

# ВЛИЯНИЕ КАРТОФЕЛЯ СОРТА «СКАРЬ», ТРАНСФОРМИРОВАННОГО ГЕНОМ *GOX* ИЗ *PENICILLIUM FUNICULOSUM*, НА РАЗМНОЖЕНИЕ НЕПАТОГЕННОЙ БЕСПЛАЗМИДНОЙ БАКТЕРИИ *ESHERICHIA COLI* И ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* И *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS*

К.З. Гамбург, В.А. Быбин, Г.Б. Боровский, Ю.А. Маркова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, [gamburg@sifibr.irk.ru](mailto:gamburg@sifibr.irk.ru)

**Аннотация.** Трансгенные растения картофеля с геном *GOX* ингибировали размножение клеток непатогенной бактерии (*Esheria coli*) и фитопатогенных бактерий (*Pectobacterium carotovorum* и *Clavibacter michiganensis*). Патогенные бактерии были способны использовать вещества растения – хозяина в качестве дополнительного источника питания, что ускоряло размножение их клеток, в отличие от непатогенной бактерии, а наличие гена *GOX* у трансгенов препятствовало этому. *C. michiganensis* не передвигалась из части стебля с корнями, погруженной в бактериальную суспензию, в ту часть стебля, которая с ней не контактировала.

**Ключевые слова:** картофель, глюкозооксидаза, ген *GOX*, бактерии, *Clavibacter michiganensis*, *Esheria coli*, *Pectobacterium carotovorum*

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-893-897

Первичной реакцией на воздействие патогенов на растения является резкий временный подъем содержания активных форм кислорода (в том числе и  $H_2O_2$ ), который используется как сигнал для включения защитных механизмов [Baker and Orlandi, 1995]. Однако способность растений противостоять патогенезу за счет собственного синтеза  $H_2O_2$  оказывается недостаточной. Увеличить интенсивность ее содержание можно за счет включения в геном растения генов синтеза  $H_2O_2$  от других организмов, обладающих интенсивной ее продукцией. Такими организмами являются некоторые грибы, у которых для этого существует фермент – глюкозооксидаза и соответствующий ген для ее синтеза (ген *GOX*) (<https://ru.wikipedia.org/wiki/>). Этот ген под контролем конститутивных промоторов (CaMV S35, figwort mosaic virus 35S), включенный в геном растений, заставлял их продуцировать  $H_2O_2$  в количествах, значительно превышающих собственные возможности растений [Wu et al., 1995, 1997; Савчин и др., 2012; Selvakumar et al., 2013]. Эти авторы показали, что трансформированные растения картофеля лучше противостояли грибным и бактериальным патогенам. Однако влияние трансформированных растений на сами бактерии и грибы пока изучено недостаточно.

Изучение взаимодействия бактерий и растений значительно удобнее проводить с использованием культуры *in vitro* [Orlikowska et al., 2017]. Поэтому мы провели изучение влияния культивируемых *in vitro* растений картофеля с геном *GOX* на бактерии.

Пробирочные растения были получены из клубней картофеля линии СК1, не подвергавшейся трансформации, линии РВ1, трансформированной пустым вектором и линий L17.2, M10.4, M7.3 и M8.3 с разной интенсивностью экспрессии гена *GOX*. Эти клубни были любезно предоставлены Институтом генетики и цитологии Академии Наук Беларуси. Получение трансгенных растений, их выращивание и размножение *in vitro* описаны в нашей предыдущей публикации [Grabelnych et al., 2017]. Изучалось влияние картофеля на бактерии *Esheria coli* (штамм XL1-Blue), *Pectobacterium carotovorum ssp. carotovorum* (штамм B1247) и *Clavibacter michiganensis* subsp.

*sepedonicus* (штамм Ас1405), полученные из ВКМ ИБФМ РАН, г. Пущино.

Для оценки влияния растений на бактерии в лунки 96-луночных полистирольных планшетов вносили по 150 мкл бактериальной суспензии и 1 отрезок стебля картофеля длиной 3-4 мм, которые инкубировали в темноте при 26 °С 24-48 ч. Измерения плотности бактериальных суспензий и активности глюкозооксидазы проводились с использованием планшетного фотометра и спектрофотометра при длинах волн 595 (600) или 630 нм. Оценка активности глюкозооксидазы проводилась путем внесения в пенициллиновый флакон 4 мл бидистиллированной воды, 1 листа и 1 мл реактива, содержащего 50 мМ йодида калия, 1% крахмала, 200 мМ D-глюкозы и растительных объектов. В результате окисления глюкозы глюкозооксидазой образуется пероксид водорода, который окисляет йодид калия, что приводит к окрашиванию крахмала в синий цвет. Флаконы выдерживали на качалке при 23 °С 2 ч, после чего измеряли интенсивность окрашивания при 600 нм на спектрофотометре. Каждая линия использовалась в количестве 10-12 пробирочных растений. В таблицах приведены средние арифметические значения и стандартные отклонения. Опыты были проведены 2-3 раза.

