

Научная статья
УДК 581.192.2:581.522.4
EDN: MVUYR
DOI: 10.21285/achb.975



Влияние *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* на уровень эндогенного пероксида водорода и активность пероксидазы в трансгенных растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L.), экспрессирующих ген *gox*

Н.В. Филинова, А.А. Ищенко, Т.В. Копытина✉, Л.Е. Макарова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Российская Федерация

Аннотация. Возрастание уровня пероксида водорода (H_2O_2) в растительных тканях способствует повышению устойчивости к разнообразным биотическим и абиотическим стрессорам. Одним из основных ферментов, участвующих в регуляции уровня H_2O_2 у растений, является пероксидаза. Цель данной работы заключалась в исследовании уровня эндогенного H_2O_2 , активности пероксидазы и ее изоферментного спектра в корнях картофеля *in vitro* сорта Скарб и его трансгенных линий, экспрессирующих ген глюкозооксидазы (*gox*) из *Penicillium funiculosum* в нормальных условиях и при взаимодействии с фитопатогеном *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Показано, что уровень H_2O_2 трансгенных линий, несущих модифицированный ген *gox*, был существенно выше в сравнении с исходным сортом и еще более возрастал при воздействии фитопатогена. В нормальных условиях роста выявлены различия в спектре изоформ пероксидазы в трансгенных линиях и исходном сорте Скарб. При контакте с фитопатогеном существенно изменялся спектр изоформ в исходном сорте Скарб и в трансгенных линиях в сравнении с сортом Скарб. Полученные данные доказывают, что продукт экспрессии гена *gox* формирует высокий уровень H_2O_2 в результате окисления глюкозы. Высокий уровень H_2O_2 в трансгенных линиях, вероятно, инактивирует пероксидазу. Показано, что заражение растений фитопатогеном *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* приводит к увеличению активности пероксидазы и изменению изоферментного состава как в контроле, так и в трансгенных линиях.

Ключевые слова: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, трансгенные растения картофеля, глюкозооксидаза, пероксид водорода, пероксидаза, изоферментный спектр

Благодарности. Авторы выражают благодарность докторам биологических наук Д.В. Савчину, О.Ю. Урбанович (Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь), а также доктору биологических наук Г.Б. Боровскому (Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия) за предоставленные трансгенные растения.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (рег. № НИОКТР-125021902466-4).

Для цитирования: Филинова Н.В., Ищенко А.А., Копытина Т.В., Макарова Л.Е. Влияние *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* на уровень эндогенного пероксида водорода и активность пероксидазы в трансгенных растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L.), экспрессирующих ген *gox* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. DOI: 10.21285/achb.975. EDN: MVUYR.

Effect of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* on endogenous hydrogen peroxide levels and peroxidase activity in transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.) expressing the *gox* gene

Nadezhda V. Filinova, Aleksei A. Ishchenko,
Tatyana V. Kopytina[✉], Liudmila E. Makarova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. Higher levels of hydrogen peroxide (H_2O_2) in plant tissues improve resistance to a variety of biotic and abiotic stressors. One of the key enzymes involved in the regulation of H_2O_2 levels in plants is peroxidase. The present study was aimed at analyzing the level of endogenous H_2O_2 , peroxidase activity, and its isoenzyme spectrum in the roots of *in vitro* Skarb cultivar and its transgenic lines expressing the *Penicillium funiculosum* glucose oxidase (*gox*) gene under normal conditions and with exposure to the phytopathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. The H_2O_2 level of transgenic lines carrying the modified *gox* gene was shown to be significantly higher compared to the original cultivar and to increase further due to exposure to the phytopathogen. Under normal growth conditions, differences were observed in the spectrum of peroxidase isoforms in the transgenic lines and the original Skarb cultivar. Upon exposure to the phytopathogen, the spectrum of isoforms was significantly altered in the original Skarb cultivar and in the transgenic lines compared with the Skarb cultivar. The obtained data prove that the product of *gox* gene expression causes a high H_2O_2 level due to glucose oxidation. High H_2O_2 levels in transgenic lines presumably inactivate peroxidase. Exposure to the phytopathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* is shown to increase peroxidase activity and change the isoenzyme composition in both control and transgenic lines.

