

ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И цАМФ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO* СОРТА СКАРБ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСТОЙЧИВОСТИ К БАКТЕРИАЛЬНОМУ ВОЗБУДИТЕЛЮ КОЛЬЦЕВОЙ ГНИЛИ

Н.В. Филинова, Л.А. Ломоватская, А.С. Романенко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *Filinova@sifibr.irk.ru*

Аннотация: Изучали изменение уровней H_2O_2 и цАМФ в трансгенных растениях картофеля с повышенным содержанием пероксида водорода при заражении бактериальным возбудителем кольцевой гнили при высокой инфекционной нагрузке. Установлено, что растения картофеля с. Скарб проявили среднюю устойчивость к патогену кольцевой гнили, в то время как трансформированные растения показали отсутствие устойчивости. Предполагается, что изначально повышенный уровень H_2O_2 у трансгенных растений негативно влияет на развитие защитных реакций при инфицировании бактериальным патогеном.

Ключевые слова: H_2O_2 , цАМФ, *Solanum tuberosum*, системная устойчивость, бактериальный возбудитель

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-786-789

В настоящее время важнейшим направлением селекции картофеля является создание сортов, сочетающих высокий потенциал продуктивности и вкусовых качеств с устойчивостью к болезням и вредителям. В целях повышения защитных свойств и создания устойчивых форм растений эффективным подходом, в дополнение к традиционным методам селекции, является генетическая инженерия. На сегодняшний день трансгенные растения широко используются в качестве модельных систем для решения различных задач [Кочетов, Шумный, 2016].

В литературе показано [Wu et al., 1995], что увеличение концентрации пероксида водорода в растительных тканях приводит к повышению неспецифической устойчивости растений к разнообразным биотическим и абиотическим факторам, в том числе к бактериальным инфекциям. Искусственно такого эффекта можно добиться путем введения в геном растения гена глюкозооксидазы (*gox*) [Савчин и др., 2012]. Данный ген встречается в грибах, бактериях и дрожжах, но отсутствует в растительных организмах. Глюкозооксидаза окисляет глюкозу в тканях растений с образованием пероксида водорода, который является антипатогенным агентом. Однако пероксид является сигнальной молекулой, наряду с цАМФ, и активно участвует в регуляции фитоиммунитета [Креславский, 2012].

Известно, что в полевых условиях при избыточном увлажнении бактериальный возбудитель кольцевой гнили весьма активно поражает растения картофеля во многих районах, в том числе и Белоруси, создавая повышенный инфекционный фон.

Поэтому целью данной работы было выявить динамику изменения концентраций H_2O_2 и цАМФ в трансгенных растениях картофеля *in vitro* с изначально повышенным содержанием пероксида водорода при высокой инфекционной нагрузке возбудителем кольцевой гнили *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms).

В работе использовали растения картофеля *in vitro* (*Solanum tuberosum* L.) с. Скарб (СК 1) и 3 трансгенные линии данного сорта, полученные в ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Белоруси». Для их трансформации был использован нативный ген глюкозооксидазы *gox* (линия LP 17.2) из грибного штамма *Penicillium funiculosum* 46.1., а также модифицированный ген *gox-mod* (линия М 7.3) и растения

трансформированные вектором без целевого гена (линия РВ 14.10). Растения подращивали на агаризованной среде Мурасиге-Скуга при 14-часовом светопериоде, через две недели переносили на жидкую среду и заражали планктонной культурой *Cms* штамма 6889 с конечным титром 10^8 /мл. Начиная с дня заражения и через каждые 48 часов снимали морфометрические показатели: прирост и количество листьев, а также учитывали симптомы заболевания: точечные и обширные некрозы, хлорозы, повреждения корней. В первый и 10 день заражения определяли количество H_2O_2 и цАМФ в корнях и стеблях. Контролем служили неинокулированные растения.

Определение содержания перекиси водорода проводили с помощью метода описанного в [Попов и др., 2016]. Уровень цАМФ определяли методом иммуноферментного анализа [Lomovatskaya et al., 2011].

Проведенные исследования показали, что при заражении бактериальным возбудителем кольцевой гнили рост растений картофеля *in vitro* с. Скарб замедлялся, но не останавливался как в случае с трансгенными растениями (рис. 1 а, б).