**Таблица 1.**

**Активность *GOX* в листьях растений перед началом опыта ( $E_{600} \times 1000$ )**

	СК1	PBI	L17.2	M10.4	M8.3	M7.3	Среда*
	226±69	247±24	640±638	980±646	1692±944	2180±586	221±39
-среда	5	26	419	759	1471	1959	0
min – max	175-249	203-283	222-2486	251-2603	335-2295	853-2695	158-273

\*среднее±стандартное отклонение

Данные табл. 1 показывают, что линии СК1 и PBI не обладали активностью *GOX*, а трансгенные линии имели эту активность. При этом линии M7.3 и M8.3 проявляли наибольшую активность. Следует отметить, что индивидуальные растения каждой линии значительно различались по способности окрашивать крахмал.

В таблице 2 видно, что линии, не имеющие гена глюкозооксидазы (СК1 и PBI), не угнетали размножение клеток бактерии *E. coli* по сравнению с контролем, что согласуется с данными по отсутствию у них активности глюкозооксидазы (табл. 1), тогда как линии, способные к образованию  $H_2O_2$ , угнетали.

**Таблица 2.**

**Влияние отрезков стебля трансгенного картофеля на рост бактериальной суспензии *E. coli*. Поглощение при 660 нм  $\times 1000$**

	СК1	PBI	L17.2	M7.3	M8.3	M10.4	Контроль
$E_{600}$	335±25	282±14	183±53	133±42	73±27	49±24	298±20
%	112	95	62	44	25	17	100

Использованный штамм *E. coli* не патогенен для картофеля. Поэтому следующий опыт был проведен с фитопатогенной бактерией *P. carotovorum*.

**Таблица 3.**

**Влияние отрезков стебля трансгенного картофеля на рост бактериальной суспензии *P. carotovorum*. Поглощение при 660 нм  $\times 1000$**

	СК1	PBI	L17.2	M7.3	M8.3	Контроль
$E_{600}$	621±92	588±50	543±70	383±50	458±83	414±14
%	150	142	131	92	113	100

Установлено (табл. 3), что контрольные линии (СК и РВ), не имеющие ген глюкозооксидазы, и линия L17.2 со слабой ее активностью оказывали стимулирующее влияние на размножение этого патогена, вероятно, за счет выделения из отрезков стебля картофеля питательных компонентов. У линий М7.3 и М8.3 с наиболее активной глюкозооксидазой такая стимуляция отсутствовала.

Далее, были проведены опыты с другой фитопатогенной бактерией – *C. michiganensis*, которая вызывает кольцевую гниль клубней картофеля и является карантинным патогеном для Иркутской области. Данные табл. 4 показывают, что линии СК1 и РВ1 оказывали стимулирующее действие на размножение этой бактерии, а линии с включенным в геном *GOX* устраняли эту стимуляцию.

**Таблица 4.**

**Влияние отрезков стеблей картофеля разных трансгенных линий на размножение *C. michiganensis***

	СК1	РВ1	L17.2	М7.3	М8.3	М10.4	Контроль
$E_{600}$	500±70	439±72	468±82	546±76	480±82	338±66	374±17
%	134	117	125	100	94	90	100

Данные табл. 4 показывают, что линии СК1 и РВ1 оказывали стимулирующее действие на размножение этой бактерии, а линии с включенным в геном *GOX* устраняли эту стимуляцию.

Испытание антибактериальной активности трансгенов в 96-луночном планшете происходило на средах, благоприятных для роста бактерий в присутствии 3% глюкозы. Но среда МПА неблагоприятна для растительных объектов, а глюкоза неблагоприятна для роста трансгенных растений (наши не опубликованные данные). Поэтому в пенициллиновые флаконы вносили 5 мл среды для роста картофеля и верхушки пробирочных растений картофеля длиной около 7 см. 12 флаконов с растениями одной линии помещали в стерильный поликарбонатный контейнер (Sigma-Aldrich) и культивировали при освещении 16 ч/сут и 23 °С. Через 13 дней в каждый флакон вносили по 20 мкл бактериальной суспензии и еще через 7 дней отбирали по 150 мкл среды и вносили в лунки планшета.

