

## Реакция каллусной культуры и регенерантных растений ячменя на бактеризацию *Methylobacterium mesophylicum*

© 2010. И. Г. Широких<sup>1,2</sup>, д.б.н, зав. лабораторией, в.н.с., О. Н. Шуплецова<sup>1</sup>, к.б.н., с.н.с., С. Ю. Огородникова<sup>2</sup>, к.б.н., с.н.с., А. А. Широких<sup>1</sup>, д.б.н., в.н.с.,

<sup>1</sup> ГНУ Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого РАСХН,

<sup>2</sup> Лаборатория биомониторинга Института биологии Коми научного центра УрО РАН и ВятГГУ, e-mail: irgenal@mail.ru

Изучали влияние искусственной бактеризации каллуса ячменя метилотрофными бактериями на морфогенетические процессы в условиях стресса, обусловленного токсичностью ионов алюминия и водорода. Установлена способность природных изолятов *Methylobacterium mesophylicum* вступать в устойчивые ассоциации с каллусной тканью, а также увеличивать частоту регенерации растений. У растений-регенерантов, полученных в селективных стрессовых системах, при выращивании в условиях искусственного климата определяли степень проявления симптомов окислительного стресса. В листьях растений-регенерантов, ассоциированных с *M. mesophylicum* 3-345, по сравнению с растениями-регенерантами, не подвергнутыми *in vitro* бактеризации, снижалось содержание малонового диальдегида, изменялось содержание низкомолекулярных антиоксидантов – аскорбиновой кислоты и антоцианов.

The influence of artificial bacterization of barley callus with methylotrophic bacteria on morphogenetic processes in conditions of stress caused by aluminum and hydrogen ions toxicity was considered. The ability of natural isolates *Methylobacterium mesophylicum* 3-345 to have stable associations with callus tissue and to increase the frequency of plant regeneration is stated. The symptoms of oxidative stress of the plants-regenerants in selective stress systems at planting in artificial climate conditions were determined. In the leaves of regenerate-plants associated with methylotrophic bacteria the amount of malondialdehyde decreased as compared with the regenerant-plants without bacterization *in vitro*, the amount of malondialdehyde decreased, the amount of low molecular weight antioxidants such as ascorbic acid and anthocyanin changed.

Ключевые слова: ячмень (*Hordeum vulgare* L.), каллус, токсичность алюминия, морфогенез, *Methylobacterium mesophylicum*, растения-регенеранты, окислительный стресс

Key words: Barley (*Hordeum vulgare* L.), callus, aluminum toxicity, morphogenesis, *Methylobacterium mesophylicum*, regenerant-plants, oxidative stress

### Введение

Процесс культивирования растительной ткани *in vitro* на искусственных питательных средах служит источником разного рода изменений, многие из которых наследуются в потомстве растений-регенерантов, т. е. ведут к появлению новых форм – соматоклонов. Наличие полезных мутаций среди соматоклонов позволяет использовать соматоклональную изменчивость для создания новых сортов растений, в том числе устойчивых к стрессовым факторам [1]. Для отбора устойчивых форм используются селективные среды, которые, имитируя естественные стрессовые условия, обеспечивают экспрессию признака устойчивости и дают возможность отбирать нужные варианты с последующей регенерацией фертильных растений. Соматоклональная изменчивость находит всё более широкое применение в селекции зерновых культур [2, 3].

Известно, что частота соматоклональных вариантов среди растений-регенерантов из каллусных тканей возрастает с увеличением продолжительности культивирования [1, 3]. Однако с увеличением периода культивирования каллусная ткань теряет свою способность к морфогенезу и регенерации, благодаря чему возможность получить ценные в селекционном отношении растения-регенеранты сводится к минимуму. Для увеличения выхода растений-регенерантов в результате клеточной селекции необходимы исследования, направленные на повышение морфогенетического потенциала каллусной ткани, в том числе в стрессовых условиях селективных систем.

К числу специфических сигналов, способных индуцировать начало морфогенетических превращений в культуре *in vitro*, относятся фитогормоны, возможности применения которых могут быть расширены за счет вовлечения в процесс регенерации растений микробного

потенциала фитогормональных воздействий. К настоящему времени в литературе накоплено немало фактов, свидетельствующих о влиянии на формирование морфогенетических структур *in vitro* как микробных метаболитов, так и непосредственно микробных клеток. Так, в ряде работ, посвящённых вопросам клеточной селекции злаков на устойчивость к фитотоксинам, отмечалось, что добавление в культуральные среды в низких дозах неочищенных фильтратов культуральной жидкости (КЖ) фитопатогенных грибов *B. sorokiniana* [2, 4], *Septoria tritici*, *Pseudocercosia polella herpotrichoides* [5], сопровождалось морфорегуляторными эффектами. Инфицирование каллусов мягкой пшеницы возбудителем твёрдой головни *Tilletia caries* инициировало у них ризогенез [6], что авторы связывают со способностью гриба продуцировать ауксины. Стимулирующее действие на регенерационные процессы культуры ткани табака и пшеницы были способны оказывать представители сапротрофных бактерий рода *Klebsiella* (*K. tectigena* и *K. planticola*), а также отдельные штаммы условно патогенных бактерий (*K. ozaenae*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. rhinoscleromatis*) [7]. Неспецифический токсин, выделенный из *Pseudomonas syringae*, стимулировал процесс закладки корней и побегов у эмбрионов пшеницы и тем самым увеличивал выход числа растений-регенерантов [8]. В последнее десятилетие было показано, что стимуляции роста и морфогенеза растений *in vitro* могут способствовать облигатные метилотрофные бактерии *Methylovorus mays* [9] и метанотроф *Methylomonas methanica* [10], имеющие с растениями тесные симбиотические отношения, благодаря функционированию «метанольного цикла», т. е. образованию и выделению растениями метанола, который используется аэробными метиловыми бактериями как источник углерода и энергии [11].