Keywords: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, transgenic potato plants, glucose oxidase, hydrogen peroxide, peroxidase, isoenzyme spectrum

Acknowledgements. The authors are grateful to Dr. Sci. D.V. Savchin, Dr. Sci. O.Yu. Urbanovich (Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus) and to Dr. Sci. G.B. Borovski (Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia) for the provided transgenic plants.

Funding. The study was carried out within the framework of the state assignment of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (project no. 125021902466-4).

For citation: Filinova N.V., Ishchenko A.A., Kopytina T.V., Makarova L.E. Effect of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* on endogenous hydrogen peroxide levels and peroxidase activity in transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.) expressing the *gox* gene. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2025;15(2). (In Russian). DOI: 10.21285/achb.975. EDN: MVUYR.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных прикладных направлений физиологии растений является получение культурных растений, устойчивых к неблагоприятным условиям среды и фитопатогенам. Наряду с традиционными методами, широко используются генно-инженерные подходы, с помощью которых ученые наделяют растения новыми полезными признаками, коих невозможно добиться путем селекционных методов. Кроме того, трансгенные растения можно использовать в качестве модельных систем для решения различных фундаментальных задач. Одной из таких задач является повышение защитных свойств растений путем привнесения генов, кодирующих

белки, способные проявлять защитные функции. Примером подобных растений могут служить используемые в данной работе растения картофеля, экспрессирующие ген *gox* из грибов *Penicillium funiculosum* [1].

Ген *gox* кодирует фермент глюкозооксидазу (β -D-глюкоза: O_2 -1-оксидоредуктаза, КФ 1.1.3.4), которая катализирует реакцию окисления β -D-глюкозы до β -D-глюконо- δ -лактона и сопряженное восстановление O_2 до H_2O_2 . По мнению авторов генетических конструкций, наличие лидерной последовательности секретиции в апопласт позволяет белку секретироваться в апопласт и способствовать накоплению H_2O_2 именно в этом компартменте [1, 2].

Известно, что высокий уровень H_2O_2 в растительных тканях способствует повышению устойчивости к разнообразным биотическим [3] и абиотическим стрессорам [4]. Одним из основных ферментов, участвующих в регуляции уровня H_2O_2 у растений, является пероксидаза. В зависимости от вида стресса изменяется ее изоферментный спектр [5, 6].

Активность пероксидазы коррелирует с устойчивостью сортов сельскохозяйственных растений (активность пероксидазы в клетках сортов, устойчивых к патогенам, в два и более раза выше, чем в восприимчивых), а разнообразие ее изоферментного состава расширяет границы функционирования (активность в широком диапазоне pH от 3 до 14), что является приспособительным механизмом. В проведенных ранее исследованиях на нетрансгенных сортах картофеля *in vitro* показано влияние заражения *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) на изоферментный состав слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы. Было установлено, что инфицирование растений патогеном приводит к быстрой активации пероксидазы, к появлению новых изоформ и исчезновению некоторых других изоформ фермента [6].

Ввиду всего вышесказанного настоящая работа посвящена изучению связи между уровнем H_2O_2 , активностью пероксидазы и спектра ее изоформ в растениях картофеля *in vitro*, трансформированных геном *gox*, в обычных условиях роста и при заражении Cms. Поскольку при заражении растений первоначально с фитопатогеном контактируют именно корни, а не стебли и листья, на данном этапе исследований интерес представляла оценка изучаемых параметров именно в корнях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Скарб белорусской селекции и три трансгенные линии данного сорта, полученные в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси (г. Минск, Республика Беларусь): линия L 17.2 – растения, трансформированные нативным геном глюкозооксидазы *gox* из *Penicillium funiculosum*, линия M 7.3 – растения, трансформированные модифицированным геном *gox-mod*, и линия Pb 14.10 – растения, трансформированные вектором без целевого гена.

Растения культивировали *in vitro* в течение 7 сут. на твердой питательной среде Мурасиге – Скуга (Sigma, США) с добавлением 20 г/л сахарозы (АО «ЛенРеактив», Россия) и 5 г/л агар-агара (ООО «Биотехинновация», Россия) (pH 5,8–6,0) до образования первых корней. Затем переносили на жидкую питательную среду, где их культивировали до инокуляции в течение 4 сут. Рост растений проходил в факторостатных условиях при температуре 21 °C и 16-часовом фотопериоде.

