Ломин С.Н., Рифлер М., Романов Г.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; ул. Ботаническая 35, 127276 Москва; тел.:(495)9039334, факс: (495)9778018, E-mail [gar@ippras.ru](mailto:gar@ippras.ru)

Цитокинины – одни из классических растительных гормонов, которые, наряду с ауксинами, гиббереллинами, абсцизовой кислотой и этиленом, влияют на многие аспекты жизнедеятельности растений. На протяжении жизни растение должно адекватно реагировать на изменение условий произрастания. Цитокинины преимущественно образуются в корне, поэтому могут участвовать в передаче информации об изменении условий минерального питания в верхнюю часть растения. Известно, что растение *Arabidopsis thaliana* имеет три рецептора цитокинина, Arabidopsis Histidine Kinases: АНК2, АНК3 и АНК4 (CRE1/АНК4). Ранее было показано, что цитокинины участвуют в регуляции ассимиляции неорганических анионов: нитрата, фосфата и сульфата (Maquyama- Nakashita et al., 2004, Rahayu et al., 2005, Franco-Zorilla et al., 2005). Наша работа была направлена на изучение влияния ионов неорганических солей на экспрессию цитокининовых рецепторов. Для этого мы использовали двойные мутанты по рецепторам цитокининов у *Arabidopsis thaliana*, в которых фактически экспрессировался только один рецептор из трех (АНК2-экспрессирующий клон, АНК3-экспрессирующий клон и АНК4-экспрессирующий клон). Растения несли дополнительную репортерную конструкцию на цитокинин *pARR5::GUS* (*ARR5* – ген первичного ответа на цитокинины). Для эксперимента использовали четырехдневные проростки, выращенные на модифицированной жидкой среде MS. Из среды убирали фосфаты, сульфаты, нитраты (в зависимости от варианта), заменяя их эквивалентным количеством хлоридов одновалентных солей. В качестве контроля использовали проростки, выращенные на MS и воде. Четырехдневные проростки инкубировали с цитокинином (5  $\mu$ M БАП) 5 часов, затем анализировали активность GUS *in vitro* (Romanov et al., 2002). Соли по-разному влияли на цитокининовую чувствительность мутантов *Arabidopsis thaliana*. Недостаток солей фосфата, сульфата или нитрата в среде MS выращивания АНК2- и АНК3-клонов не приводил к явным изменениям чувствительности мутантов к цитокининам. Чувствительность АНК4-варианта снижалась во всех случаях (отсутствие нитратов, фосфатов, сульфатов). Интересным является то, что растения, выросшие на воде, не проявили при этом достоверного снижения чувствительности к цитокинину относительно растений, выросших на MS среде, хотя отсутствие отдельных компонентов в среде приводило к падению чувствительности ниже уровня водного контроля. компонентов среды. В дальнейшем планируется продолжить работы в этом направлении при расширении спектра изучаемых веществ и с привлечением других молекулярно-биологических методов исследования.