Данные о влиянии факультативных метилотрофов – бактерий рода *Methylobacterium* на рост и регенерацию растений *in vitro* в доступной нам литературе отсутствуют, хотя сообщалось об обнаружении у представителей этого рода способности к синтезу цитокининов [12], а у вида *M. mesophylicum* показано образование зеатина/зеатинрибозида [13] и ауксинов [14].

Целью данной работы было изучение влияния искусственной бактериализации каллусов ячменя факультативными метилотрофными бактериями на морфогенетические процессы в условиях стресса, обусловленного токсично-

стью ионов алюминия, а также на биохимические показатели полученных в ассоциациях с бактериями растений-регенерантов.

## Методика

**Каллусные культуры.** Объектом для эксплантации служили сорта ячменя (*Hordeum vulgare* L.) 1457-96, 781-04, 999-93 и гибридная комбинация Дуэт×Биос, выращенные в полевых условиях. В качестве эксплантов для индукции каллуса использовали незрелые зародыши на 12-15-е сутки после цветения, помещая их на питательную среду МС [15], содержащую 30 г/л сахарозы. Для получения каллусной ткани в питательную среду вводили 2 мг/л дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), для пролиферации полученного каллуса содержание 2,4-Д в среде снижали до 1 мг/л, для регенерации из каллуса растений в среду добавляли 0,1 мг/л гибберелловой кислоты (ГК), 1 мг/л кинетина, 0,5 мг/л индолил-3-уксусной кислоты (ИУК).

При отборе линий, устойчивых к токсическому действию алюминия, селективные условия создавали добавлением в питательную среду сульфата алюминия в количестве, обеспечивающем концентрации 20 и 40 мг/л ионов  $Al^{3+}$ , pH 3,8-4,0. Каллус выращивали при температуре 20–24 °С, 16-часовом фотопериоде и освещенности 8000 лк.

Морфологические характеристики каллусов (наличие морфогенных очагов, ризоидов и пр.) и их совместных культур с метилотрофными бактериями оценивали на 21 сутки после бактериализации.

**Бактериальные культуры.** Для бактериализации каллуса использовали природные изоляты розовоокрашенных факультативных метилотрофных (РОФМ) бактерий, выделенные из растений тритикале (шт. Тр 4, Тр 2), овса (шт. 3-536, 3-543) и ячменя (шт. 2-549) на агаризованной среде Канада, содержащей (г/л):  $KH_2PO_4$  – 2;  $(NH_4)_2SO_4$  – 2;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,125; NaCl – 0,5;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,002; дрожжевой автолизат – 0,1; метанол 1% (об./об.). По совокупности общепринятых фенотипических показателей и данных о нуклеотидных последовательностях генов 16S рРНК и *mxaF*, (кодирующего большую субъединицу метанолдегидрогеназы) [16], все культуры были идентифицированы как *Methylobacterium mesophylicum*.

Количественное определение индолилуксусной кислоты (ИУК) в жидких метаболитах бактерий проводили методом высоко-

эффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе фирмы Shimadzu (модель LC-20AD), снабжённом ультрафиолетовым детектором, при 280 нм. В качестве элюента использовали смесь вода-ацетонитрил-уксусная кислота в соотношении 83:17:0.2 (об) [17]. Скорость подачи элюента 0.9 мл/мин, температура колонки 33°. В качестве стандарта использовали ИУК («Fluca», Швейцария).

Цитокининовую активность разбавленных водой (1:200) культуральных жидкостей бактерий определяли с помощью биотеста, основанного на сохранении хлорофилла в листовых сегментах 10-суточных проростков ячменя (сорт Фермер) под действием цитокининов [18]. Гиббереллиновую активность – с использованием биотеста, основанного на определении величины прироста гипокотилия проросших семян салата (*Lactuca sativa* L.) сорта Московский парниковый под действием ГК [19].

Бактерии для инокуляции выращивали в жидкой среде приведённого выше состава в течение 5 суток на качалке (180 об/мин) до плотности суспензии  $10^7$  кл./мл. Инокулировали каллусы ячменя, нанося культуру бактерий стерильной кисточкой на всю поверхность каллуса. Опыты проводили в 20-кратной повторности.

Для количественной оценки колонизации метиловыми бактериями каллусной ткани и интактных растений ячменя использовали спонтанный антибиотикорезистентный мутант *M. mesophylicum* Tr4<sup>str+</sup>.