Бактериальный патоген, вызывающий кольцевую гниль картофеля (Cms, штамм 6889 (вирулентный, мукоидный)), выращивали на жидкой среде, содержащей 10 г/л дрожжевого экстракта (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия), 15 г/л глюкозы (АО «ЛенРеактив», Россия) (pH 7,0) в течение 3 сут. Титр бактерий определяли при 655 нм на планшетном спектрофотометре Immunochem-2100 (High Technology Inc., США).

Растения, помещенные на жидкую питательную среду, заражали планктонной культурой бактерий в стерильных условиях через пластиковую трубочку, чтобы бактерии попали исключительно в среду роста, а не на листья растений. При инфицировании конечный титр составлял 2×10^7 клеток/мл. Совместное культивирование проводили в вышеописанных условиях в течение 24 ч. Для исследований использовали корни незараженных растений картофеля, взятых в нулевой точке перед инфицированием (исходные растения), через 24 ч и 10 сут. от начала взаимодействия с патогеном.

Для выделения «растворимых» пероксидаз навеску растительного образца растирали с 0,1 М натрий-фосфатным буфером (pH 7,0) с добавлением 10 мМ фенилметилсульфонилфторида (Sigma, США) на льду. Полученный гомогенат центрифугировали при 12000 г в течение 5 мин. Для определения пероксидазной активности использовали супернатант.

Активность пероксидазы определяли по скорости окисления о-дианизидина в присутствии пероксида водорода и пероксидазы в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0). После внесения в реакционную смесь 0,1 мл 16 мМ перекиси водорода в течение 120 с проводили посекундное измерение оптической плотности при 460 нм на спектрофотометре (Unico, США). Контрольная среда содержала: 2,4 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера (pH 7,0), 0,1 мл 4,3 мМ о-дианизидина и 0,5 мл экстракта. Активность фермента рассчитывали в условных единицах на 1 г сырой массы, для оценки удельной активности – на 1 мг белка [7–9].

Содержание белка в пробах определяли по методу Бредфорда [10].

Содержание перекиси водорода определяли с использованием хлорида титана, основываясь на методике из работы [11].

Выявление изоформ пероксидазы осуществляли с помощью нативного электрофореза в 10%-м полиакриламидном геле (ПААГ) [12]. Для обнаружения ферментативной активности в ПААГ использовали диаминобензидиновый метод в модификации Лойда и др. [13].

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel. В таблице и на рисунках указаны средние арифметические значения и их стандартные отклонения. Все эксперименты проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нативный ген *gox* клонирован из высокоактивного грибного штамма *Penicillium funiculosum* 46.1. Модифицированный ген *gox-mod* (M 7.3) представляет собой ген *gox* с замененными кодонами на синонимичные кодоны растений *Solanum tuberosum* L., что, по данным белорусских коллег, ведет к увеличению концентрации эндогенного H_2O_2 в среднем на 23% по сравнению с трансгенными растениями, которые экспрессируют нативный ген в варианте L 17.2 [1, 2].

В первую очередь в растениях исходного сорта и его трансгенных линиях анализировали уровень H_2O_2 , чтобы удостовериться в том, что трансгенные растения действительно обладают высоким уровнем H_2O_2 в результате экспрессии гена *gox* (рис. 1).

