

## ВЛИЯНИЕ ВКЛЮЧЕНИЯ ГЕНА *GOX* ИЗ *PENICILLIUM FUNICULOSUM* В ГЕНОМ КАРТОФЕЛЯ СОРТА СКАРБ НА ЕГО УСТОЙЧИВОСТЬ К ДЛИТЕЛЬНОМУ ОХЛАЖДЕНИЮ

К.З. Гамбург<sup>1</sup>, О.И. Грабельных<sup>1,2</sup>, О.А. Боровик<sup>1</sup>, Г. Б. Боровский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия

**Аннотация.** Представленная работа содержит данные по влиянию включения гена глюкозооксидазы (*gox*) в геном картофеля на его устойчивость к длительному (10 дней) охлаждению. Эта генетическая трансформация приводила к значительному увеличению устойчивости, зависящему от интенсивности экспрессии гена *gox*. Активность глюкозооксидазы существенно не изменялась после 10 дней воздействия при 1 °С. У трансгенных линий отмечали увеличение содержания сахаров после охлаждения. Содержание отдельных дегидринов в трансгенных линиях было выше.

**Ключевые слова:** картофель, глюкозооксидаза, устойчивость к холоду

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-898-902

Картофель считается холодостойкой культурой в том смысле, что низкие положительные температуры не приводят к его гибели, в отличие от других пасленовых (томат, баклажан, перец). Однако и картофель страдает от них, что приводит к снижению его продуктивности. Поэтому повышение его холодостойкости является важной селекционной и агротехнической задачей. В настоящее время для решения этой задачи привлекаются биотехнологические методы, в том числе и генетическая инженерия. В некоторых работах [Park et al., 2004] показано, что при обработке растений  $H_2O_2$  изменялась их устойчивость к различным абиотическим факторам. Поэтому можно было предположить, что увеличение способности растений продуцировать  $H_2O_2$  может изменить устойчивость растений (в том числе и картофеля) к биотическим и абиотическим факторам. Известно, что некоторые грибы активно продуцируют  $H_2O_2$  с помощью фермента глюкозооксидазы (GOX), которая окисляет глюкозу с образованием  $H_2O_2$ . Поэтому ген *gox* был использован коллегами из Института генетики и цитологии Академии наук Республики Беларусь для получения трансгенного картофеля [Савчин и др., 2012]. Клубни картофеля сорта Скарб, трансформированные геном *gox* из *Penicillium funiculosum*, были любезно предоставлены нам для работы по совместному проекту. Ранее мы показали, что трансгенный картофель с геном *gox* имеет пониженную устойчивость к высокой температуре [Grabelnych et al., 2017]. Представляло интерес выяснить, отличаются ли эти трансгены по устойчивости к низкой температуре. Maruthasalam et al. [2010] показали, что трансгенный табак с геном глюкозооксидазы был более устойчив к низкой температуре.

**Материалы и методы.** Получение трансгенных растений, их выращивание и размножение *in vitro* описаны в нашей предыдущей публикации [Grabelnych et al., 2017]. В опытах использовались нетрансформированные растения сорта Скарб (СК), растения, трансформированные пустым вектором на основе плазмиды pBI121 (PBI) и 3 трансгенных линии с разной интенсивностью экспрессии целевого гена (L17.2, M7.3, M8.3) [Grabelnych et al., 2017]. Пробирочные растения помещали на 10 суток в темновой термостат с температурой  $1 \pm 0.5$  °С. Затем пробирки переносились в световую

комнату с температурой 23 °C и освещением люминесцентными лампами 16 часов в сутки с интенсивностью 25  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Через 4-5 дней определялись следующие параметры: 1) отмирание стебля (% омертвевшей части стебля), 2) отмирание листьев (% мертвых листьев от общего их числа и % поврежденных листьев, у которых часть листа оставалась зеленой). Для определения суммарного повреждающего эффекта рассчитывался общий индекс повреждения каждого растения путем сложения повреждающих эффектов на стебли и листья, выраженных в %.