**Условия выращивания растений-регенерантов.** Полученные в ассоциациях с метилотрофными бактериями в контрольных и селективных условиях растения-регенеранты высаживали в вегетационные сосуды, наполненные смесью из почвы, песка и торфа в равных объёмах и выращивали до получения семенного потомства в климатической камере «Шка» (Германия) со следующим режимом: температура днём 20–22°C, ночью 16–18°C, фотопериод 16 часов. Контролем служили одновозрастные растения, полученные из каллуса ячменя, не подвергнутого бактериализации.

**Определение биохимических показателей** проводили, отбирая смешанные пробы листьев от 2-3 растений в фазы трубкования, цветения и молочной спелости. Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) анализировали по цветной реакции тиобарбитуровой кислоты с малоновым диальдегидом (МДА), образующимся в процессе ПОЛ [20].

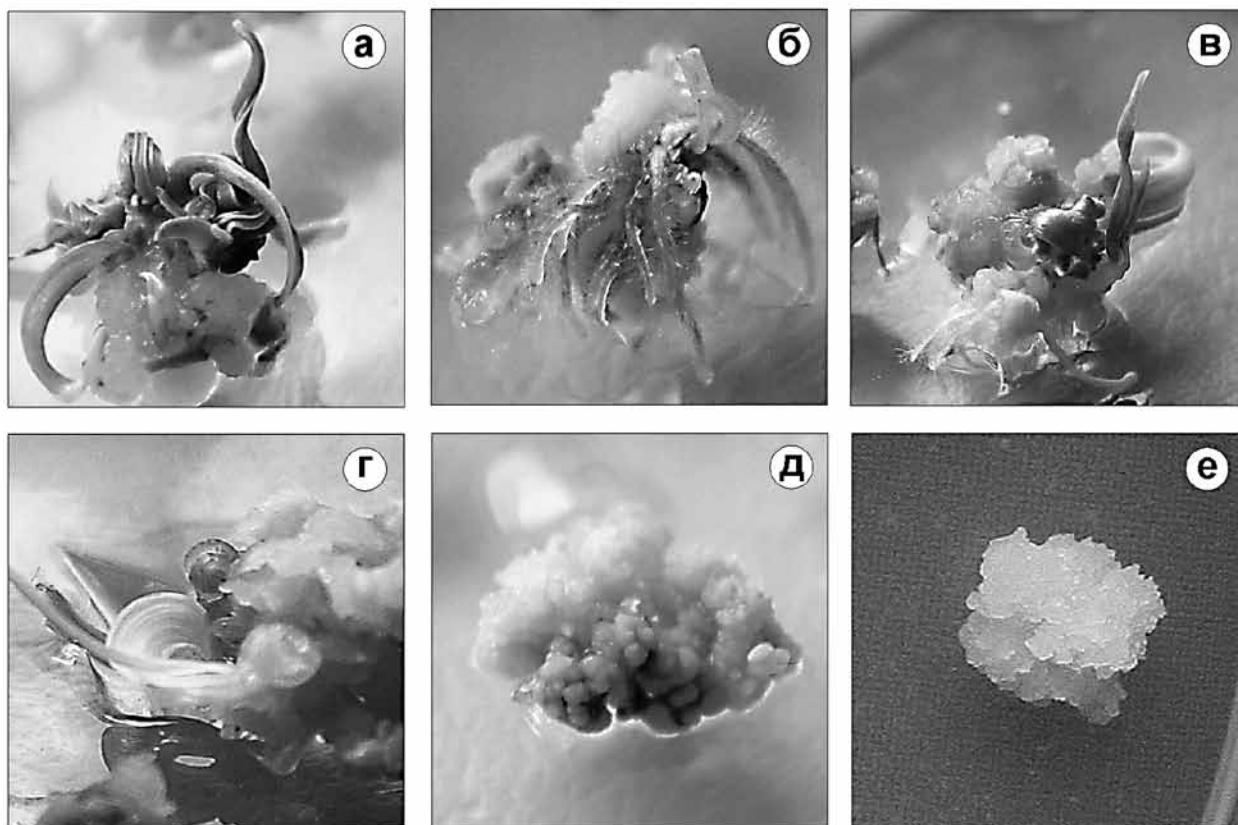
Антоцианы экстрагировали из листьев 1% раствором соляной кислоты. Количественное определение антоцианов проводили в соответствии с методикой [21] при 510 и 657 нм. Аскорбиновую кислоту выделяли из растительных тканей растворами метафосфорной кислоты и ортофосфата натрия. Содержание аскорбиновой кислоты в центрифугате определяли спектрофотометрически при длине волны 265 нм [22].

Статистическую обработку данных проводили стандартными методами с помощью встроенного статистического пакета EXCEL (MS Office 2007).