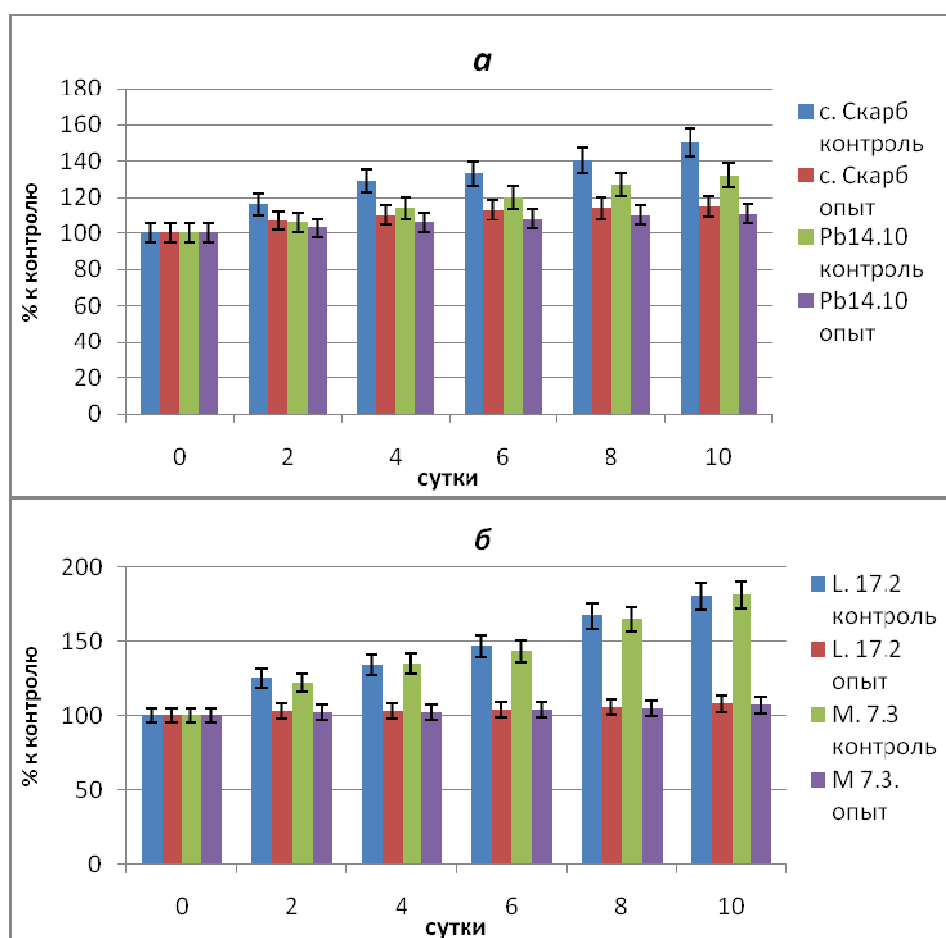


Рис. 1. Прирост растений картофеля *in vitro* при заражении *Cms*, % к контролю: а – растения с. Скарб и линии Pb 14.10 (трансформация «пустым вектором»), б – растения линий L 17.2 (ген *dox*) и M 7.3 (ген *dox-mod*).

Растения линий L 17.2 и M 7.3 практически останавливались в росте. Симптомы заболевания возникали на 5-6 день инокуляции в виде усыхания кончиков листьев, точечных некрозов и хлорозов.

Одну из причин такой реакции растений, вероятно, заключается в высокой инфекционной нагрузке, созданной в экспериментах. В литературе есть сведения о применении титров бактерий, значительно превышающих используемые, но при этом эксперименты проводились в вегетационных сосудах, т.е в «открытой системе». В

наших же опытах использовались растения, помещенные в пробирки, плотно закрытые пробками, т.е. была создана «замкнутая система», в которой инфекционная нагрузка на растение постоянно возрастала.

Измерение концентрации пероксида водорода показало, что в контроле изначальный уровень H_2O_2 у мутантов превышал таковой у растений с. Скарб. В первые сутки заражения происходило повышение уровня пероксида водорода в растениях с. Скарб и трансформированных «пустым вектором» как в корнях, так и в стеблях (рис. 2). В растениях линий L 17.2. и M 7.3 уровень H_2O_2 был значительно ниже контроля.

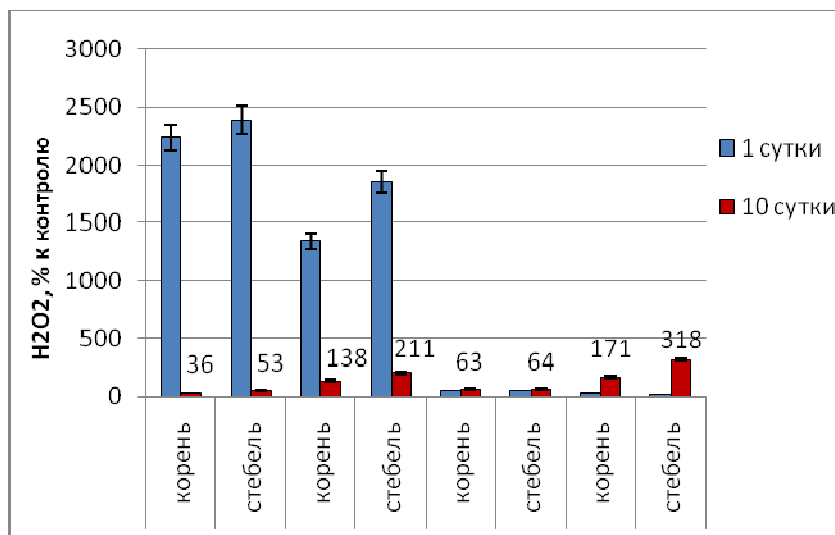


Рис. 2. Изменение концентрации H_2O_2 в растениях картофеля *in vitro* в первые и 10 сутки заражения бактериальным патогеном *Cms*.

