

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ»

УДК 623.6; 579.841.11

**ПАСАЛАРИ**  
**Хоссейн Мохаммад**

**ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ,  
УСТОЙЧИВЫХ К ГЛИФОСАТУ И ПАТОГЕНАМ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**по специальности 03.01.06 – биотехнология  
(в том числе бионанотехнологии)**

Минск 2016

Работа выполнена на биологическом факультете Белорусского государственного университета.

Научный руководитель: **Евтушенко Анатолий Николаевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой молекулярной биологии биологического факультета Белорусского государственного университета

Официальные оппоненты: **Шалыго Николай Владимирович**, доктор биологических наук, доцент, член-корреспондент НАН Беларуси, заведующий лабораторией биофизики и биохимии растительной клетки Государственного научного учреждения «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси»

**Ермишин Александр Петрович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетики картофеля Государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»


Оппонирующая организация: Республиканское научное дочернее унитарное предприятие «Институт защиты растений»

Защита состоится «9» декабря 2016 года в 10.00 ч на заседании совета по защите диссертаций Д01.34.01 при Государственном научном учреждении «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220141, г. Минск, ул. Акад. В.Ф. Купревича, 2, Тел.: (017) 267-62-09; факс (017) 267-47-66, e-mail: [microbio@mbio.bas-net.by](mailto:microbio@mbio.bas-net.by).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного научного учреждения «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси».

Автореферат разослан «8» ноября 2016 г.

Ученый секретарь  
совета по защите диссертаций,  
кандидат биологических наук



Семашко Т.В.

## ВВЕДЕНИЕ

Картофель в Республике Беларусь является важнейшей сельскохозяйственной культурой, которая играет существенную роль в обеспечении продовольственной безопасности страны. Беларусь занимает восьмое место в мире по производству картофеля. Генетики и селекционеры ведут постоянную работу по улучшению пищевых и технических характеристик новых сортов картофеля.

Кроме традиционных методов селекции в работе с растениями в настоящее время широко используются новые методы генетической инженерии. Биотехнологи постоянно работают над усовершенствованием методов получения трансгенных растений, преодолевая ряд трудностей, ограничивающих генетические модификации многих видов растений. Методы генной инженерии интенсивно применяются и в работе с картофелем. Это касается разработки достаточно надежных методов его трансформации, высокой регенерационной способности картофеля и т.д.

С этой целью совершенствуются методики трансформации растений картофеля генетическими конструкциями, регенерации рекомбинантных растений, регуляции экспрессии генов. Для устранения возникающих проблем используют методы переноса генов, которые не требуют культуры тканей, например, перспективным является метод агробактериальной трансформации эксплантов растений. К 1976 г. было установлено, что 576 видов двудольных, 42 голосеменных и 5 однодольных растений способны подвергаться агробактериальной трансформации. Однако получение трансгенных однодольных растений с помощью агробактериальной трансформации было долгое время затруднено, поскольку они характеризуются устойчивостью к этому патогену.

В настоящее время, в связи с необходимостью интенсификации производства продовольственных культур перспективным направлением в создании новых сортов растений является получение трансгенных гербицидоустойчивых культур, применение которых позволит получить значительный экономический эффект благодаря увеличению урожая за счет повышения контроля над сорными растениями.

Основной принцип действия гербицидов состоит в нарушении функционирования какого-либо одного из ключевых для метаболизма растений фермента, что приводит в дальнейшем к гибели растения.

В 2008 г. 85 % мировых площадей, отданных под трансгенные культуры, занимали гербицидоустойчивые растения, среди которых почти все были резистентны к гербициду глифосату.

Для Республики Беларусь создание трансгенных растений картофеля,

устойчивых к глифосату, является актуальной задачей, учитывая большие площади, засеваемые данной культурой. В связи с тем, что глифосат ингибирует и развитие микроорганизмов, представляется интересным изучить влияние глифосата и на устойчивость растений к патогенам.

Картофель относится к культурам, сильно поражаемым фитопатогенами. Вредоносность данных возбудителей заболеваний связана с их высокой инфекционной способностью, отсутствием устойчивости к патогенам у большинства существующих сортов. Растения картофеля могут поражаться возбудителями заболеваний как во время вегетации, так и в период хранения семенных клубней, которые служат первичными источниками инфекции. Создаваемые при хранении условия температуры и влажности способствуют развитию фитопатогенов, что приводит к дополнительным потерям урожая картофеля. В связи с этим актуальной задачей является повышение устойчивости новых сортов картофеля к заболеваниям вирусной, бактериальной и грибной этиологии. Методы генетической инженерии позволяют создавать новые сорта растений с более выраженными хозяйственно-ценными признаками, которые трудно получить с помощью традиционной селекции.

Аналогичные проблемы создания и использования генетически модифицированных растений решаются и в Исламской Республике Иран. В 2006 г. в этой стране был получен первый клон картофеля под номером 397007-9, характеризующийся устойчивостью к нескольким вирусам, включая такие как PLRV, PVA, PVS.

При взаимодействии растения с патогеном в клетках начинается репрограммирование экспрессии различных генов, что приводит к включению каскадной активации генов защитного ответа и выключению других генов, не участвующих в этом ответе. Устойчивость растений к патогенам связана с накоплением *PR* (*pathogenesis related*)-белков. *PR*-белки – это особый класс защитных белков, которые экспрессируются в ответ на стрессовые воздействия и контакт с патогеном. К настоящему времени выявлено значительное количество *PR*-генов и белков разных видов растений, для многих из которых изучены особенности структуры и функций, условия активации экспрессии и механизмы их взаимодействия с патогеном.

Исходя из вышеизложенного, актуальным является получение трансгенных растений картофеля, устойчивых к глифосату и патогенам.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Связь работы с научными программами (проектами), темами.** Работа выполнялась в рамках заданий «Белковая инженерия эффективной глифосатоксидазы» (№ госрегистрации 20114964) и «Молекулярный механизм распознавания фитопатогенных бактерий рода *Pectobacterium* растениями семейства

пасленовых» (№ госрегистрации 20141124) ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий».

Диссертация соответствует приоритетному направлению научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016-2020 гг. «Биотехнологии в сельскохозяйственном производстве и пищевой промышленности».

**Цель и задачи исследования.** Целью диссертационной работы являлось получение трансгенных растений картофеля, устойчивых к глифосату и патогенам. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Трансформировать стеблевые экспланты картофеля векторными конструкциями, несущими модифицированный ген *aroA*, обеспечивающий устойчивость к глифосату, и провести регенерацию трансгенных растений картофеля.

2. Осуществить молекулярно-генетический анализ регенерантов картофеля методом ПЦР и ПЦР в реальном времени с праймерами к гену *aroA*.

3. Провести анализ устойчивости трансгенных растений картофеля к различным концентрациям глифосата и к фитопатогенным микроорганизмам.

4. Определить уровни экспрессии *PR*-генов защитного ответа в трансгенных растениях картофеля, резистентных к глифосату, при обработке листьев глифосатом и заражении их бактериями *Pectobacterium atrosepticum* (*Pa*) 21A и *Dickeya dadantii* (*Dd*) ENA49.

**Научная новизна.** Впервые в Республике Беларусь созданы трансгенные растения картофеля, устойчивые к глифосату. В основу их создания были положены технологии с использованием оригинальных плазмид, полученных сотрудниками кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ. Впервые установлен факт значительной активации глифосатом экспрессии *PR*-генов полученных трансгенных растений, обладающих устойчивостью к этому гербициду, в то время как экспрессия данных генов в нетрансгенных растениях при обработке глифосатом увеличивалась незначительно. Повышение степени экспрессии *PR*-генов проявлялось и в случае заражения трансгенных растений фитопатогенными бактериями, причем эффект был намного более выражен в случае предварительной обработки листьев трансгенного картофеля глифосатом. Таким образом, впервые установлен факт значительной индукции генов защитного ответа трансгенного картофеля, устойчивого к глифосату, при обработке данным гербицидом, в том числе и при последующей бактериальной инфекции.

**Положения диссертации, выносимые на защиту.**

1. Векторные конструкции PZH485 и PZH501 обеспечивают интеграцию и экспрессию мутантного гена 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (*aroA*) при агробактериальной трансформации стеблевых эксплантов трех сортов

картофеля. Трансгенные растения картофеля с геном *aroA* приобретают устойчивость к обработке глифосатом в концентрации 3,6 г/л.

2. Обработка глифосатом трансгенных растений картофеля индуцирует экспрессию генов защитного ответа, в особенности гена *PR-2* (в 381 раз) и гена гиперчувствительного ответа *HSR-203J* (в 201 раз), по сравнению с аналогичными показателями у трансгенных растений, не подвергшихся обработке глифосатом.