## Результаты и обсуждение

Регенерационные процессы начинались в каллусной ткани ячменя после первого пассажа, когда в составе питательной среды вдвое снижали содержание 2,4-Д – дедифференцирующего фактора. В неорганизованной массе клеток появлялись организованные структуры – морфогенные очаги, частота возникновения которых сильно варьировала в зависимости от генотипа донорного растения. Чаще всего это были монополярные структуры, развивающиеся в последующих пассажах по типу стеблевого или корневого морфогенеза (рис. 1 а и б). Если в первом случае за стеблевым морфогенезом следовал корневой, и формировались растения-регенеранты, то во втором случае получить растения-регенеранты, как правило, не удавалось. Реже в каллусной ткани наблюдали формирование биполярных зародышеподобных структур, из которых одновременно развивались побеги и корни (рис. 1 в). Часть регенерантов, получаемых от различных исходных генотипов, представляла собой полностью или частично бесхлорофильные растения (рис. 1 г), которые, как сообщалось в литературе, появляются в культуре ткани злаков вследствие делеции части хлоропластной ДНК [23] или её инактивации транспозонами [24]. Вторичная дифференцировка каллусных клеток не всегда заканчивалась морфогенезом и регенерацией растений. Иногда каллусная ткань претерпевала нормальный цикл развития, старела и некротизировалась без признаков морфогенеза (рис. 1 д). В отдельных случаях каллусная ткань сильно разрасталась, увеличиваясь в объёме, но не переходила к вторичной дифференцировке, по-видимому, превращаясь в опухолевую (рис. 1 е).

Непредсказуемость направления и результатов морфогенеза *in vitro* осложнялась



**Рис. 1.** Различные типы морфогенеза в каллусной культуре ячменя 781-04: *а* – стеблевой морфогенез, *б* – корневой морфогенез (ризогенез), *в* – стеблевой и корневой морфогенез одновременно, *г* – альбино-вариант стеблевого морфогенеза, *д* – каллусная культура в стационарной фазе роста (неморфогенный каллус), *е* – превращение каллуса в опухолевую ткань (способна расти на среде без гормонов).

при увеличении общей продолжительности культивирования снижением морфогенетической компетентности каллусных клеток. Утрата клетками компетентности в процессе старения каллуса цитологически проявляется в увеличении степени конденсации хроматина в ядрах, перераспределением в нём транскрипционной активности [25], сопровождаемой потерей синтеза рибосомальной РНК в ядрышках [2, 26]. Однако компетентность клетки не связана с изменениями базовой структуры ДНК, и поэтому может быть необходимым образом модифицирована, например, путём изменения количественного соотношения эндогенных ауксинов и цитокининов.

Для выяснения возможности ассоциированных с растениями РОФМ бактерий выступать в качестве продуцентов и поставщиков в каллусную ткань фитогормонов из различных растительных субстратов были выделены в чистую культуру более 30 штаммов. Последующий скрининг изолятов по способности к биосинтезу фитогормонов позволил выявить перспективные в этом отношении культуры *M. mesophilicum* из растений тритикале (шт.

Тр 4, Тр 2), овса (шт. 3-536, 3-543) и ячменя (шт. 2-549). Методом ВЭЖХ установлена способность этих бактерий к биосинтезу из триптофана ИУК, в количествах 1,45–8,63 мкг/мл (табл. 1). Наряду с биосинтезом ауксинов у изолятов *M. mesophilicum* 3-543, 3-536, Тр4 и 2-549 методом биотестов установлена цитокининовая активность, а у изолятов *M. mesophilicum* 2-549, 3-536, 3-543 – гиббереллиновая активность культуральной жидкости.

Экспериментальные бактериально-растительные ассоциации для выяснения возможности повышения регенерационной способности ячменного каллуса в кислых селективных системах с 40 мг/л ионов алюминия, были созданы на основе генотипов ячменя 1457-96 и 781-04. Количество растений-регенерантов, индуцированных генотипами 1457-96 и 781-04 в селективных условиях при бактериализации каллусной культуры штаммами *M. mesophilicum* 2-549, 3-543, Тр 2, существенно превышало частоту регенерации растений в контроле без бактериализации, тогда как в оптимальных по кислотности условиях, положи-

Таблица 1

Продуцирование регуляторов роста растений природными изолятами мезофильных бактерий

Источник выделения	Штамм	Биосинтез, мкг/мл		
		ИУК	Цитокинины	Гибберелловая кислота
Листья ячменя	2-549	8,63	0,50	0,15
Листья овса	3-536	5,68	0,39	0,11
	3-543	6,45	0,55	0,14
Листья тритикале	Тр 4	1,45	0,08	0
	Тр 2	6,50	0	0

тельный эффект от бактериализации наблюдался только для штаммов 3-543 и Тр 2 и только в отношении одного сорта 1457-96 (рис. 2).

Положительные результаты тестирования на наличие мезофильных бактерий в клетках каллуса ( $10^7-10^8$  КОЕ/г), а также в листьях растений – регенерантов ( $10^2-10^4$  КОЕ/г), позволяют говорить о формировании устойчивых ассоциаций *M. mesophylicum* с растениями ячменя и о возможном влиянии на рост и морфогенез растений посредством микробных метаболитов.

Под воздействием бактериализации изменялось также соотношение количества каллус-

ных линий, реализующих в процессе вторичной дифференцировки стеблевой, корневой и одновременно стеблевой и корневой типы морфогенеза. Так, в результате бактериализации штаммами *M. mesophylicum* Тр 2, 3-543, 2-549 каллусных культур, индуцированных тремя различными генотипами ячменя на кислых селективных средах с 20 мг/л ионов алюминия, доля морфогенных каллусов в селективных условиях была в большинстве случаев выше, чем в контроле без бактерий (табл. 2).