Активность глюкозооксидазы измеряли по способности растений генерировать  $\text{H}_2\text{O}_2$  в присутствии глюкозы [Sauchyn et al., 2012], используя модифицированный нами метод количественного определения активности GOX в жидкой среде. Для этого листья картофеля гомогенизировали в 0.1 М Трис-HCl буфере (pH 7.0) в соотношении 1 : 30, центрифугировали при 12 тыс. об./мин в течение 5 мин и добавляли супернатант в раствор, содержащий 25 mM KJ, 0,5% крахмала и 100 mM D-глюкозы. В результате окисления глюкозы глюкозооксидазой образуется  $\text{H}_2\text{O}_2$ , который окисляет KJ, в результате йодкрахмальной реакции происходило окрашивание среды в синий цвет, плотность которой измеряли на спектрофотометре при длине волны 595 нм. Активность GOX выражали в отн. ед./мг белка. Содержание белка определяли по методу Бредфорд. Количественное содержание сахаров определяли с антроновым реактивом [Дише, 1967], концентрацию водорастворимых углеводов рассчитывали в % на суховоздушный вес. Для детекции дегидринов проводили денатурирующий электрофорез (в 12,5% ПААГе) тотального белка из тканей побегов картофеля с последующим вестерн-блоттингом с поликлональными антителами против дегидринов (ADI-PLA-100, «Enzo Life Sciences», США). Опыты были проведены более трех раз. По данным определения биологических эффектов у каждого из 10 растений рассчитывалось среднее арифметическое значение, стандартное отклонение.

**Результаты.** В таблице 1 показано, что варианты СК и РВ1, не имеющие гена *gox*, и L17.2 со слабой его экспрессией сильнее повреждались холодом, чем линии М8.3 и М7.3 с более высокой экспрессией.

**Таблица 1.**

**Индексы повреждения пробирочных растений картофеля сорта Скарб и его трансгенных линий, вызванных их выдерживанием при  $1\pm 0.5^\circ \text{C}$ , %**

Дата опыта	СК	РВ1	L17.2	М8.3	М7.3
28.02.17	88 $\pm$ 63	71 $\pm$ 57	95 $\pm$ 45	62 $\pm$ 27	40 $\pm$ 26
26.06.17	47 $\pm$ 31	67 $\pm$ 47	59 $\pm$ 35	34 $\pm$ 41	32 $\pm$ 41
05.09.17	69 $\pm$ 59	66 $\pm$ 32	47 $\pm$ 44	49 $\pm$ 30	43 $\pm$ 25
21.08.17	111 $\pm$ 43	68 $\pm$ 30	46 $\pm$ 32	14 $\pm$ 18	6 $\pm$ 11
28.08.17	143 $\pm$ 73	97 $\pm$ 49	38 $\pm$ 47	25 $\pm$ 29	7 $\pm$ 27
11.10.17	102 $\pm$ 29	-	36 $\pm$ 25	29 $\pm$ 23	-
16.10.17	153 $\pm$ 28	-	86 $\pm$ 68	51 $\pm$ 52	-
<b>Среднее <math>\pm</math> SD</b>	<b>81<math>\pm</math>70</b>	<b>60<math>\pm</math>59</b>	<b>85<math>\pm</math>54</b>	<b>33<math>\pm</math>32</b>	<b>11<math>\pm</math>16</b>

Индекс=% мертвой части стебля+% мертвых листьев+(% поврежденных листьев) : 2.

Внешнее впечатление о характере повреждений, вызванных холодом, дает рисунок. Можно видеть, что у СК все растения имеют отчетливые повреждения, у М7.3 все растения не повреждены, у М8.3 из 13 растений 2 повреждены.

При просмотре растений через 10 дней было выявлено, что растения с неповрежденной верхушкой стебля были способны к возобновлению роста (табл. 2). При этом % таких растений у линий без гена *gox* и линии со слабой экспрессией был меньше, чем у линии с высокой экспрессией.

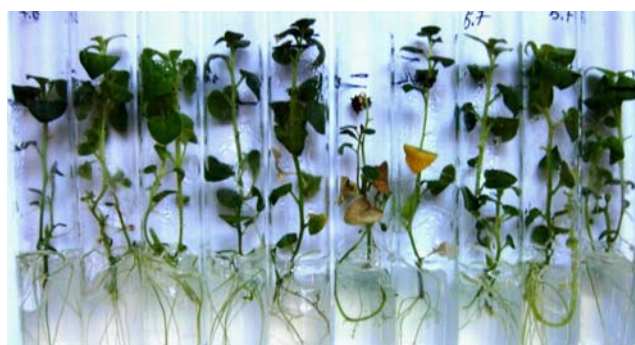
Таким образом, полученные данные позволяют полагать, что введение в геном картофеля сорта Скарб гена *gox* существенно увеличивает его устойчивость к длительному холоду. Это увеличение зависит от интенсивности экспрессии этого гена. По-видимому, постоянное присутствие повышенного содержания  $H_2O_2$  в трансгенных линиях вызывает какие-то изменения в клетках, позволяющие им более эффективно противостоять неблагоприятному воздействию длительного охлаждения. Мы попытались обнаружить некоторые из них (активность глюкозооксидазы, содержание сахаров и дегидринов).