3. Обработка листьев трансгенных растений картофеля с геном *aroA* глифосатом с последующим заражением фитопатогенными микроорганизмами *Dickeya dadantii* (*Dd*) ENA49 и *Pectobacterium atrosepticum* (*Pa*) 21A приводит к подавлению развития бактериальной инфекции, что сопровождается увеличением степени экспрессии генов защитного ответа *PR-2* (в 1,5 и 2,9 раз) и *HSR-203J* (в 2,5 и 2,4 раза соответственно) по сравнению с уровнем экспрессии этих генов без предварительной обработки глифосатом.

**Личный вклад соискателя.** Все исследования выполнены автором самостоятельно, результаты, полученные соавторами публикаций, в работе не использованы. Научный руководитель оказывал консультативную помощь при постановке целей и задач исследования, обсуждении полученных результатов.

Автор выражает признательность заведующей НИЛ трансгенных растений кафедры молекулярной биологии БГУ, Ph.D., к.б.н. Кулик Е. В. за помощь в планировании экспериментов и советы по оформлению диссертационной работы, доценту кафедры молекулярной биологии БГУ, Ph.D., к.б.н. Николайчику Е. А. и младшему научному сотруднику НИЛ трансгенных растений кафедры молекулярной биологии БГУ Присяженко О.К. за методическую помощь в выполнении молекулярно-биологической части работы; доценту кафедры молекулярной биологии БГУ, к.б.н. Ходосовской А.М. за советы по оформлению диссертационной работы. Также автор благодарит и других сотрудников кафедры молекулярной биологии за поддержку в ходе подготовки диссертационной работы.

**Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов.** Результаты диссертации апробированы и опубликованы в сборниках материалов Международной научно-практической конференции «Современное состояние и перспективы инновационного развития овощеводства» (г. Самохваловичи, 2014); Международной научной конференции «Молодежь в науке – 2014» (Минск, 2014); V Всероссийском симпозиуме «Трансгенные растения: Технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность» (Москва, 2014); Международной научно-практической конференции «Современное состояние и перспективы инновационного развития овощеводства» (г. Самохваловичи, 2015); II Международной научной конференции, посвящённой 50-летию основания Института генетики цитологии НАН Беларуси, «Генетика и биотехнология XXI

века: проблемы, достижения, перспективы» (Минск, 2015); IX Международной научной конференции, посвященной 50-летию юбилею Института (Отдела) микробиологии НАН Беларуси, «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2015); VI Международной научно-практической конференции «Актуальные направления научных исследований: от теории к практике» (Россия, Чебоксары, 2015); XXVI Студенческой международной научно-практической конференции «Молодежный научный форум: Естественные и медицинские науки» (Россия, Москва, 2015); VIII Международной мультидисциплинарной конференции «Актуальные проблемы науки XXI века» (Россия, Москва, 2016).

Результаты исследований используются при чтении спецкурса «Молекулярная биотехнология» для студентов 3 и 4 курсов специализации «Молекулярная биология» на биологическом факультете БГУ (акт о практическом использовании результатов исследования в учебном процессе в 2016 г.).

**Опубликованность результатов диссертации.** По теме диссертации имеется 12 публикаций. Из них 3 статьи в рецензируемых научных журналах, 2 статьи в рецензируемых сборниках научных трудов и 7 тезисов докладов выступлений на конференциях и конгрессах. Общий объем опубликованных научных работ – 3,3 авторских листа, из них в изданиях перечня ВАК – 1,5 авторских листа.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, главы, посвященной описанию материалов и методов исследований, 2 глав результатов собственных исследований, заключения, библиографического списка (36 отечественных и 144 иностранных источников), списка работ соискателя, 2 приложений. Работа изложена на 95 страницах машинописного текста, включает 15 рисунков и 11 таблиц.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В работе приведены литературные данные о селекции новых сортов картофеля, о стратегии и методологии создания трансгенных растений, дана характеристика векторных систем, используемых для трансформации растительных клеток, описаны молекулярные механизмы действия гербицида глифосата и природа чувствительности к нему растений. Кроме того охарактеризованы возбудители заболеваний картофеля и представлена информация о роли *PR*- генов в устойчивости к патогенам.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили растения картофеля *Solanum tuberosum* L. сортов белорусской селекции: *Одиссей*, *Скарб*, *Ветразь*. В работе использовали штаммы бактерий из коллекции кафедры молекулярной биологии *Agrobacterium tumefaciens* AGLO, *A. tumefaciens* LBA4404, *Pectobacterium atrosepticum* 21A, *Dickeya dadantii* ENA49 и плазмиды PZH501 и PZH485 с мутантным геном 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (*aroA*) *D. dadantii*, обеспечивающим устойчивость к ингибированию глифосатам. Для культивирования бактерий и подсчета их численности использовали стандартные среды LB.

Клетки *A. tumefaciens* трансформировали с использованием хлорида кальция (метод замораживания-оттаивания).

Для трансформации использовали стеблевые экспланты, полученные из проростков картофеля 4-х недельного возраста. Использовали только первые 6 междоузлий, начиная от верхушки. Агробактерии выращивали в течение 12-15 часов в термостате (28 °C) на среде LB без антибиотиков (ночная культура). Экспланты инкубировали в 30 мл жидкой LB, содержащей 1:10 ночной культуры агробактерий, в течение 15 мин, затем подсушивали на стерильном фильтре и помещали на чашки Петри со средой SIM1 (Beaujean A. et al, 1998). После 2 дней совместной с бактериями культивации экспланты помещали на среду SIM1, содержащую 150 мг/л тиментина и 25 мг/л канамицина. После 7 дней культивации экспланты переносили на среду SIM1 (Beaujean A. et al, 1998). В дальнейшем экспланты переносили на свежую среду SIM1 каждые 2 недели до появления побегов (рисунок 1).

Для заражения листьев картофеля сорта *Одиссей* использовали бактерии *P. atrosepticum* 21A и *D. dadantii* ENA49, выращенные на плотной агаризованной питательной среде LB при 28 °C в течение 16-18 ч., после чего их смывали 0.85 % раствором NaCl. Клетки бактерий осаждали центрифугированием и ресуспендировали в стерильном физиологическом растворе. На поврежденную стерильным скальпелем поверхность листа наносили 10 мкл бактериальной суспензии (примерно  $2 \times 10^7$  клеток). Листья помещали в чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу и инкубировали в климатической камере. Для подсчета количества клеток в зараженной ткани листья помещали в пробирку с физиологическим раствором, растирали до гомогенного состояния и из полученной суспензии после разведения физиологическим раствором делали высевы на чашки с питательным агаром. Подсчет колоний проводили через 48 часов инкубирования посевов при 28 °C.

Выделение ДНК из листьев картофеля осуществляли по стандартной методике DNAzol<sup>R</sup> Genomic DNA Isolation Reagent. Выделение РНК из листьев картофеля проводили с использованием горячего фенола, либо с помощью коммерческого набора NucleoSpin<sup>R</sup> (Macherey-Nagel, Германия) RNA Plant,



синтез первой цепи кДНК – по протоколу «Invitrogen». Выделенную суммарную РНК использовали для синтеза кДНК. Экспрессию генов определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием амплификатора детектирующего ДТ-96 (ДНК-Технологии, Россия) и соответствующих пар праймеров. Расчеты уровня экспрессии генов проводили по следующей схеме: определяли разницу значений ( $\Delta C_t$ ), вычитая из значения конститутивно экспрессирующегося гена *EF-1 $\alpha$*  пороговое значение ( $C_t$ ) *PR*-генов. В качестве минимального значения ( $\min(\Delta C_t)$ ) было выбрано значение, полученное при использовании листьев картофеля, не обработанных глифосатом. Относительное количество копий мРНК ( $N(\text{мРНК})$ ) определяли по формуле:

$$N(\text{мРНК}) = 2^{(\Delta C_t - \min(\Delta C_t))}, \text{ где}$$

$N$  - Относительное количество копий мРНК

**Статистическая обработка результатов.** Для статической обработки данных и сравнения экспериментальных данных использовали методы, принятые в биологии, такие как двухвыборочный t-тест. Большинство приведенных в работе экспериментальных данных являются усредненными величинами 3-5 опытов.

Доверительный интервал среднего арифметического рассчитывали для 95 % уровня вероятности. Достоверность отклонения показателей исследуемых образцов от контроля определялась с вероятностью 0,05.

Для большинства расчетов использовались компьютерные программы «Microsoft Excel 2003, ORiGIN pro 8».