От генотипов ячменя Дуэт×Биос и 781-04 количество каллусов, реализующих одновременно стеблевой и корневой тип морфогенеза, под влиянием *M. mesophylicum* 3-543 увеличилось на 20% по сравнению с контролем без инокуляции. При этом сократилось на 19 и 11% соответственно количество каллусных культур с полным отсутствием морфогенных очагов. Бактериализация штаммом *M. mesophylicum* 2-549 привела к возрастанию частоты морфогенеза по стеблевому (на 7%) и стеблевому и корневому типу одновременно (на 18%) в каллусной культуре ячменя 999-93.

Из плотных морфогенных участков бактериализованных и исходных каллусов развивались зелёные листообразные структуры (инициалии), а спустя 2-3 недели формировались растения-регенеранты, которые были высажены в почву для дальнейшего сравнительного изучения. В условиях искусственного климата у растений-регенерантов определяли некоторые биохимические показатели, тестирующие степень проявления симптомов окислительного стресса.

Оценка степени окислительных повреждений по накоплению в листьях МДА показала, что ассоциированные с *M. mesophylicum* 3-543 регенерантные линии ячменя 781-04 характеризовались более низкой ( $33,8 \pm 1,51$  нмоль МДА/г) интенсивностью ПОЛ по сравнению с исходными регенерантными линиями ( $53,06 \pm 5,25$  нмоль МДА/г) без бактериализации (рис. 3). На первом этапе развития

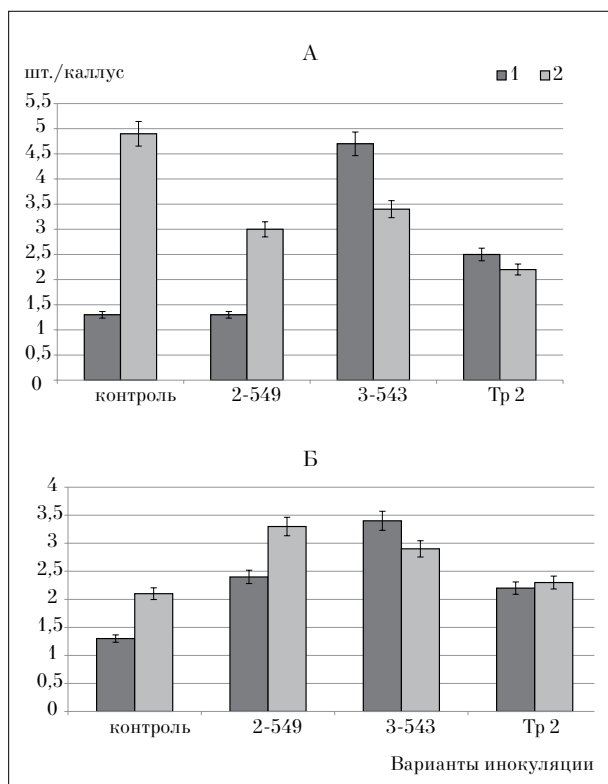
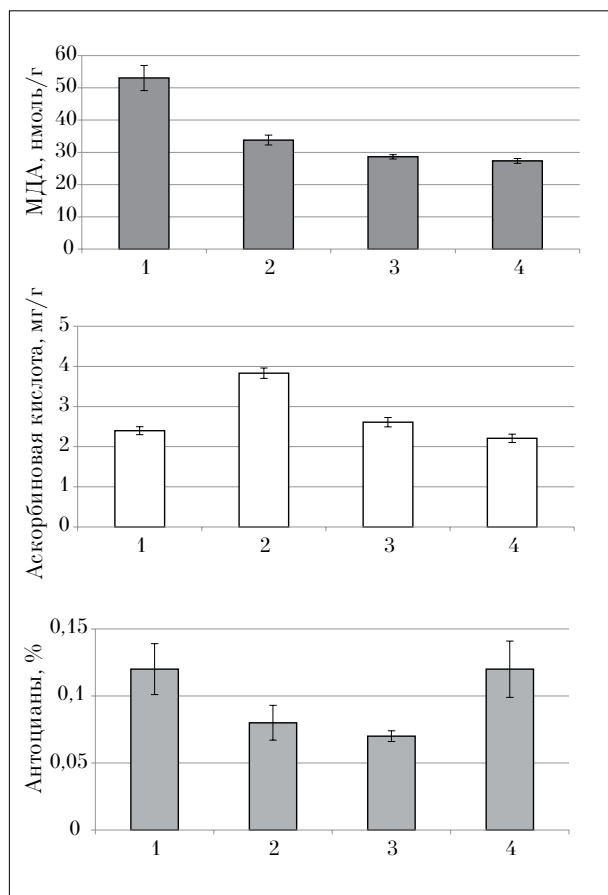


Рис. 2. Количество растений-регенерантов, индуцированных в каллусной культуре ячменя сортами 1457-96 (1) и 781-04 (2), при инокуляции различными штаммами мезофильных бактерий в контрольных (А) и селективных (Б) условиях.