На 10 сутки в корнях с. Скарб уровень H_2O_2 был значительно ниже контроля, у растений линии Pb 14.10 незначительно превышал контроль, а наибольшая концентрация пероксида водорода была обнаружена в стеблях линии M 7.3. (рис. 2).

В то же время наибольший уровень цАМФ наблюдался в корнях и стеблях нетрансформированных растений с. Скарб (рис. 3) как через сутки заражения, так и через 10 суток, что вероятно говорит об активации системного ответа растения на заражение. Из линий трансгенных растений только у растений Pb 14.10 было зафиксировано повышение концентрации цАМФ выше контроля, тогда как у мутантов этот показатель был ниже контрольного варианта (рис. 3).

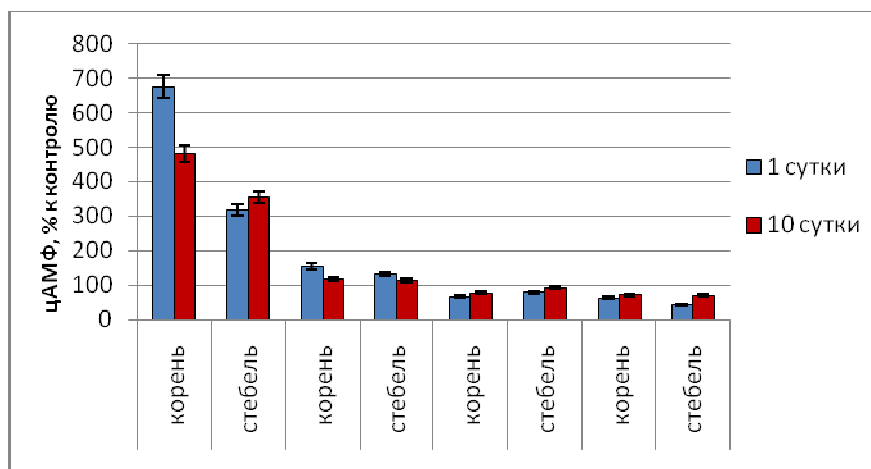


Рис. 3. Изменение концентрации цАМФ в растениях картофеля *in vitro* в первые и 10 сутки заражения бактериальным патогеном *Cms*.

Таким образом высокая инфекционная нагрузка бактериальным патогеном *Cms* ингибировала рост и вызывала обширные симптомы у трансгенных растений картофеля с исходно повышенным уровнем пероксида водорода. На этом фоне уровни рассматриваемых сигнальных молекул существенно снижались. В то же время у растений картофеля сорта Скарб и трансформированных вектором без целевого гена наблюдалась системное повышение уровня H_2O_2 и цАМФ, что сопровождалось незначительными симптомами. Поскольку H_2O_2 является сигнальной молекулой, то исходный повышенный уровень у трансформированных растений, вероятно, негативно влияет на развитие защитных реакций при инфицировании *Cms*.

Авторы благодарят О.Ю. Урбанович и К.З. Гамбурга за предоставленные трансгенные линии картофеля *in vitro*.

Литература

Кочетов А.В., Шумный В.К. Трансгенные растения как генетические модели для изучения функций генов растений // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Т. 20. – № 4. – С. 475–481.

Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов Вл.В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 2. – С. 163–178.

Попов В.Н., Антипина О.В., Астахова Н.В. Изменение ультраструктуры хлоропластов растений табака в процессе защиты от окислительного стресса при гипотермии // Физиология растений. – 2016. – Т. 63, № 3. – С. 319–326.

Савчин Д.В., Панюш А.С., Картель Н.А. Создание и анализ трансгенных растений картофеля и табака с геном *gox* *Penicillium funiculosum* // Известия НАН Беларуси. – 2012. – № 4. – С. 16–20.

Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V., Dudareva L.V. Determination of cAMP in plant cells by a modified enzyme immunoassay method // Plant Cell Rep. – 2011. – V. 30. – P. 125–132.

Wu G., Shortt B.J., Lawrence E.B., Levine E.B., Fitzsimmons K.C., Shah D.M. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H_2O_2 -generating glucose oxidase in transgenic potato plants // The Plant Cell. – V. 7. – P. 1357–1368.

CHANGE OF CONCENTRATION OF HYDROGEN PEROXIDE AND cAMP IN TRANSGENIC PLANTS *IN VITRO* GRADE SCARB DEPENDING ON RESISTANCE TO BACTERIAL RING ROT PATHOGEN

N.V. Filinova, L.A. Lomovatskaya, A.S. Romanenko

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *Filinova@sifibr.irk.ru*

Abstract: The changes in cAMP and H_2O_2 levels in transgenic potato plants with an increased content of hydrogen peroxide when infecting bacterial ring rot pathogen infectivity at a high load. It is established that potato plants grade Scarb showed moderate resistance to the pathogen of ring rot, while the transformed plants showed a lack of resistance. It is assumed that initially elevated levels of H_2O_2 in transgenic plants has a negative impact on the development of defense responses during infection by a bacterial pathogen.

Keywords: H_2O_2 , cAMP, *Solanum tuberosum*, systemic resistance, bacterial pathogen