## **СОЗДАНИЕ И ОТБОР ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ МЕТОДОМ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ**

В ходе проведения агробактериальной трансформации стеблевых эксплантов растений картофеля сорта *Скарб* было получено 42  $\text{Km}^R$ -трансгенных регенеранта с векторной конструкцией PZH485 и 32  $\text{Km}^R$ -трансгенных регенеранта с векторной конструкцией PZH501, для сорта *Одиссей* – 51 трансгенный  $\text{Km}^R$ -регенерант с векторной конструкцией PZH485 и 63 трансгенных  $\text{Km}^R$ -регенеранта с векторной конструкцией PZH501, для сорта *Ветразь* – 41 трансгенный  $\text{Km}^R$ -регенерант с векторной конструкцией PZH485 и 51 трансгенный  $\text{Km}^R$ -регенерант с векторной конструкцией PZH501, укоренившихся на среде с канамицином (таблица 1, рисунок 1).

Таблица 1. – Эффективность трансформации картофеля различных сортов

Сорт	Трансформировано эксплантов плазмидой PZH485	Трансформировано эксплантов плазмидой PZH501	Число трансформантов с плазмидой PZH485 (Km <sup>R</sup> )	Число трансформантов с плазмидой PZH501 (Km <sup>R</sup> )	% транс-генов с плазмидой PZH485 (Km <sup>R</sup> , aroA)	% транс-генов с плазмидой PZH501 (Km <sup>R</sup> , aroA)
<i>Одиссей</i>	150	150	51	63	43	40
<i>Скарб</i>	150	150	42	32	36	20
<i>Ветразь</i>	150	150	41	51	33	20



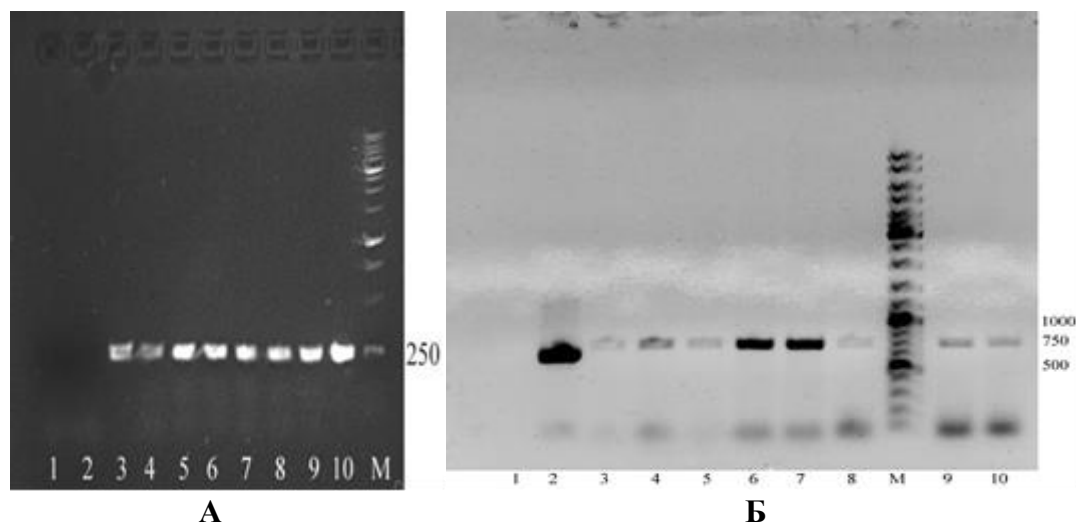
а, б, в – Каллусообразование и регенерация побегов из межузловых эксплантов, культивированных на среде SIM1; г, д, е – Формирование побегов и листьев и их дифференциация через 4 недели на среде SIM1; ж, з – Три трансформированных клона через 7-8 недель после начала культивирования.

Рисунок 1. – Регенерация *in vitro* трансгенных растений картофеля сорта *Одиссей*: морфологический анализ

После культивирования на среде с глифосатом часть  $Km^R$ -регенерантов погибала, и выживаемость составляла от 20 % до 43 % от общего числа  $Km^R$ -регенерантов для разных сортов картофеля (таблица 1), т.е. число истинных трансформантов по гену *aroA* было ниже, чем число  $Km^R$ -регенерантов. Полученные трансформанты культивировали до формирования стеблей и корневой системы на среде Мурасиге-Скуга с канамицином, тиментином и глифосатом. Сформированные растения переносили сначала в стерильную почву в закрытом сосуде для предохранения от пересыхания, а через неделю культивировали в открытом сосуде при естественном освещении. Морфологический анализ регенерации *in vitro* трансгенных растений картофеля сорта *Одиссей* представлен на рисунке 1.

### МОЛЕКУЛЯРНО-ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ, УСТОЙЧИВЫХ К ГЕРБИЦИДУ ГЛИФОСАТУ

Для постановки молекулярно-генетических экспериментов трансгенные растения картофеля выращивали из клубней в горшках в условиях климатической камеры при температуре 22 °С и длиной светового дня 16 часов в течение 60 суток. Для выделения ДНК и обработки глифосатом отбирали листья с середины побегов. Все отобранные листья анализировали методом ПЦР на наличие в растительном геноме бактериального гена *aroA* (рисунок 2).



**А – В качестве матриц использовались: 1 – Вода, 2 – ДНК нетрансгенного картофеля, 3 – Плаزمида рZH485, 4-10 – ДНК образцов, М – Маркерная ДНК (1 kb DNA ladder Mix, Fermentas). – Б – В качестве матриц использовались: 1 – ДНК нетрансгенного картофеля, 2 – Плазмида рZH485, 3-7 – ДНК образцов, 8-10 – ДНК образцов, М – Маркерная ДНК (1 kb DNA ladder Mix, Fermentas).**

**Рисунок 2. – Электрофореграмма ПЦР-продуктов с праймерами к различным участкам гена *aroA*, полученных с ДНК и кДНК, выделенными из трансформированного плазмидой PZH485 картофеля сорта *Одиссей***

С целью выявления активации чужеродного гена на уровне транскрипции проводили синтез кДНК с последующей реакцией амплификации целевого гена. Для этого выделяли фракцию мРНК с использованием набора Nucleospin<sup>R</sup> RNA Plant (Macherey-Nagel, Германия). Препараты ДНК и кДНК использовали в качестве матриц в ПЦР с праймерами к различным участкам гена *aroA*, амплификация которых приводила к образованию соответствующих продуктов с размерами 250 и 750 п.о. Регистрация ампликона в результате ПЦР с использованием кДНК указывала на экспрессию гена.

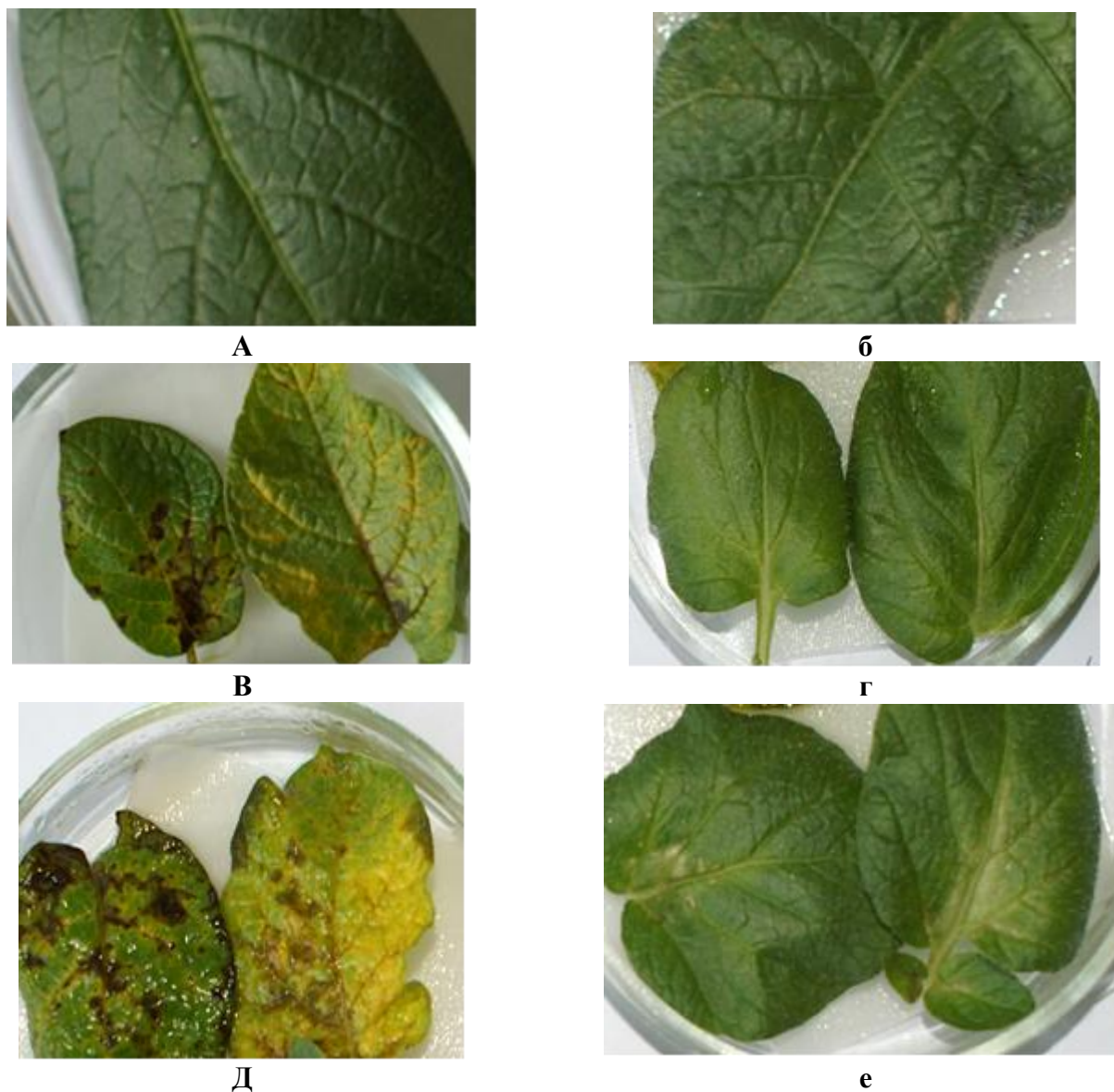
Полученные на среде Мурасига-Скуга (MS) растения сорта *Одиссей* черенковали и использовали для определения их устойчивости к глифосату. С этой целью черенки переносили на среду MS, не содержащую глифосат, а также с добавлением глифосата в концентрации 0,1 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 5 мМ, 10 мМ. В качестве контроля использовали черенки нетрансгенного картофеля. Рост и формирование нетрансгенных растений наблюдали только при использовании глифосата в концентрации 0,1 мМ, а также на среде не содержащей такового. Трансгенные растения картофеля развивались на всех средах с глифосатом, но в случае концентрации гербицида 5 и 10 мМ рост был замедленным.