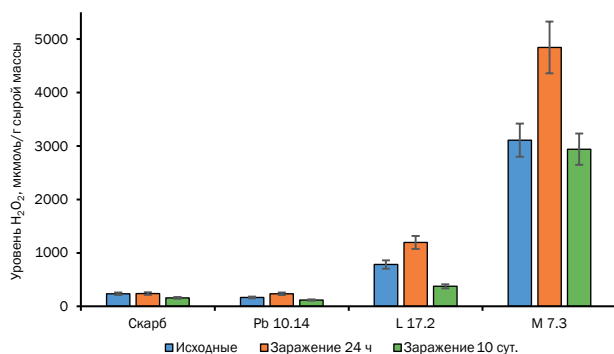


Рис. 1. Уровень перекиси водорода у растений картофеля сорта Скарб и его трансгенных линий до инфицирования (исходные растения), а также через 24 ч и 10 сут. после инфицирования бактериями *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Fig. 1. H₂O₂ level in the control and transgenic lines of potato variety Skarb before infection (source plants) and 24 hours and 10 days after infection with bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Анализ уровня H₂O₂ в корнях незараженных растений картофеля показал, что его содержание у растений трансгенной линии Pb 14.10, модифицированных пустым вектором, на 30% ниже, чем у исходного сорта. В то же время присутствие в геноме растений гена *gox* L 17.2 и *gox-mod* M 7.3 приводило к существенному увеличению уровня H₂O₂ на 230 и 1211% соответственно (см. рис. 1). Накопление большого количества H₂O₂ является результатом экспрессии привнесенного гена *gox*, как и задумывалось авторами трансгенных линий при их создании [1].

Спустя 24 ч контакта с фитопатогеном *Cms* мы отмечали увеличение уровня H₂O₂ в растениях линий L 17.2 и M 7.3, в то время как в растениях исходной линии уровень H₂O₂ оставался на прежнем уровне, в растениях линии Pb 10.14 он увеличивался незначительно. По истечении 10 сут. воздействия фитопатогена отмечалось снижение уровня H₂O₂ во всех исследуемых линиях, причем во всех линиях уровень H₂O₂ был ниже исходных значений. Вероятно, это было связано с развитием системного ответа на стресс, активацией антиоксидантных ферментов и других защитных механизмов, что приводило к снижению уровня H₂O₂. В то же время трансгенные линии, экспрессирующие ген *gox*, сохраняли повышенный уровень H₂O₂ в сравнении с исходным сортом Скарб и Pb 14.10.

Эти результаты хорошо сопоставляются с известными данными, полученными на трансгенных растениях картофеля, экспрессирующих ген *funga1*, кодирующий глюкозооксидазу из другого плесневого гриба *Aspergillus niger*, в которых также был выявлен высокий уровень H₂O₂ как в тканях листьев, так и в клубнях растений. Указанные трансгенные растения картофеля демонстрировали высокую устойчивость к бактериальной мягкой гнили (бактериальной водянке), вызываемой *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, и фитофторозу, вызываемому *Phytophthora infestans* [3].

Известно, что само по себе заражение фитопатогеном, как и агробактериальная трансформация, может приводить к появлению различных активных форм кис-

лорода в растениях, включая H₂O₂, что является характерными признаками окислительного стресса [14, 15]. H₂O₂ является наиболее «долгоживущей» формой активных форм кислорода и очень реакционноспособной, роль ее как сигнальной молекулы весьма многообразна: от регуляции гормональной сигнализации и экспрессии генов, участвующих в защите растений от патогенной инфекции [15, 16], активации кальциевых каналов в мембране клеток [17], до регуляции экспрессии хлоропластных и ядерных генов [4, 18], что приводит к изменению активности ферментов, участвующих в утилизации активных форм кислорода, таких как супероксиддисмутаза, каталаза, полифенолоксидаза и пероксидаза [19, 20]. Было показано, что в клетках трансгенных растений риса, синтезирующих гетерологичный пептид цекропин А, даже в отсутствии фитопатогенной инфекции увеличивается экспрессия ряда генов системы защиты от окислительного стресса, при этом наиболее активируемыми являются гены пероксидаз [21].

Далее предстояло оценить зависимость между уровнем H₂O₂ и активностью пероксидазы в корнях исследуемых растений картофеля в нормальных условиях роста и при взаимодействии с патогеном (рис. 2).