Таблица 2

Изменение направленности морфогенеза в каллусной культуре ячменя под воздействием бактериализации метилобактериями на контрольной и селективной средах

Генотип растения	Вариант, штамм	Среда	Доля (%) каллусных культур, реализующих различные типы морфогенеза			
			стеблевой и корневой одновременно	стеблевой	корневой	отсутствие морфогенных очагов
Дуэт×Биос	Контроль без бактериализации	контрольная	33,2	22,8	12,7	31,3
		селективная	16,9	40,6	0	42,5
	M. mesophilicum 3-543	контрольная	24,6	57,9	10,8	6,7
		селективная	36,8	39,7	0	23,5
	M. mesophilicum Тр 2	контрольная	10,6	60,4	25,6	3,4
		селективная	49,5	19,3	12,4	18,8
M. mesophilicum 2-549	контрольная	37,2	18,5	30,6	13,7	
	селективная	23,3	46,0	10,4	20,3	
999-93	Контроль без бактериализации	контрольная	24,9	28,3	35,6	11,2
		селективная	19,5	30,4	28,7	21,4
	M. mesophilicum 2-549	контрольная	23,4	41,0	14,9	20,7
		селективная	33,7	37,3	0	29,0
	Контроль без бактериализации	контрольная	64,6	19,2	16,2	0
		селективная	32,5	35,1	6	26,4
781-04	M. mesophilicum 3-543	контрольная	30,5	46,8	16,4	6,3
		селективная	52,3	22,4	9,6	15,7
	M. mesophilicum Тр 2	контрольная	33,7	36,0	15,0	15,3
		селективная	45,4	25,2	0	29,4



**Рис. 3.** Содержание МДА и низкомолекулярных антиоксидантов в листьях растений-регенерантов, индуцированных в каллусной культуре ячменя 781-04 в контроле без бактериализации (1), при бактериализации *M. mesophylicum* 3-543: на среде без селективных агентов (2), на среде с 40 мг/л Al (3), на среде с 20 мг/л Al (4).

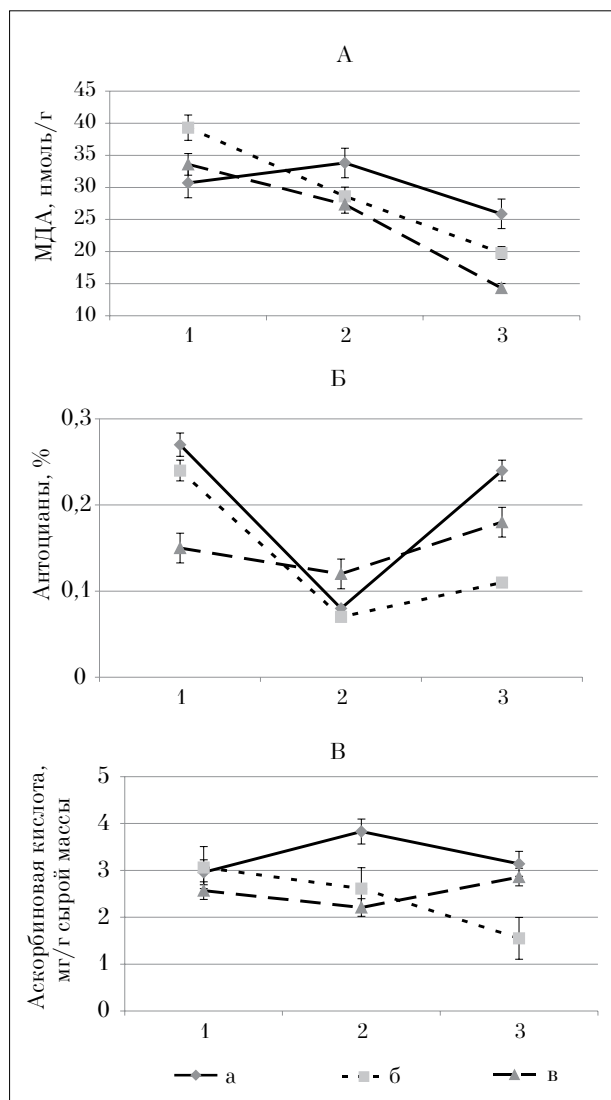
растений (до наступления фазы цветения) содержание МДА в листьях ассоциированных с бактериями регенерантов, подвергнутых стрессовым воздействиям в селективных системах ( $33,6 \pm 1,57$  и  $39,3 \pm 0,75$  нмоль МДА/г), превосходило содержание МДА в листьях регенерантов, полученных в контрольных условиях ( $30,7 \pm 0,67$  нмоль МДА/г), а в дальнейшем – достоверно ему уступало (рис. 4 А). Более низкий уровень накопления МДА (от  $14,3 \pm 1,02$  до  $28,6 \pm 0,68$  нмоль МДА/г) на последующих этапах развития стрессированных в культуре ткани растений может свидетельствовать в пользу меньшей интенсивности окислительного стресса, испытываемого регенерантами, ассоциированными с бактериями и позволяет говорить об антистрессовом эффекте микробно-растительного взаимодействия.