В другой серии экспериментов для определения устойчивости растений к глифосату проводили обработку листьев трансгенного картофеля сорта *Одиссей* раствором глифосата в концентрации 1,8 г/л и 3,6 г/л (рисунок 3).

Листья помещали на увлажненную фильтровальную бумагу в чашки Петри и инкубировали в условиях климатической камеры при температуре 24 °С и 16-часовом световом дне. В качестве контроля использовали листья нетрансгенных растений. Через три дня инкубации наблюдали лишь очень слабое пожелтение необработанных глифосатом листьев трансгенных и нетрансгенных растений. Раствор глифосата в концентрации 1,8 г/л вызвал более заметное пожелтение листьев контрольных нетрансгенных растений по сравнению с трансгенными растениями. Более выраженный эффект глифосата проявлялся при его использовании в концентрации 3,6 г/л. Листья, собранные с контрольных растений, пожелтели и покрылись темными пятнами. Листья трансгенных растений не изменили окраски, но более продолжительное инкубирование (в течение 10 дней) приводило и к их пожелтению, что свидетельствует об относительной устойчивости к глифосату.

Количественное измерение экспрессии генов защитного ответа картофеля при обработке листьев глифосатом определяли следующим образом: для обработки глифосатом отбирали листья с середины побегов. Для изучения экспрессии *PR*-генов картофеля использовали метод ПЦР в реальном времени. С этой целью выделяли фракцию мРНК по стандартной методике с помощью NucleoSpin<sup>R</sup> RNA Plant (Macherey-Nagel, Германия) и также с использованием

методики, в которой применяется горячий фенол. После измерения концентрации выделенной РНК синтезировали кДНК.



**а, б – Листья нетрансгенных и трансгенных растений картофеля до обработки глифосатом; в, г – Листья нетрансгенных и трансгенных растений картофеля, обработанных глифосатом (1,8 г/л); д, е – Листья нетрансгенных и трансгенных растений картофеля, обработанных глифосатом (3,6 г/л).**

**Рисунок 3. – Действие глифосата на листья растений картофеля сорта *Одиссей***

Индукцию системного ответа растений детектировали методом количественной ПЦР (кПЦР) по уровню экспрессии известных *PR*-генов *S. tuberosum*. Количество кДНК определяли, используя интеркалирующий краситель *SYBR Green*. В качестве референсного гена использовали *EF-1α*. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе ДТ-96 (ДНК-технология,

Россия) с модулем детекции продуктов в режиме реального времени. В первой серии экспериментов было определено относительное количество копий мРНК генов защитного ответа в клетках ткани листьев нетрансгенного картофеля, обработанных глифосатом (таблица 2).

Таблица 2. – Уровни экспрессии генов защитного ответа в клетках ткани листьев нетрансгенного картофеля сорта *Одиссей* в зависимости от наличия обработки глифосатом

Гены	Относительное количество копий мРНК	
	Необработанные листья	Обработанные листья
<i>PR2</i>	0,03 ± 0,01	0,30 ± 0,02*
<i>PR3</i>	0,03 ± 0,02	0,40 ± 0,10*
<i>PR5</i>	0,04 ± 0,01	0,30 ± 0,06*
<i>HIN1</i>	0,06 ± 0,03	0,20 ± 0,05
<i>HSR-203j</i>	0,02 ± 0,01	0,40 ± 0,15*

Примечание: \* – достоверные различия при  $p < 0,05$ .

Уровни экспрессии генов защитного ответа в растениях нетрансгенного картофеля были невысокими, после обработки глифосатом наблюдалось увеличение степени их экспрессии, наиболее выраженное для генов *HSR-203j*, *PR3* и *PR2* (рисунок 4а).

Во второй серии экспериментов было определено относительное количество копий мРНК генов защитного ответа в клетках листьев трансгенного картофеля, обработанных глифосатом (таблица 3).

Таблица 3. – Уровни экспрессии генов защитного ответа в клетках ткани листьев трансгенного картофеля сорта *Одиссей* в зависимости от наличия обработки глифосатом

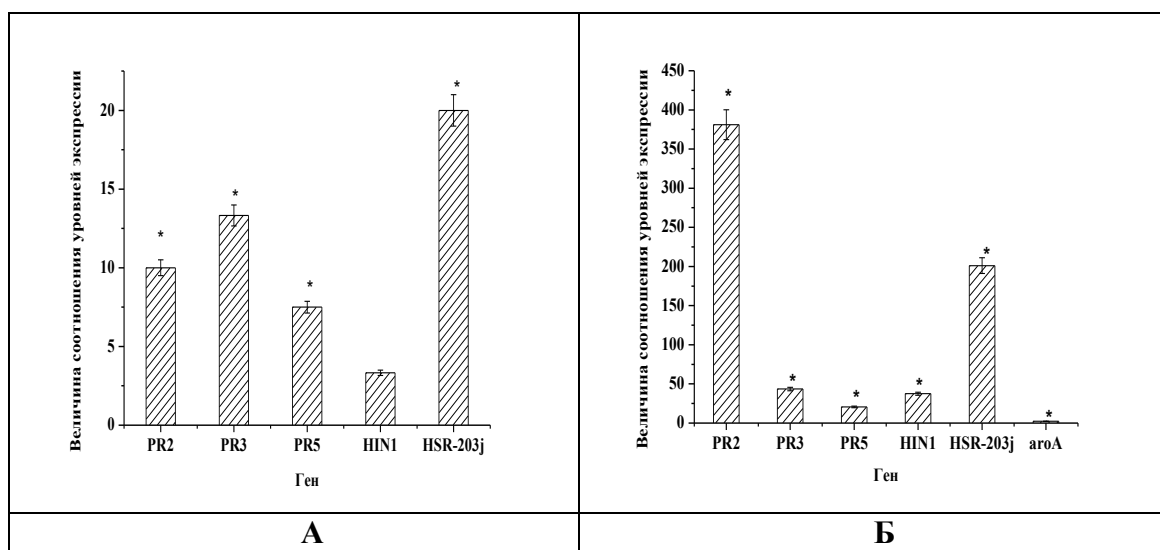
Гены	Относительное количество копий мРНК	
	Необработанные листья	Обработанные листья
<i>PR2</i>	0,10 ± 0,05	38,10 ± 0,10*
<i>PR3</i>	0,20 ± 0,03	8,70 ± 0,12*
<i>PR5</i>	0,30 ± 0,04	6,20 ± 0,01*
<i>HIN1</i>	0,20 ± 0,05	7,50 ± 0,16*
<i>HSR-203j</i>	0,15 ± 0,12	30,20 ± 0,04*
<i>aroA</i>	8,10 ± 0,03	18,60 ± 0,12*

Примечание: \* – достоверные различия при  $p < 0,05$ .