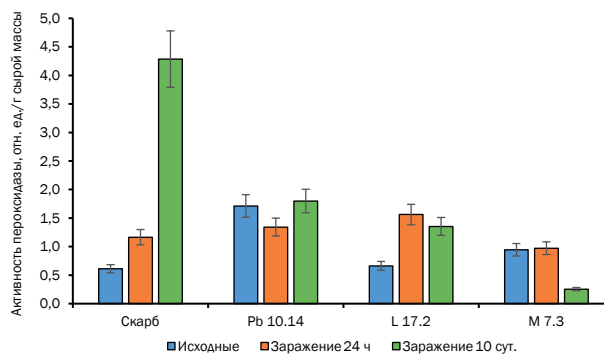


Рис. 2. Активность пероксидазы у растений картофеля сорта Скарб и его трансгенных линий до инфицирования (исходные растения), а также через 24 ч и 10 сут. после инфицирования бактериями *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Fig. 2. Peroxidase activity in control and transgenic lines of potato variety Skarb before infection (source plants) and 24 hours and 10 days after infection with bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Из рис. 2 видно, что в незараженных растениях в сравнении с исходным сортом активность пероксидазы была выше у линий Pb 14.10 (на 222%) и M 7.3 (на 61%). У линии L 17.2 активность фермента осталась на уровне исходного сорта Скарб. Через 24 ч после заражения фитопатогеном у сорта Скарб содержание H₂O₂ осталось на уровне незараженных растений, при этом активность пероксидазы увеличилась на 75% (по сравнению с незараженными растениями). У растений картофеля, модифицированных пустым вектором (Pb 14.10), мы наблюдали 40%-е увеличение содержания H₂O₂ на фоне снижения активности пероксидазы (по сравнению с незараженными растениями). У растений, модифицированных генами *gox*, на фоне существенного увеличения уровня H₂O₂ (порядка 30% для линии L 17.2 и 50% для линии M 7.3) увеличение активности перок-

сидазы наблюдали только у линии L 17.2 на 148%, у линии М 7.3 происходило лишь незначительное увеличение активности пероксидазы (см. рис. 2).

Показано, что через 24 ч и через 10 сут. после заражения фитопатогеном тенденции изменений активности фермента у сорта Скарб и его линий существенно отличались (см. рис. 2). При этом у трансгенных линий L 17.2 и М 7.3 прямой связи изменений активности пероксидазы с начальным уровнем H_2O_2 не выявлено. Высокий уровень H_2O_2 (см. рис. 1), возникающий в результате экспрессии целевого гена *gox* у трансгенных линий, не способствовал увеличению активности пероксидазы как в отсутствии, так и в присутствии инфекционной нагрузки у линии М 7.3. Однако у линии L 17.2 при более низком, чем у линии М 7.3, уровне H_2O_2 заметно увеличивалась активность пероксидазы при контакте с фитопатогеном. У линии Pb 14.10, трансформированной холостым агробактериальным вектором, вероятно, пероксидаза, показатели активности которой были высокими, способствовала поддержанию низкого уровня H_2O_2 в корнях как у неинфицированных, так и у инфицированных растений (см. рис. 1, 2).

После 10 сут. воздействия фитопатогена наблюдали сильное снижение активности пероксидазы у линии М 7.3, у линии L 17.2 происходило небольшое снижение активности, у линии Pb 14.10 активность пероксидазы вернулась к исходным значениям, а исходный сорт Скарб демонстрировал существенное увеличение активности пероксидазы. Вероятно, у сорта Скарб к 10 сут. развилась защитная реакция на инфицирование фитопатогеном, проявившаяся в повышении активности пероксидазы. Приведенные данные могут свидетельствовать о разных физиологических реакциях генетически неоднородных линий растений картофеля на действие фитопатогена, а также о том, что высокий уровень H_2O_2 не всегда напрямую приводит к увеличению активности пероксидазы ввиду того, что могут активироваться другие антиоксидантные ферменты. Имеются данные о том, что пероксидаза является нестабильным ферментом и легко инактивируется своим окислительным субстратом – H_2O_2 , то есть при избытке субстрата происходит самоинакти-

вация фермента [22, 23], что в нашем случае как раз и может объяснять снижение активности пероксидазы в трансгенных линиях с высоким уровнем H_2O_2 .

Представлялось интересным проследить, изменяется ли спектр изоформ пероксидазы в корнях растений картофеля в норме и при заражении патогеном. Путем электрофореза в ПААГ были получены профили изоформ фермента, отображенные в таблице.

Результаты электрофореза в ПААГ показали, что изоферментные спектры пероксидазы в незараженных корнях исходного сорта Скарб и во всех его трансгенных линиях отличаются. Так, мы видим, что у всех трансгенных линий до инфицирования выявлена изоформа пероксидазы с Rf 0,40, которая отсутствовала у сорта Скарб, но выявилась после инфицирования *Sms*. Линия М 7.3 отличалась наличием низкомолекулярных форм (Rf 0,68 и 0,72), которые не наблюдали у двух других трансгенных линий и исходного сорта Скарб.