Содержание в листьях аскорбиновой кислоты – многофункционального соединения с антиоксидантным действием – у регенерантов,

индуцированных бактериализованным каллусом в контрольных условиях, напротив, было, существенно выше ( $3,83 \pm 0,129$  мг/г), чем у регенерантов без бактериализации ( $2,40 \pm 0,18$  мг/г) (рис. 3). А у регенерантов, ассоциированных с бактериями *in vitro* в селективных условиях, содержание аскорбиновой кислоты в листьях ( $2,21 \pm 0,104$  и  $2,61 \pm 0,116$  мг/г) уступало контролю почти на всём протяжении вегетации (рис. 4 В), но практически не отличалось от исходного уровня аскорбиновой кислоты, обнаруженного в листьях не ассоциированных с бактериями растений (рис. 3).

Определение содержания в листьях антоцианов – пигментов группы флавоноидов, также играющих роль низкомолекулярных антиоксидантов [27], показало, что их содержание у растений-регенерантов при бактериализации каллуса в контрольных условиях существенно ниже ( $0,083 \pm 0,013\%$ ), чем в листьях исходных небактериализованных растений ( $0,120 \pm 0,04\%$ ). Содержание антоцианов в листьях растений, полученных из каллуса, бактериализованного в условиях стресса, обусловленного токсичностью 20 мг/л ионов алюминия ( $0,119 \pm 0,021\%$ ), достигало в процессе вегетации уровня исходных растений (рис. 3). В случае бактериализации каллуса, подвергнутого алюминиевому стрессу более высокой интенсивности – 40 мг/л, повышения уровня антоцианов в листьях индуцированных им растений-регенерантов на протяжении всего периода вегетации не выявлено (рис. 4 Б).

Таким образом, в результате проведённых исследований показано, что в кислых селективных системах с алюминием искусственные микробно-растительные ассоциации на основе природных изолятов *M. mesophylicum* не только морфогенетически более активны, чем каллусные культуры, лишённые микробного компонента, но и способствуют регенерации растений, у которых симптомы окислительного стресса, тестируемые по интенсивности ПОЛ и содержанию в листьях низкомолекулярных антиоксидантов, выражены в меньшей степени, чем у исходных растений. Совместное культивирование каллусной ткани с бактериями *M. mesophylicum*, способными продуцировать регуляторы роста растений, может стать одним из возможных путей управления морфогенезом и процессами регенерации ячменя *in vitro*, что позволит получать растения-регенеранты с целевыми признаками в количествах, соответствующих задачам практической селекции. Дополнительным преимуществом искусственной бактери-



**Рис. 4.** Содержание МДА (А), антоцианов (Б) и аскорбиновой кислоты (В) в листьях растений-регенерантов, индуцированных при бактериализации *M. mesophylicum* 3-543 в каллусной культуре ячменя 781-04 на контрольной среде (а), на среде с 40 мг/л ионов алюминия (б), на среде с 20 мг/л ионов алюминия (в) по фазам развития растений: 1 – трубкование, 2 – цветение 3 – молочная спелость.

зации каллусной ткани может явиться повышение стрессоустойчивости ассоциированных с *M. mesophylicum* растений-регенерантов за счёт положительных микробно-растительных эффектов взаимодействия.

### Литература

1. Бутенко Р.Г. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. М.: Наука, 1991. 280 с.
2. Шаяхметов И.Ф. Соматический эмбриогенез и селекция злаковых культур. Уфа: Изд-во Башкирск. Ун-та, 1999. 166 с.

3. Шевелуха В.С. (Отв. ред.) Сельскохозяйственная биотехнология: Учеб. 2-е изд. М.: Высш. шк., 2003. 424 с.

4. Chawla H.S., Wenzel G. In vitro selection of barley and wheat for resistance against // Theor. Appl. Genet. 1987. V. 74. P. 841–845.

5. Волощук Г.Д., Волощук С.И., Гірко В.С. Вплив культуральних фільтратів деяких грибних патогенів на суспензійну культуру пшениці // Цитология и генетика. 1995. Т. 29. № 4. С. 70–77.

6. Трошина Н.Б., Яруллина Л.Г., Сурина О.Б., Максимов И.В. Влияние нитрата железа на рост и защитные реакции каллусов пшеницы от возбудителя твёрдой головни // Агрехимия. 2007. № 4. С. 46–50.

7. Петак А.М., Турияница А.П., Козеровская Н.А. Влияние бактерий рода *Klebsiella* на регенерационные процессы культуры ткани табака и пшеницы // Физиол. и биохим. культ. растений. 1996. Т. 28. № 4. С. 240–245.

8. Pauly M.N., Shane W.W., Gegenbach B.G. Selection for Bacterial blight phytotoxin resistance in wheat culture // Crop. Sci. 1987. V. 27. № 2. P. 340.

9. Каляева А.М., Захарченко Н.С., Доронина Н.В., Рукавцова Е.Б., Алексеева В.В., Иванова Е.Г., Троценко Ю.А., Бурьянов Я.И. Стимуляция роста и морфогенеза растений in vitro ассоциативными метилотрофными бактериями // Физиология растений. 2001. Т. 48. № 4. С. 595–599.