Развитие системного защитного ответа *S. tuberosum* определяли по уровню экспрессии набора *PR*-генов в листьях растений через 3 суток после обработки глифосатом. В данном эксперименте удалось зафиксировать увеличение уровня экспрессии для всех *PR*-генов (таблица 3). На рисунке 4б показаны изменения

уровней экспрессии генов защитного ответа у трансгенных растений картофеля сорта *Одиссей* после обработки глифосатом. Без обработки глифосатом уровни экспрессии генов защитного ответа в клетках трансгенного картофеля были низкими и различались примерно в 2-3 раза. Но обработка глифосатом приводила к резкому повышению уровня экспрессии всех исследуемых генов в клетках трансгенного картофеля. Наиболее сильной оказалась индукция генов *PR-2* и экспрессия маркера гиперчувствительности *HSR-203J*. Количество мРНК для гена *PR-2* увеличивалось в 381 раз, а для гена *HSR-203J* – в 201 раз. Значительно возрастала также экспрессия генов *PR5*, *HIN1* и *PR3*, что выражалось в увеличении относительного количества копий мРНК этих генов в 20,7; 37,5 и 43,5 раза соответственно (рисунок 4б). Наблюдаемый эффект сравним с реакцией *PR*-генов на бактериальную инфекцию.

Возможно, сильный индуцирующий эффект глифосата на экспрессию генов защитного ответа связан с его токсическим эффектом на клетки растений. При обработке глифосатом листьев трансгенного картофеля часть клеток может погибать в силу либо разной чувствительности их к глифосату, либо из-за неравномерного распределения глифосата по растению (часть клеток получают концентрацию глифосата выше уровня устойчивости). При гибели клеток происходит индукция защитных механизмов по типу приобретенной системной резистентности (SAR).



**Рисунок 4. – Изменения уровней экспрессии генов защитного ответа у нетрансгенных (А) и трансгенных (Б) растений картофеля сорта *Одиссей* после обработки глифосатом**

Примечание: \* – достоверные отличия степени экспрессии генов у обработанных глифосатом растений по сравнению с необработанными при  $p < 0,05$ .

Также было изучено влияние обработки листьев глифосатом на устойчивость картофеля к патогенам *Pectobacterium atrosepticum* (Pa) 21A, *Dickeya dadantii* (Dd) ENA49, *Phytophthora infestans*.

В первой серии экспериментов было определено количество клеток фитопатогенных бактерий *P. atrosepticum* (Pa) 21A и *D. dadantii* (Dd) ENA49 спустя 2 и 7 суток после заражения листьев трансгенного картофеля, обработанных глифосатом. В качестве контроля брали зараженные листья картофеля без обработки глифосатом (таблица 4).

Таблица 4. – Количество клеток бактерий *P. atrosepticum* 21A и *D. dadantii* ENA49 на листьях трансгенных растений картофеля сорта *Одиссей* в зависимости от наличия обработки глифосатом

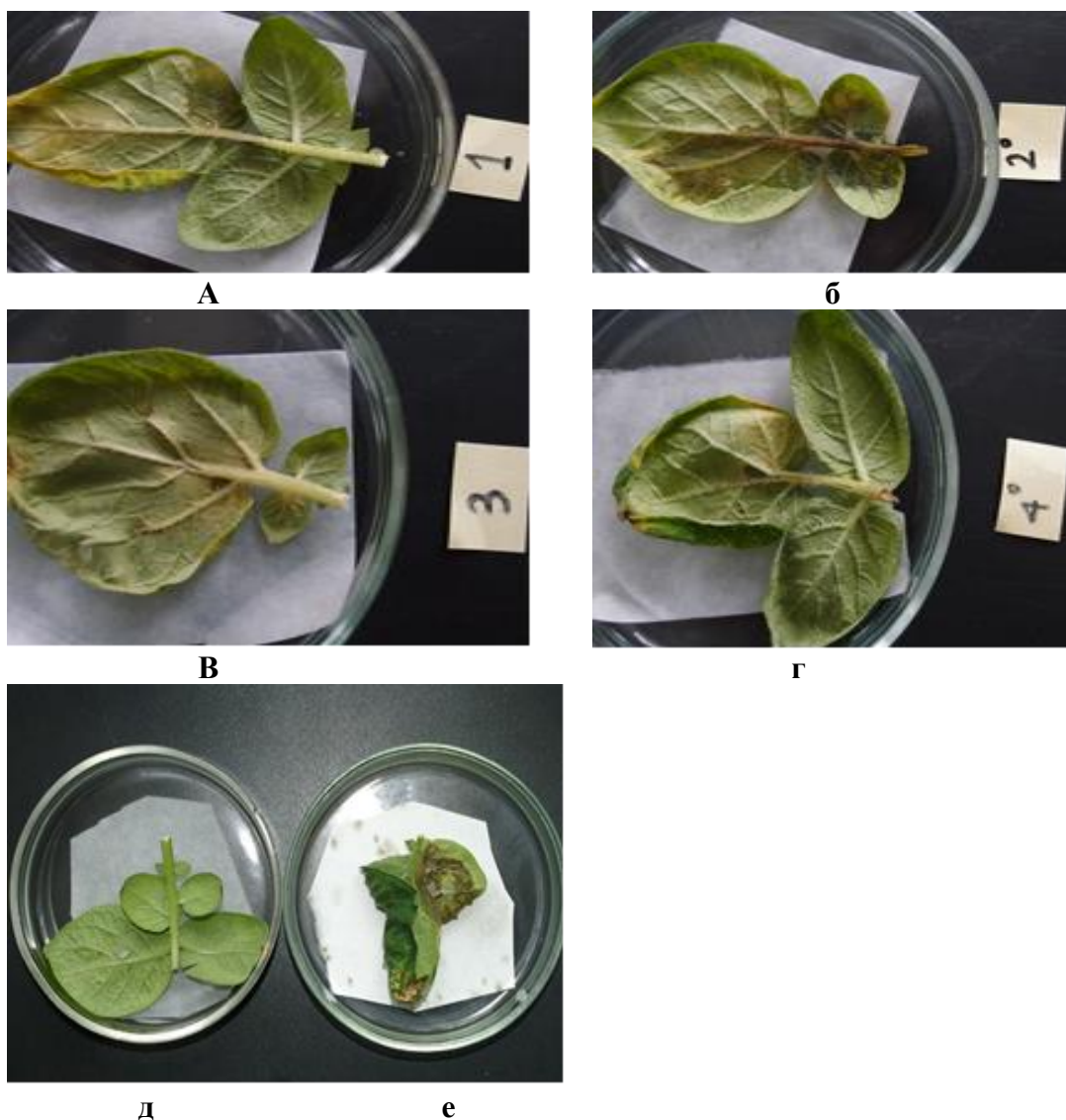
Штаммы бактерий	<i>P. atrosepticum</i> 21A		<i>D. dadantii</i> ENA49	
	Без обработки Глифосатом	С обработкой глифосатом	Без обработки глифосатом	С обработкой глифосатом
Количество клеток бактерий ( $\times 10^8$ ) через 2 суток после заражения	9,24 $\pm$ 1,24	3,41 $\pm$ 0,45*	7,34 $\pm$ 0,95	4,98 $\pm$ 0,74*
Количество клеток бактерии ( $\times 10^8$ ) через 7 суток после заражения	8,18 $\pm$ 1,12	2,55 $\pm$ 0,37*	7,32 $\pm$ 1,20	3,19 $\pm$ 0,56*

Примечание: \* – достоверные различия при  $p < 0,05$ .

На необработанных глифосатом листьях количество клеток бактерий *D. dadantii* ENA49 и *P. atrosepticum* 21A на 2-е сутки наблюдения возрастало в 36,7 и 46,2 раза соответственно (начальное количество клеток –  $2 \times 10^7$ ) и сохранялось почти на таком же уровне и на 7-е сутки. На листьях, обработанных глифосатом, количество бактерий *D. dadantii* ENA49 и *P. atrosepticum* 21A на 2-е сутки возрастало в 24,9 и 17,1 раза соответственно. На 7-е сутки наблюдения количество бактерий, которые были высеяны с обработанных глифосатом листьев, уменьшилось по сравнению с таковым на 2-е сутки наблюдения в 1,6 раза в случае заражения бактериями *D. dadantii* ENA49 и в 1,3 раза – в случае использования бактерий *P. atrosepticum* 21A. Уменьшение количества бактерий на листьях трансгенного картофеля, обработанного глифосатом, коррелировало с отсутствием симптомов бактериального поражения (рисунок 5).

Таким образом, в листьях трансгенного картофеля при обработке глифосатом наблюдается подавление развития фитопатогенных бактерий, что коррелирует с повышенным уровнем экспрессии генов защитного ответа, и это в конечном итоге обеспечивает их устойчивость к бактериозам.