После 24 ч взаимодействия с фитопатогеном наблюдали следующие изменения изоферментного состава в корнях растений картофеля сорта Скарб и во всех трансгенных линиях. Во-первых, во всех вариантах эксперимента изоферментный состав пероксидазы стал почти одинаковым. Во-вторых, поменялся изоферментный состав – появились высокомолекулярные формы (Rf 0,20 и 0,36) и исчезли все изоформы с Rf больше 0,50. За 10 сут. коинкубации с фитопатогеном у сорта Скарб наблюдалось увеличение числа низкомолекулярных изоформ с Rf 0,50 и 0,52, а у линии М 7.3 – изоформ с Rf 0,44, 0,46, 0,50.

Предварительно сделан вывод о том, что не всегда наличие широкого спектра изоформ пероксидазы обеспечивает высокий уровень активности фермента в нормальных условиях роста, а также при контакте с фитопатогеном. Вероятно, у сорта Скарб и у линии М 7.3 большой вклад в увеличение активности вносят низкомолекулярные формы. В пользу сказанного свидетельствуют данные активности пероксидазы в корнях растений линии М 7.3 до контакта с фитопатогеном и сорта Скарб после 10 сут. контакта с фитопатогеном (см. рис. 2). Возможно, отсутствие низкомолекулярных

Относительная подвижность изоформ пероксидазы корней растений картофеля сорта Скарб и его трансгенных линий в полиакриламидном геле, Rf

Relative mobility of root peroxidase isoforms of potato plants of the Skarb variety and its transgenic lines in polyacrylamide gel, Rf

Скарб	Линия Pb 14.10	Линия L 17.2	Линия М 7.3	Скарб	Линия Pb 14.10	Линия L 17.2	Линия М 7.3	Скарб	Линия Pb 14.10	Линия L 17.2	Линия М 7.3
Исходные				24 ч заражения				10 сут. заражения			
–	–	–	–	0,28**	0,28**	0,28**	0,28**	0,28***	0,28**	0,28**	0,28**
–	–	–	–	0,33***	0,33***	0,33***	0,33***	0,33***	0,33***	0,33***	0,33***
–	–	–	–	0,36**	0,36**	0,36***	0,36**	0,36***	0,36**	0,36**	0,36**
–	0,40**	0,40**	0,40**	0,40**	0,40***	0,40***	0,40***	0,40***	0,40***	0,40**	0,40***
–	–	–	–	0,44*	0,44*	0,44***	–	0,44***	0,44*	0,44*	0,44**
0,46**	0,46***	0,46***	0,46***	–	0,46*	0,46**	–	0,46**	0,46*	0,46*	0,46*
0,53**	0,52**	0,52**	0,52	–	–	0,50*	–	0,50*	–	–	0,50*
0,57***	0,57***	0,57*	0,57***	–	–	–	–	0,52*	–	–	–
–	–	–	0,68*	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	0,72*	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание. Звездочками отмечена интенсивность окрашивания полос красителем: * – низкая, ** – средняя, *** – высокая.

изоформ пероксидазы у линии М 7.3 после 10 сут. воздействия фитопатогена, которое мы наблюдали в исходном варианте, и приводило к снижению активности.

Среди исследуемых линий нетипичным характером реакции обладала линия Pb 14.10, трансформированная холостым агробактериальным вектором. В корнях ее растений при общем низком уровне H_2O_2 , прослеживаемом на протяжении всех периодов наблюдений, до и через 10 сут. после инфицирования бактериями *Sms* отмечалась более высокая активность пероксидазы, чем у линий М 7.3 и L 17.2. При этом в указанные периоды у линии Pb 14.10 уровень пероксидазной активности был одинаков (см. рис. 2) при существенном различии в составе их изоформ пероксидазы (см. таблицу). В то же время при одинаковом изоферментном спектре пероксидазы у этой линии фиксировалось снижение активности данного фермента и незначительное повышение уровня H_2O_2 в начале контакта с указанными бактериями. С чем это связано, еще предстоит выяснить, но ранее мы наблюдали такую реакцию растений табака на трансформацию холостым агробактериальным вектором [14].