10. Каляева А.М., Иванова Е.Г., Доронина Н.В., Захарченко Н.С., Троценко Ю.А., Бурьянов Я.И. Стимуляция метанотрофными бактериями морфогенеза пшеницы in vitro // Докл. Академии наук. 2003. Т. 388. № 6. С. 847–849.

11. Fall R. Cycling of methanol between plants, methylotrophs and the atmosphere // Microbial growth on C<sub>1</sub> compounds / Eds. Lidstrom M.E., Tabita F.R. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. 1996. P. 343–350.

12. Long R., Morris R., Polacco J. Cytokinin production by plant-associated methylotrophic bacteria // Amer. Soc. Plant Physiol. 1997. Abstr. № 1168.

13. Иванова Е.Г., Доронина Н.В., Шепеляковская А.О., Ламан А.Г., Бровка Ф.А., Троценко Ю.А. Факультативные и облигатные аэробные метиловобактерии синтезируют цитокинины // Микробиология. 2000. Т. 69. № 6. С. 764–769.

14. Иванова Е.Г., Доронина Н. В., Троценко Ю.Ф. Аэробные бактерии синтезируют ауксины // Микробиология. 2001. Т. 70. № 4. С. 452–458.

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

16. Широких И.Г., Широких А.А., Лундовских И.А., Леушина Л.С. Фенотипическая и генотипическая характеристика природных изолятов метилотрофных бактерий // Наука – производство – технологии – экология: Материалы Всерос. науч.-техн. конф. 3 т. Киров: Изд-во ГОУ ВПО «ВятГУ», 2009. Т. 2. С. 115–117.



17. Кравченко Л.В., Боровков А.В., Пшикрил Э. Возможность биосинтеза ауксинов ассоциативными азотфиксаторами в ризосфере пшеницы // Микробиология. 1991. Т. 60. Вып. 5. С. 927–931.
18. Кулаева О.Н. Цитокинины, их структура и функции. М.: Наука, 1973. 253 с.
19. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.
20. Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. 208 с.
21. Муравьева Д.А., Бубенчикова В.Н., Беликов В.В. Спектрофотометрическое определение суммы антоцианов в цветках василька синего // Фармация. 1987. Т. 36. С. 28–29.
22. Физиологические и биохимические методы анализа растений: Практикум / Авт.-сост. Г.Н. Чушахина. Калининград: Калинингр. ун-т, 2000. С. 9–10.
23. Zhou H. Green Plant Regeneration from Anther Culture in Cereals // In Vitro Haploid Production in Higher Plants / Eds Jain S.M., Sopory S.K., Veilleux R.E. Dordrecht: Kluwer, 1996. V. 2. P. 169–187.
24. Izawa T., Ohnishi T., Nakano T., Ishida N., Enoki H., Hashimoto H., Itoh K., Terada R, Wu C., Miyazaki C., Endo T., Iida S., Shimamoto K. Transposon Tagging in Rice // Plant Mol. Biol. 1997. V. 35. P. 219–229.
25. Costa S., Shaw P. ‘Open Minded’ Cells: How Cells Can Change Fate // Trends Cell Biol. 2007. V. 17. P. 101–106.
26. Leyser O. Auxin Distribution and Plant Pattern Formation: How Many Angels Can Dance on the Point of PIN? // Cell. 2005. V. 121. P. 819–822.
27. Gaponenko A.K., Petrova T.F., Sozinov A.A. Cytogenetics of in vitro cultured somatic cells of cereals (Hordeum vulgare L., Triticum aestivum L., T. durum Desf) // XIV Int. Bot. Cong.: Abstr. Berlin. 1987. App. 2. P. 485.
28. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М. 1993. 272 с.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 08-04-13590-офи\_ц.*

УДК 591: 579.253.2: 575.21

## **К проблеме контроля над распространением и использованием трансгенных растений**

© 2010. А. В. Бакулина<sup>1</sup>, аспирант, С. В. Дармова<sup>2</sup>, аспирант, В. М. Бакулин<sup>2</sup>, к.т.н., н.с.,

<sup>1</sup> ГНУ Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства,  
Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого РАСХН,

<sup>2</sup> Вятский государственный университет,  
e-mail: drugaeana1@rambler.ru

В статье рассматривается современное состояние распространения и использования генетически модифицированных растений. Особое внимание уделено вопросам безопасности и разработки эффективных методов идентификации чужеродной ДНК в пищевых продуктах, растительном сырье и продуктах его переработки.

The current state of genetically modified plants spreading and usage is considered in the article. Special attention is paid to the aspects of safety and working out effective methods of identification of alien DNA in foodstuff, vegetative raw materials and products of its processing.

Ключевые слова: генетическая модификация (ГМ), трансгенные растения,  
пищевые продукты, чужеродная ДНК, ПЦР-идентификация

Key words: genetic modification, transgenic plants, foodstuffs,  
alien DNA, PCR-identifications

Генетически модифицированные растения давно перешагнули из области научных экспериментов в область промышленно-коммерческого использования, что вызывает озабоченность органов, контролирующих безопасность продуктов питания [1 – 3]. Ши-

рокое распространение получили трансгенные сельскохозяйственные культуры растений, обладающие различными признаками, отсутствовавшими у данных культур в природе. Помимо высокоурожайных сортов устойчивых к неблагоприятным условиям среды,