а – Обработанные глифосатом и зараженные бактериями *Pa* 21А листья;  
 б – Необработанные глифосатом и зараженные бактериями *Pa* 21А листья;  
 в – Необработанные глифосатом и зараженные бактериями *Dd* ENA49 листья;  
 г – Обработанные глифосатом и зараженные бактериями *Dd* ENA49 листья;  
 д – Обработанные глифосатом и зараженные *Ph. infestans* листья;  
 е – Необработанные глифосатом и зараженные *Ph. infestans* листья.  
 Рисунок 5. – Обработка листьев трансгенных растений картофеля сорта *Одиссей* глифосатом в концентрации 1,8 г/л и заражение бактериями *Pa* 21А, *Dd* ENA49 и оомицетом *Ph. infestans*

Во второй серии экспериментов листья трансгенных растений картофеля сорта *Одиссей* обработали глифосатом и заразили двумя штаммами фитопатогенного оомицета *Phytophthora infestans* – возбудителя фитофтороза картофеля. В качестве контроля брались листья необработанных глифосатом растений картофеля (рисунок 5).

Заражение *Ph. infestans* растений трансгенного картофеля проводили в условиях климатической камеры. Препарат спор и конидий наносили каплями на листовые пластинки. Листья инкубировали в течение 7 дней в условиях влажной камеры. Учитывали степень поражения листьев по количеству некротических пятен и числу пораженных листьев по 5-ти бальной шкале. На необработанных глифосатом листьях картофеля, зараженных *Ph. infestans*, появились четкие симптомы поражения фитофторозом, в то время как на обработанных глифосатом листьях поражений не наблюдали.

Таким образом, листья растений, предварительно обработанные глифосатом, оказались более устойчивыми к заражению фитофторой (2 балла), чем необработанные (4 балла), т.е. обработка глифосатом листьев трансгенного картофеля предотвращала развитие фитофтороза.

Для того чтобы изучить экспрессию генов защитного ответа картофеля при бактериальной инфекции и обработке листьев глифосатом для заражения листьев картофеля сорта *Одиссей* использовали бактерии *Pa* 21A и *Dd* ENA49, выращенные на плотной агаризованной питательной среде LB при 28 °C в течение 16-18 ч., после чего их смывали 0.85 % -ным раствором NaCl. Количество клеток в полученных суспензиях выравнивали по оптической плотности. С помощью шприца вводили полученную суспензию клеток штаммов *Pa* 21A или *Dd* ENA49 в нижние части листьев.

Для выделения РНК образцы тканей растений массой 100 мг из второго настоящего листа отбирали через 3 суток после инфильтрации. Для каждого варианта опыта отбиралось по три образца. РНК из отобранных образцов листьев картофеля выделяли по методике, в которой применяется горячий фенол.

В первой серии экспериментов было определено относительное количество копий мРНК генов защитного ответа в клетках ткани листьев картофеля при бактериальной инфекции без предварительной обработки глифосатом (таблица 5).

Согласно результатам, представленным в таблице 5, при заражении интактных листьев трансгенного картофеля фитопатогенными бактериями обоих видов наблюдается высокий уровень экспрессии генов защитного ответа, особенно гена *PR-2*: относительное количество копий мРНК составило  $14,90 \pm 0,15$  в случае заражения бактериями *Pa* 21A и  $13,25 \pm 0,33$  – в случае заражения бактериями *Dd* ENA49.

Во второй серии экспериментов было определено относительное количество копий мРНК генов защитного ответа в клетках ткани листьев картофеля, обработанных глифосатом в концентрации 1,8 г/л и зараженных бактериями *P. atrosepitum* (*Pa*) 21A и *D. dadantii* (*Dd*) ENA49 (таблица 6).

Таблица 5. – Уровни экспрессии генов защитного ответа в клетках ткани листьев трансгенного картофеля сорта *Одиссей*, зараженного бактериями *P. atrosepticum* (*Pa*) 21A и *D. dadantii* (*Dd*) ENA49 без предварительной обработки глифосатом

Гены	Относительное кол-во копий мРНК	
	<i>Pa</i> 21A	<i>Dd</i> ENA49
<i>PR2</i>	14,90 ± 0,15	13,25 ± 0,33
<i>PR3</i>	7,30 ± 2,01	7,07 ± 0,38
<i>PR5</i>	6,50 ± 2,01	7,06 ± 0,80
<i>HIN1</i>	7,20 ± 0,23	6,91 ± 0,28
<i>HSR-203J</i>	12,06 ± 2,10	10,85 ± 0,82
<i>aroA</i>	7,90 ± 2,01	9,10 ± 2,32

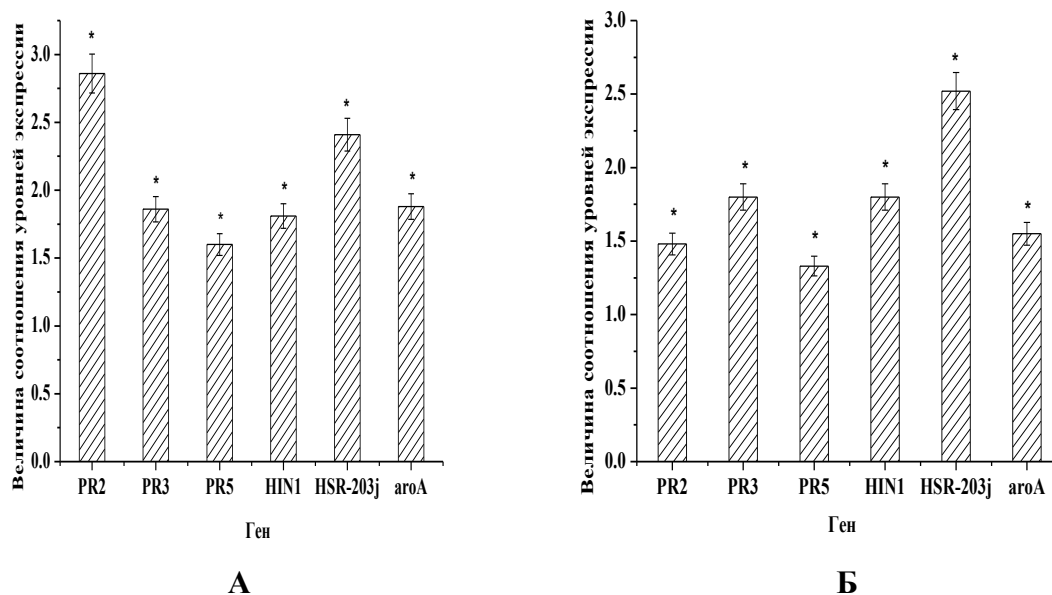
Таблица 6. – Уровни экспрессии генов защитного ответа в клетках ткани листьев трансгенного картофеля сорта *Одиссей*, обработанного глифосатом (1,8 г/л) и зараженного бактериями *P. atrosepticum* (*Pa*) 21A и *D. dadantii* (*Dd*) ENA49

Гены	Относительное кол-во копий мРНК	
	<i>Pa</i> 21A	<i>Dd</i> ENA49
<i>PR2</i>	42,70 ± 2,31	19,70 ± 7,26
<i>PR3</i>	13,65 ± 0,12	12,78 ± 2,33
<i>PR5</i>	10,40 ± 3,21	9,40 ± 1,26
<i>HIN1</i>	13,05 ± 6,14	12,50 ± 1,80
<i>HSR-203J</i>	29,12 ± 2,14	27,37 ± 2,73
<i>aroA</i>	14,90 ± 2,10	14,16 ± 2,67

Из результатов, представленных в таблице 6, можно сделать вывод о том, что при заражении обработанных глифосатом листьев трансгенного картофеля уровни экспрессии генов защитного ответа значительно возрастают, особенно для генов *PR-2* и *HSR-203J*. Относительное количество копий мРНК этих генов составляет соответственно 42,70 ± 2,31 и 29,12 ± 2,14 при использовании в эксперименте бактерий *P. atrosepticum* (*Pa*) 21A и 19,70 ± 7,26 и 27,37 ± 2,73 – в случае использования бактерий *D. dadantii* (*Dd*) ENA49. Увеличение уровня экспрессии генов защитного ответа в клетках трансгенного картофеля после обработки глифосатом коррелирует с устойчивостью обработанных глифосатом листьев к бактериальной инфекции.

На рисунке 6 показано изменение уровней экспрессии генов защитного ответа листьев трансгенных растений сорта *Одиссей* при обработке глифосатом и

заражении листьев бактериями *Pa* 21A и *Dd* ENA49 по сравнению с необработанными гербицидом и зараженными бактериями листьями растений.