**СК**



**М7.3**



**М8.3**

**Рисунок. Общий вид растений через 12 (с 16.08 по 28.08.17) дней после прекращения воздействия температуры 1° (с 05.08.17 по 16.08.17).**

При анализе линий, трансформированных геном *gox*, на активность глюкозооксидазы выявлены четкие различия между линиями L17.2 и М8.3, при этом у линии М8.3 с более высокой экспрессией гена *gox* обнаружена наиболее высокая активность GOX (табл. 3). Охлаждение сопровождалось некоторым увеличением

активности GOX как у линии L17.2, так и у линии M8.3, что может быть следствием повышенного содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при холодовом стрессе. Следует отметить, что ни в одном из опытов не обнаруживалось наличия активности GOX в вариантах СК и PBI.

**Таблица 2.**

**Способность растений к возобновлению роста после окончания холодового воздействия**

	СК	PBI	L17.2	M8.3
% живых растений	40	44	50	82
% растений с приростом	20	22	33	64
Прирост за 12 дней, мм на 1 растение	1.5	6.6	4.3	12.8

По содержанию сахаров изученные линии различались, так, в варианте СК, не имеющего гена *gox*, содержание сахаров в контрольных условиях было самым высоким и снижалось после охлаждения, в то время как у линий L17.2 и M8.3, наоборот, охлаждение сопровождалось увеличением содержания сахаров (табл. 3). Также нами выявлены изменения в содержании отдельных дегидринов, свидетельствующие о более высокой устойчивости трансформантов к холоду (не показано).

**Таблица 3.**

**Активность глюкозооксидазы и содержание сахаров в растениях картофеля до и после охлаждения**

Линии	Активность глюкозооксидазы*		Содержание сахаров**	
	До охлаждения	После охлаждения	До охлаждения	После охлаждения
СК	0	0	2.55 ± 0.44	1.62 ± 0.23
PBI	0	0	1.37 ± 0.56	2.69 ± 1.26
L17.2 21-28.08.17	0.66 ± 0.18	-	-	-
L17.2 08-21.12.17	0.74 ± 0.50	0.92 ± 0.39	0.70 ± 0.33	2.18 ± 0.45
M8.3 21-28.08.17	1.76 ± 0.47	-	-	-
M8.3 28-21.12.17	2.23 ± 0.42	2.88 ± 1.29	1.20 ± 0.71	2.09 ± 0.29

\*отн. ед./мг белка, \*\*% на воздушно сухой вес.  $M \pm SD$ ,  $n=6-12$

На основании полученных данных можно заключить, что введение гена *gox* в геном картофеля приводит к повышению устойчивости растений к низкой температуре, которое сопровождается некоторыми изменениями клеточного метаболизма.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №16-54-00070, с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН (г. Иркутск).*

#### Литература

Дише З. Общие цветные реакции углеводов // Методы химии углеводов. – М: Мир, 1967. – С. 21–24.

Савчин Д.В., Панюш А.С., Картель Н.А. Создание и анализ трансгенных растений картофеля и табака с геном *GOX Penicillium funiculosum* // Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. Серыя Біялагічных Навук. – 2012. – № 4. – С. 16–19.

Grabelnych 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.

Maruthasalam S., Liu Y.L., Sun C.M., Chen P.Y., Yu C.W., Lee P.F., Lin C.H. Constitutive expression of a fungal glucose oxidase gene in transgenic tobacco confers chilling tolerance through the activation of antioxidative defense system // Plant Cell Rep. – 2010. – V. 29. – P. 1035–1048.

Park E.-J., Jeknic' Z., Sakamoto A., DeNoma J., Yuwansiri R., Murata N., Chen T.H.H. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage // The Plant Journal. – 2004. – V. 40. – P. 474–487.

### **EFFECT OF THE INSERTION OF *GOX* GENE FROM *PENICILLIUM FUNICULOSUM* INTO THE GENOME OF POTATO (SCARB VARIETY) ON ITS RESISTANCE TO PROLONGED COLD**

K.Z. Gamburg<sup>1</sup>, O.I. Grabelnych<sup>1, 2</sup>, O.A. Borovik<sup>1</sup>, G.B. Borovskii<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, [gamburg@sifibr.irk.ru](mailto:gamburg@sifibr.irk.ru)

<sup>2</sup>Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

**Abstract.** Presented work contains data on the influence of glucose oxidase gene inserted into the potato genome on its resistance to prolonged (10 days) cold treatment. This genetic transformation led to the significant increase of the resistance depending from the intensity of gene expression. Glucose oxidase activity did not change significantly after 10 days at 1 °C and the content of sugars was increased in transgenic lines. The contents of some dehydrins before cold treatment were higher in transgenic lines.

**Keywords:** *potato, glucose oxidase, cold resistance*