Работа поддержана грантами РФФИ 07-04-00331 и 07-04-91211-ЯФ

## АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Antipina O.V. 15, 34  
Demin I.N. 34  
Deryabin A.N. 34  
Kuchuk N.V. 60  
Merkulova N.V. 15  
Sinkevich M.S. 34  
Trunova T.I. 34  
Аксенова Н.П. 10  
Александрович С.А. 11  
Алексеева В.В. 12  
Альтерман И.Е. 55  
Андреева Е.А. 13  
Антипина О.В. 14  
Баврина Т.В. 16, 17  
Баймиев А.Х. 18  
Баландин Т.Г. 79  
Баранов А.С. 19  
Батов А.Ю. 72  
Белоногова М.А. 75  
Беляев Д.В. 20  
Бержец В.М. 11  
Блинов В.А. 48  
Блюм Я.Б. 67  
Богомаз Д.И. 13  
Болякина Ю.П. 21  
Бондаренко М.А. 83  
Боровик Р.В. 80  
Бурьянов Я.И. 12, 22, 40, 78, 79  
Вдовитченко М.Ю. 55  
Вершинина З.Р. 18  
Вершинкин Д.А. 24, 25, 26  
Викторов А.Г. 27  
Волотовский И.Д. 40, 78  
Вонский М.С. 28  
Гаманец Л.В. 37  
Ганзен А.В. 13  
Гапеева Т.А. 40, 78  
Гарлик Ю.А. 61  
Гвоздева Е.С. 44  
Гервазиева В.Б. 11  
Гетман И.А. 29, 88  
Гладышко Т.О. 31  
Глоба Е.Б. 79  
Голденкова-Павлова И.В. 32  
Голубчикова Ю.С. 12  
Голяновская С.А. 10  
Гудков А.Т. 40  
Деев С.М. 79  
Дерябин А.Н. 35  
Добрев П. 17  
Додуева И.Е. 41  
Долгих Ю.И. 82  
Егорова И.А. 36, 41  
Еникеев А.Г. 37  
Епринцев А.Т. 83  
Ермакова И.В. 38  
Ефимова М.В. 44  
Живухина Е.А. 31  
Загоскина Н.В. 31  
Захарченко Н.С. 22, 40  
Зонтикова С.А. 73  
Ильина Е.Л. 41  
Карачинская Н.В. 43  
Карначук Р.А. 44  
Карпова Г.М. 45  
Кершанская О.И. 46  
Князев А.В. 18  
Коваль В.С. 47  
Колодяжная Я.С. 47  
Колотовкина Я.Б. 29, 88  
Коновалова М.А. 48  
Константинова Т.Н. 10  
Копейкина В.Б. 49  
Копытина Т.В. 37  
Король В.В. 74  
Кочетов А.К. 47  
Крылов А.И. 28  
Кузнецов В.В. 29, 51  
Кузнецов Вл.В. 29, 53  
Кузовкина И.Н. 55  
Кулаева О.Н. 89  
Куликов А.М. 56  
Куликова В.В. 21  
Кулуев Б.Р. 58, 59  
Кунда М.С. 75  
Курдюков И.Д. 36  
Ложникова В.Н. 10  
Ломин С.Н. 21, 45, 91  
Лутова Л.А. 13, 36, 41  
Малбек Ю. 17  
Марченко А.И. 80  
Махачкова И. 17  
Медведев С.С. 72  
Миляева Э.Л. 16, 61, 71  
Монастырский О.А. 62, 64, 88  
Монахова В.А. 41  
Натяганова А.В. 37  
Наумкина Е.М. 17, 29, 65, 88  
Негрецкий В.А. 67  
Новожилов О.В. 67  
Носов А.М. 79  
Осипова Е.А. 69, 82  
Петрова М.А. 71  
Петюх Г.П. 43  
Пожванов Г.А. 72  
Поляков А.В. 73  
Пономарева Н.В. 28  
Попов В.Н. 83  
Пузина Т.И. 74  
Ралдугина Г.Н. 20, 75  
Рифлер М. 45, 91  
Роговский Ю.А. 76  
Романов Г.А. 10, 16, 17, 21, 24, 25, 26, 29, 45, 61, 65, 71, 91  
Романова А.В. 47  
Рукавцова Е.Б. 12, 22, 40, 78  
Рыдлева Е.В. 31  
Самойликов П.В. 11  
Семенова Л.А. 37  
Семенюк Е.Г. 79  
Сергеева Л.И. 10  
Синькевич М.С. 35  
Смирнова Е.А. 69  
Соколов М.С. 80  
Степанова А.Ю. 69, 82  
Стремовский О.А. 79  
Сухоруков В.Н. 13  
Терешонок Д.В. 82  
Титов С.Е. 47  
Травничкова А. 17  
Трунова Т.И. 35  
Федорин Д.Н. 83  
Цыдендамбаев В.Д. 29, 84  
Черемных Е.Г. 87  
Чижова С.И. 29, 88  
Чикризова О.Ф. 73  
Ширшикова О.В. 79  
Штратникова В.Ю. 89  
Шульга Н.Я. 78  
Эдельвейс Э.Ф. 79  
Юдина А.В. 91  
Юрьева Н.О. 17, 31  
Юхманова А.А. 40

## СОДЕРЖАНИЕ

Организационный комитет симпозиума .....	2
Программа симпозиума .....	4
Тезисы докладов .....	9
Авторский указатель .....	92