**Рисунок 6. – Изменения уровней экспрессии генов защитного ответа и гена *aroA* у трансгенных растений картофеля сорта *Одиссей* при обработке листьев глифосатом и заражении бактериями *Pa* 21A (А) и *Dd* ENA49 (Б) по сравнению с необработанными глифосатом и зараженными бактериями листьями**

Примечание: \* – достоверные отличия степени экспрессии генов у обработанных глифосатом растений по сравнению с необработанными при  $p < 0,05$ .

Из представленного рисунка следует, что при заражении листьев трансгенного картофеля, предварительно обработанных глифосатом, уровни экспрессии всех исследуемых генов возрастают по сравнению с таковыми значениями в необработанных глифосатом и зараженных бактериями листьях. Выявленный эффект наблюдается как в случае заражения бактериями *P. atrosepticum* (*Pa*) 21A, так и бактериями *D. dadantii* (*Dd*) ENA49. Наиболее выраженная индукция глифосатом экспрессии генов выявляется в случае гена *PR-2* (в 1,5 и 2,9 раза при заражении *D. dadantii* (*Dd*) ENA49 и *P. atrosepticum* (*Pa*) 21A соответственно) и в случае гена *HSR-203J* (в 2,5 и 2,4 раза при заражении *D. dadantii* (*Dd*) ENA49 и *P. atrosepticum* (*Pa*) 21A соответственно), что коррелирует с устойчивостью обработанных глифосатом листьев к бактериальной инфекции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Методом агробактериальной трансформации стеблевых эксплантов картофеля трех сортов белорусской селекции (сорта *Одиссей*, *Скарб*, *Ветразь*) плазмидами PZH485 и PZH501, содержащими мутантный бактериальный ген 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (*aroA*), получены трансгенные растения, устойчивые к глифосату [4, 5, 6, 8].

2. Наличие гена *aroA* в геноме трансгенных растений картофеля доказано полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с праймерами к ДНК данного гена и в реакции ПЦР в реальном времени с праймерами к кДНК гена *aroA* [4, 5, 8, 11].

3. Линии трансгенных растений картофеля сорта *Одиссей* развивались на среде MS с глифосатом в концентрациях до 10 мМ. Листья трансгенных растений картофеля, выращенных в условиях закрытого грунта, были устойчивы к обработке глифосатом в концентрации 3,6 г/л [1, 2, 7, 9, 10].

4. Обработка листьев трансгенного картофеля *Solanum tuberosum* L. глифосатом приводит к индукции генов системного защитного ответа (*PR*-генов) в сравнении с необработанными трансгенными растениями. Наиболее сильной оказалась индукция генов *PR-2* и экспрессия гена гиперчувствительного ответа *HSR-203J*: относительное количество копий мРНК повышалось в 381 раз для гена *PR-2* и в 201 раз для гена *HSR-203J* [2, 3, 12].

5. На необработанных глифосатом листьях трансгенных растений картофеля сорта *Одиссей* количество клеток фитопатогенных бактерий *D. dadantii* (*Dd*) ENA49 и *P. atrosepticum* (*Pa*) 21A на вторые сутки после заражения возрастает в 36,7 и 46,2 раза (начальное количество  $2 \times 10^7$ ) и сохраняется на этом же уровне и на 7-е сутки. На обработанных глифосатом листьях трансгенных растений картофеля данного сорта количество бактерий на 2-е сутки увеличивается лишь в 24,9 и 17,1 раза, а на 7-е сутки уменьшается в 1,6 и 1,3 раза (по сравнению со 2-ми сутками) соответственно, что сопровождается отсутствием симптомов бактериального поражения. Обработка глифосатом листьев трансгенного картофеля также повышает их устойчивость к заражению фитопатогенным оомицетом *Phytophthora infestans* [3, 5].

6. При заражении листьев трансгенного картофеля сорта *Одиссей* фитопатогенными бактериями *Dickeya dadantii* (*Dd*) ENA49 и *Pectobacterium atrosepticum* (*Pa*) 21A наблюдается высокий уровень экспрессии генов защитного ответа, особенно гена *PR-2*. Но при заражении этими бактериями листьев трансгенного картофеля, предварительно обработанных глифосатом, уровни экспрессии генов защитного ответа возрастают: для гена *PR-2* в 1,5 и 2,9 раза и

для гена *HSR-203J* – в 2,5 и 2,4 раза соответственно по сравнению с таковыми значениями в необработанных глифосатом и зараженных бактериями листьях, что коррелирует с устойчивостью обработанных глифосатом листьев к бактериальной инфекции [2, 3, 12].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

Полученные трансгенные растения картофеля с бактериальным геном *aroA* могут быть использованы в научно-исследовательской работе в качестве объектов для расшифровки молекулярных механизмов действия глифосата на иммунитет растений.

Введение в сельскохозяйственное использование генетически модифицированных растений картофеля, устойчивых к глифосату и фитопатогенам, может значительно снизить потери сельскохозяйственной продукции от сорняков и заболеваний растений.

Результаты исследований используются при чтении спецкурса «Молекулярная биотехнология» для студентов 3 и 4 курсов специализации «Молекулярная биология» на биологическом факультете БГУ (акт о практическом использовании результатов исследования в учебном процессе в 2016 г.).

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

### Статьи в рецензируемых научных изданиях:

1. **Пасалари, Х.М.** Устойчивость к глифосату трансгенного картофеля с геном *aroA* / **Х.М. Пасалари**, О.М. Третьякова, А.Н. Евтушенко // Труды БГУ. – Сер. биол. наук. – 2015. – Т. 10. – Ч. 1. – С. 122-126.
2. **Пасалари, Х.** Экспрессия генов защитного ответа в листьях трансгенного картофеля после обработки глифосатом / **Х. Пасалари**, А. Н. Евтушенко // Вестник БГУ. Сер. 2. – 2016. – № 1. – С. 31-36.
3. **Пасалари, Х.** Индукция генов защитного ответа в листьях картофеля при бактериальной инфекции и обработке глифосатом / **Х. Пасалари**, О.М. Третьякова, А.Н. Евтушенко // Научно-практический журнал «Земледелие и защита растений». Сер. 2. – 2016. – № 3 (106). – С. 37-39.

### Статьи в рецензируемых сборниках научных трудов:

4. **Пасалари, Х.** Получение трансгенного картофеля с геном *aroA* / **Х. Пасалари**, А.Н. Евтушенко // Овощеводство: сб. науч. тр. / Современное состояние и перспективы инновационного развития овощеводства: материалы Междунар. науч.-практ. конф., а.г. Самохваловичи, 2014 / НАН Беларуси, Ин-т овощеводства; редкол.: В.Ф. Карпович [и др.]. – Минск, 2014. - С. 186-190.
5. **Пасалари, Х.** Получение трансгенного картофеля с геном *aroA* / **Х. Пасалари**, А.Н. Евтушенко // Овощеводство: сб. науч. тр. / Современное состояние и перспективы инновационного развития овощеводства: материалы Междунар. науч.-практ. конф., пос. Самохваловичи, 2015 / НАН Беларуси, Ин-т овощеводства; редкол.: А.И. Чайковский [и др.]. – Минск, 2015. - С. 27-29.

### Статьи в материалах конференций и конгрессов, тезисы докладов:

6. **Пасалари, Х.** Трансгенный картофель, резистентный к глифосату / **Х. Пасалари**, А.Н. Евтушенко // Молодежь в науке: сб. тез. докл. Междунар. науч. конф., Минск, 18 – 21 ноября 2014 г. / НАН Беларуси; редкол.: И.А. Иванец [и др.]. – Минск, 2014. – С. 79.
7. **Пасалари, Х.** Comparisons between cisgenic/intragenic and transgenic plants as types of genetically engineered plants / **Х. Пасалари**, А.Н. Евтушенко // Трансгенные растения: технология создания, биологические свойства, применение, биобезопасность: сб. тез. V Всерос. Симпоз., Москва, 1-4 декабря 2014 г. / редкол.: В.В. Кузнецов [и др.]. – Москва, 2014. – С. 13-16.
8. **Пасалари, Х.** Получение трансгенного картофеля / **Х. Пасалари**, А.Н. Евтушенко // Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы: сб. тез. II Междунар. науч. конф., Минск, 13-16 октября 2015 г. /

Институт генетики цитологии НАН Беларуси; редкол.: А.В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2015 – С. 113.

9. **Пасалари, Х.** Вредоносность сорных растений и пути ее снижения в агроценозах полевых культур / **Х. Пасалари, А.Н. Евтушенков** // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. тез. IX Междунар. науч. конф., Минск, 7-11 сентября 2015 г. / Институт микробиологии НАН Беларуси; редкол.: Э.И. Коломиец [и др.]. – Минск, 2015 – С. 113-114.