Через 7 дней после внесения бактерии в пенициллиновые флаконы пробы по 8.5 мкл из суспензий в пенициллиновых флаконах наносились в чашки Петри на поверхность агаровой среды для размножения бактерий и инкубировались в темноте при 26 °С 1 сут и затем фотографировались. Наиболее активно шло размножение в пробах, взятых от линий СК1 и РВ1, у которых активность *GOX* отсутствовала (табл. 6). Можно видеть, что наибольшее увеличение содержания наблюдалось во флаконах с растениями линий СК1 и РВ1. В флаконах с растениями, содержащими ген *GOX*, содержание бактерий было меньше, особенно у линии М8.3 с наиболее интенсивной экспрессией этого гена. Таким образом, подавление размножения бактерии может происходить и в среде для культивирования картофеля *in vitro*, не содержащей глюкозу.

**Таблица 5.**

**Содержание бактерии *C. michiganensis* в жидкой среде по окончании совместного культивирования *in vitro* с растениями картофеля. (Растения удалены, объем суспензии доведен до 7 мл, поглощение измерено при 630 нм в кювете толщиной 3 мм)**

	$E_{630} \times 1000$				
	СК1	РВ1	L17.2	М10.4	М8.3
Среднее	4599±2223	3772±1454	2794±2053	1158±871	519±404
min - max	1664-8764	1830-7678	515-6700	267-2963	116-1204

Figure 1 displays the intensity of contamination of the soil across various sampling points. The data is presented in two rows of plots, each with a 2x10 grid of colored squares. The top row includes sampling points CK1, L17.2, and M10.4. The bottom row includes PBI, M83, and M10.4. A legend at the bottom indicates the intensity scale: 1 (yellow), 2 (light orange), 3 (orange), 4 (dark orange), 5 (red), and 6 (dark red).

Sampling Point	Row 1 (Top)	Row 2 (Bottom)
CK1	1, 1, 1, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5	1, 1, 1, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5
L17.2	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1
M10.4	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1
PBI	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1
M83	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1
M10.4	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1

Intensity of contamination: 1 – no, 2 – very weak, 3 – weak, 4 – moderate, 5 – strong, 6 – very strong

В представленной работе отчетливо показано, что трансгенные растения, благодаря присутствию у них гена *GOX*, способны ингибировать размножение непатогенной бактерии (*E. coli*) и фитопатогенных бактерий (*P. carotovorum* и *C. michiganensis*).

Работа была поддержана проектом РФФИ № 16-54-00070. Работа выполнена с использованием ЦКП «Биоресурсный Центр» СИФИБР СО РАН и приборов ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.

Grabelnykh O.I., Borovik O.A., Lyubushkina I.V., Gamburg K.Z., Fedyaeva A.V., Fedoseeva I.V., Stepanov A.V., Rikhvanov E.G., Sauchyn D.V., Urbanovich O.Yu., Borovskii G.B. Biological effects of potato plant transformation with glucose oxidase gene and their resistance to hyperthermia // Journal of Stress Physiology and Biochemistry. – 2017. – V. 13, No. 1. – P. 5–14.

Orlikowska T., Nowak K., Reed B. Bacteria in the plant tissue culture environment // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2017. – V. 128. – P. 487–508.

Selvakumar P., Arvinth S., Maruthasalam S., Chin H.L. Disease resistance conferred by constitutive expression of a fungal glucose oxidase gene in transgenic tobacco plants // Asian J. of Plant Science. 2013. – V. 12, No 3. – P. 128–136.

Wu G., Shortt B.J., Lawrence E.B., Elaine E.B., Fitzsimmons K.C., Shah DM. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxidase in transgenic potato plants // Plant Cell. – 1995. – V. 7. – P. 1357–1368.

Wu G., Shortt B.J., Lawrence E.B., Leon J., Fitzsimmons K.C., Levine E.B., Raskin I., Shah D.M. Activation of host defense mechanisms by elevated production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic plants // Plant Physiol. – 1997. – V. 115. – P. 427–435.

**EFFECTS OF POTATO (SKARB VARIETY) TRANSFORMED WITH *GOX* GENE FROM *PENICILLIUM FISTULOSUM* ON THE GROWTH OF NONPATHOGENIC *ESHERICHIA COLI* AND PHYTOPATHOGENIC *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* AND *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* BACTERIA**

K.Z. Gamburg, V.A. Bybin, G.B. Borovskii, Yu.A. Markova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, [gamburg@sifibr.irk.ru](mailto:gamburg@sifibr.irk.ru)

**Abstract.** Transgenic potato plants with *GOX* gene inhibited cell propagation of the nonpathogenic *E. coli* and phytopathogenic *P. carotovorum* and *C. michiganensis* bacteria. Propagation of pathogenic bacteria was stimulated with some substances of the host plants, but the presence of *GOX* gene decreased this effect. *C. michiganensis* did not move from lower rooted stem part immersed in bacterium suspension into the upper part which did not contacted with it.

**Keywords:** potato; glucosooxidase; *GOX* gene, bacteria; *Clavibacter michiganensis*, *Esherichia coli*, *Pectobacterium carotovorum*