Выявленная разная интенсивность полос на электрофореграмме (см. таблицу) свидетельствует о количественной вариабельности данных изоферментов у исследуемых линий. Возможно, отмеченная вариабельность имела отображение на наблюдаемых у этих растений изменениях уровня активности пероксидазы.

Для генетически неоднородных линий описанная картина является характерной. Подтверждением этому служат данные, полученные на нетрансгенных отечественных сортах картофеля *in vitro*, на которых изучали влияние заражения *Sms* на изоферментный состав слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы. Было установлено, что инфицирование растений патогенами приводит к быстрой активации пероксидазы, часто сопровождаемой появлением новых форм и исчезновением некоторых других изоформ фермента [6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя вышеизложенное, можно сделать вывод о том, что исследуемые трансгенные линии картофеля, несущие гены *gox* и *gox-mod*, действительно обладают высоким уровнем H_2O_2 , что обеспечивает устойчивость корней (клубней) к различным видам бактериальной и грибковой инфекции.

Влияние фитопатогена *Sms* на уровень H_2O_2 в картофеле исходного сорта Скарб и линии Pb 14.10 про-

являлось лишь в незначительном его увеличении, а в трансгенных линиях L 17.2 и М 7.3 – в существенном увеличении, несмотря на то, что эти линии исходно обладали высоким уровнем H_2O_2 . Через 10 сут. после заражения произошло понижение уровней H_2O_2 у всех исследуемых форм растений, возможно, обусловленное активизацией в этот период каталазы.

Мониторинг активности пероксидазы показал, что через 24 ч и через 10 сут. после заражения фитопатогеном тенденции изменений активности фермента у сорта Скарб и его линий существенно отличались. У линии М 7.3 самый высокий из исследуемых форм растений уровень H_2O_2 , возникающий в результате экспрессии целевого гена *gox*, не способствует увеличению активности пероксидазы. Очевидно, это происходит как в отсутствии, так и в присутствии инфекционной нагрузки. Заметно увеличивалась активность пероксидазы после контакта с фитопатогеном у линии L 17.2, уровень H_2O_2 у которой ниже, чем у линии М 7.3, но выше, чем у сорта Скарб и линии Pb 14.10. У линии Pb 14.10, трансформированной холостым агробактериальным вектором, низкий уровень H_2O_2 аналогичен уровню сорта Скарб, но при этом у обсуждаемой линии прослеживается высокая отрицательная зависимость (коэффициент корреляции $R = -0,99$) между изменяющимися показателями для уровней H_2O_2 и активности пероксидазы в разные периоды наблюдений, включая взаимодействия с *Sms*. Данный факт свидетельствует о хорошо выраженной роли пероксидазы у линии Pb 14.10 в регуляции уровня H_2O_2 в корнях.

При взаимодействии с фитопатогеном происходит кардинальное изменение изоферментного состава пероксидазы и количественной вариабельности этих изоферментов в корнях как исходного сорта Скарб, так и его трансгенных линий. Полагаем, что отмеченная вариабельность имела отображение на наблюдаемых у этих растений изменениях уровня активности пероксидазы.

Хотя высокий уровень H_2O_2 обеспечивает защиту растений от инфекции различными микробными агентами, на фоне инактивации пероксидазы он может приводить к окислительному стрессу и деградации многих клеточных структур и белковых молекул, а также снижению ростовых параметров. Благодаря многоуровневой системе защиты растений от окислительного стресса может происходить активация других ферментов антиоксидантной защиты, например каталазы, полифенолоксидазы и пр., активность которых, возможно, станет предметом дальнейших исследований.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Савчин Д.В., Панюш А.С., Картель Н.А., Генетическая трансформация растений векторными конструкциями с геном *GOX Penicillium funiculosum* // Молекулярная и прикладная генетика. 2011. Т. 12. С. 49–55. EDN: ZYHRUD.
2. Савчин Д.В., Вересова Т.Н., Межнина О.А., Панюш А.С., Вячеслова А.О., Голденкова-Павлова И.В. Оптимизация кодонового состава грибного гена *gox Penicillium funiculosum* для эффективной экспрессии в растениях *Solanum tuberosum* // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. 2015. N 1. С. 50–55. EDN: TKS WKP.
3. 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. 1995. Vol. 7, no. 9. P. 1357–1368. DOI: 10.1105/tpc.7.9.1357.
4. Jaspers P., Kangasjarvi J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling // Physiologia Plantarum. 2010. Vol. 138, no. 4. P. 405–413. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01321.x.
5. Киргизова И.В., Гаджимурадов А.М., Омаров Р.Т. Особенности накопления антиоксидантных ферментов у картофеля в условиях биотического и абиотического стресса // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2018. Т. 8. N 4. С. 42–54. DOI: 10.21285/2227-2925-2018-8-4-42-54. EDN: YTDWDJ.