10. **Пасалари, Х.** Агробактериальная трансформация картофеля / **Х. Пасалари, А.Н. Евтушенков** // Сб. тезисов VI Международной научно-практической конференции «Актуальные направления научных исследований: От теории к практике», 23 сентября 2015 г., Россия, г. Чебоксары; редкол.: А.И. Чайковский [и др.]. – Чебоксары, 2015. – С. 14-16.

11. **Пасалари, Х.М.** От гена *aroA*- к трансгенным растениям картофеля / **Х.М. Пасалари, А.Н. Евтушенков** // Молодежный научный форум: Естественные и медицинские науки: сб. тез. XXVI студент. Междунар. заочн. науч.-практ. конф., Москва, 13 сентября 2015 г. –Москва: Изд. «МЦНО» [Электронный ресурс]. – 2015. – № 7 (25). – С. 10-17. – Режим доступа. – URL: [[http://www.nauchforum.ru/archive/MNF\\_nature/7\(25\).pdf](http://www.nauchforum.ru/archive/MNF_nature/7(25).pdf)]. – Дата доступа: 10.12.2015.

12. **Пасалари, Х.М.** Экспрессия генов защитного ответа в листьях трансгенного картофеля с *aroA* геном / **Х.М. Пасалари, А.Н. Евтушенков** // Актуальные проблемы науки XXI века: сб. тез. VIII Междунар. мультидисциплинарной конф., Москва, 31 марта 2016 г. - Москва, 2016. – С. 12-17.



## РЭЗІЮМЭ

Пасалары Хасейн Махаммад

### Атрыманне трансгенных раслін бульбы, устойлівых да гліфасату і патагенау

**Ключавыя словы:** трансгенная бульба, *Agrobacterium tumefaciens*, гліфасат, узбуджальнікі захворванняў бульбы, ПЦР, ПЦР у рэальным часе, гены абароны, *aroA*.

**Мэта даследвання:** з'яўлялася атрыманне трансгенных раслін бульбы, устойлівых да гліфасату і патагенаў.

**Метады даследавання:** мікрабіялагічныя, генна-інжынерныя і біяхімічныя.

**Выкарыстаная апаратура:** спектрофатометар Cary 50 Bio, праграміруемы термастат GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, ЗША), ампліфікатар дэтэктыруючага дзеяння ДТ-96 (ДНК-Технологія, Расія) і інш.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна.** Упершыню ў Беларусі створаны трансгенныя расліны бульбы, устойлівыя да гліфасату. У аснову іх стварэння былі пакладзены тэхналогіі з выкарыстаннем арыгінальных плазмід. Упершыню ўсталяваны факт значнай актывацыі гліфасатам экспрэсіі *PR*-генаў трансгенных раслін, якія валодаюць устойлівасцю да гэтага гербіцыду, у той час як экспрэсія дадзеных генаў у нетрансгенных раслінах пры апрацоўцы гліфасатам павялічвалася нязначна. Аналагічны эфект у змене ступені экспрэсіі *PR*-генаў выяўляўся і ў выпадку заражэння трансгенных раслін, апрацаваных гербіцыдам, фітапатагеннымі бактэрыямі, прычым эфект быў больш яўны, чым пры бактэрыяльным заражэнні неапрацаваных гліфасатам лісцеў трансгеннай бульбы. Такім чынам, навуковая навізна дысертацыйнай працы заключаецца ў тым, што апрацоўка пасадак трансгеннай бульбы гліфасатам будзе прыводзіць не толькі да гібелі пустазелля, але і павышаць узровень устойлівасці раслін да патагенаў асабліва да бактэрыяльных патагенаў.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** Атрыманныя трансгенныя расліны бульбы з бактэрыяльным генам *aroA* могуць быць выкарыстаны ў навукова-даследчай працы ў якасці аб'ектаў для разшыфроўкі малекулярных механізмаў дзеяння гліфасату на імунітэт раслін. Увядзенне ў сельскагаспадарчае выкарыстанне генэтычна мадыфікаваных раслін бульбы, устойлівых к гліфасату і фітапатагенам, можа значна знізіць страты сельскагаспадарчай прадукцыі ад сарнякоў і хвароб раслін.

Вынікі даследванняў выкарыстоўваюцца пры чытанні спецкурса «Малекулярная біятэхналогія» для студэнтаў 3 і 4 курсаў спецыялізацыі «Малекулярная біялогія» на біялагічным факультэце БДУ (акт аб практычным выкарыстанні вынікаў даследавання ў навучальным працэсе ў 2016 г.).

**Галіна прымянення:** біятэхналогія раслін, сельская гаспадарка.

## РЕЗЮМЕ

Пасалари Хоссейн Мохаммад

### Получение трансгенных растений картофеля, устойчивых к глифосату и патогенам

**Ключевые слова:** трансгенный картофель, *Agrobacterium tumefaciens*, глифосат, возбудители заболеваний картофеля, ПЦР, ПЦР в реальном времени, гены защитного ответа, *aroA*.

**Цель исследования:** получение трансгенных растений картофеля, устойчивых к глифосату и патогенам.

**Методы исследования:** микробиологические, генно-инженерные и биохимические.

**Использованная аппаратура:** спектрофотометр Cary 50 Bio, программируемый термостат GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США), амплификатор детектирующего действия ДТ-96 (ДНК-Технология, Россия) и др.

**Полученные результаты и их новизна.** Впервые в Республике Беларусь созданы трансгенные растения картофеля, устойчивые к глифосату. В основу их создания были положены технологии с использованием оригинальных плазмид, полученных сотрудниками кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ. Впервые установлен факт значительной активации глифосатом экспрессии *PR*-генов полученных трансгенных растений, в то время как экспрессия данных генов в нетрансгенных растениях при обработке глифосатом увеличивалась незначительно. Повышение степени экспрессии *PR*-генов проявлялось и в случае заражения трансгенных растений фитопатогенными бактериями, причем эффект был намного более выражен в случае предварительной обработки листьев трансгенного картофеля глифосатом. Таким образом, впервые установлен факт значительной индукции генов защитного ответа трансгенного картофеля, устойчивого к глифосату, при обработке данным гербицидом, в том числе и при последующей бактериальной инфекции.

**Рекомендации по использованию:** Полученные трансгенные растения картофеля с бактериальным геном *aroA* могут быть использованы в научно-исследовательской работе в качестве объектов для расшифровки молекулярных механизмов действия глифосата на иммунитет растений. Введение в сельскохозяйственное использование генетически модифицированных растений картофеля, устойчивых к глифосату и фитопатогенам, может значительно снизить потери сельскохозяйственной продукции от сорняков и заболеваний растений.

Результаты исследований используются при чтении спецкурса «Молекулярная биотехнология» для студентов 3 и 4 курсов специализации «Молекулярная биология» на биологическом факультете БГУ (акт о практическом использовании результатов исследования в учебном процессе в 2016 г.).

**Область применения:** биотехнология растений, сельское хозяйство.

## SUMMARY

Pasalari Hossein Mohammad

### **Production of transgenic potato plants, resistant to glyphosate and pathogens**

**Keywords:** transgenic potato, *Agrobacterium tumefaciens*, glyphosate, pathogens of potato, PCR, RT-PCR, *PR*-genes, *aroA*.

**Objective:** to obtain transgenic potato plants resistant to glyphosate and pathogens.

**Methods:** microbiological, genetic engineering and biochemical.

**Used equipments:** spectrophotometer Cary 50 Bio, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA), DT-96 Real-time Detection Thermal Cycler (DNA Technology, Russia) and etc.

**Obtained results and their novelty.** For the first time in the Republic of Belarus established transgenic glyphosate resistant potato plants, based on application of original plasmids. It has been proved significant glyphosate *PR*-gene expression in transgenic plants, which have resistance to glyphosate, whereas the expression of these genes in non-transgenic plants treated with glyphosate does not increase significantly. A similar effect in changing the degree of *PR*-gene expression was shown, and in the case of contamination of transgenic plants treated with phytopathogenic bacteria type of herbicide, the effect was more pronounced than with bacterial infection of the untreated leaves of transgenic potato glyphosate. Thus, potato treatment with the aid of transgenic glyphosate not only results in destruction of weeds, but also improves the level of plant resistance to pathogens especially to bacterial pathogens.

**Recommendations for use:** The resulting transgenic potato plants with bacterial *aroA* gene can be used in scientific research as objects to decipher the molecular mechanisms of action of glyphosate on plant immunity. Introduction to the agricultural use of genetically modified potato plants resistant to glyphosate and pathogens, can significantly reduce the loss of agricultural production from weeds and plant diseases. The results of research are used in the reading of a special course "Molecular Biotechnology" for students 3 and 4 courses of specialization "Molecular Biology" at the biological faculty of Belarusian State University (report about the practical use of research results in the educational process in 2016).

**Application area:** plant biotechnology, agriculture.