6. Граскова И.А., Боровский Г.Б., Владимирова С.В., Романенко А.С., Войников В.К. Изоферментные спектры пероксидаз картофеля при патогенезе кольцевой гнили // Доклады Академии наук. 2002. Т. 384. № 6. С. 844–847. EDN: LCYKXD.

7. Рогожин В.В., Верхотуров В.В. Стационарная кинетика совместного окисления гидрохинонов и о-данизида перекисью водорода в присутствии пероксидазы хрена // Биохимия. 1999. Т. 64. № 2. С. 219–224.

8. Акимов Г.П., Верхотуров В.В., Соколова М.Г. Влияние *Azotobacter* на активность пероксидазы и содержание перекиси водорода в корнях проростков гороха, инокулированных *Rhizobium* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2017. Т. 7. № 4. С. 126–131. DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-4-126-131. EDN: YMQFSN.

9. Акимов Г.П., Соколова М.Г., Нечаева Л.В., Лузова Г.Б., Сидорова К.К. Роль пероксидазы во взаимодействиях растений гороха с *Rhizobium* // Агрохимия. 2002. № 12. С. 37–41.

10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. 1976. Vol. 72. P. 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

11. Попов В.Н., Антипина А.В., Астахова Н.В. Изменения ультраструктуры хлоропластов растений табака в процессе защиты от окислительного стресса при гипотермии // Физиология растений. 2016. Т. 63. № 3. С. 319–326. DOI: 10.7868/S0015330316030118. EDN: VTQ CER.

12. Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Грабельных О.И. Методы изучения митохондрий растений. Полярнография и электрофорез / отв. ред. Р.К. Салеев. М.: Изд-во ООО «НПК «ПРОМЭКОБЕЗОПАСНОСТЬ», 2004. 98 с.

13. Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов: лабораторные методы / пер. с англ.; под ред. Н.Т. Райхлина. М.: Мир, 1982. 272 с.

14. Еникеев А.Г., Копытина Т.В., Семенова Л.А., Натяганова А.В., Гаманец Л.В., Волкова О.Д. Агробактериальная трансформация как комплексный биотический

стрессорный фактор // Журнал стресс-физиологии и биохимии. 2008. Т. 4. № 1. С. 11–19. EDN: IUINPP.

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

16. Chen Z., Silva H., Klessig D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid // Science. 1993. Vol. 262, no. 5141. P. 1883–1886. DOI: 10.1126/science.8266079.

17. Pei Z.-M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G.J., et al. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells // Nature. 2000. Vol. 406, no. 6797. P. 731–734. DOI: 10.1038/35021067.

18. Galvez-Valdivieso G., Mullineaux P.M. The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the nucleus // Physiologia Plantarum. 2010. Vol. 138, no. 4. P. 430–439. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01331.x.

19. Pandey S., Fartyal D., Agarwal A., Shukla T., James D., Kaul T., et al. Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase // Frontiers in Plant Science. 2017. Vol. 8. P. 581. DOI: 10.3389/fpls.2017.00581.

20. Андреева В.А. Фермент пероксидазы: участие в защитном механизме растений / отв. ред. Ю.Н. Журавлев. М.: Наука, 1988. 128 с.

21. Campo S., Manrique S., García-Martínez J., San Segundo B. Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression // Plant Biotechnology Journal. 2008. Vol. 6, no. 6. P. 585–608. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2008.00339.x.

22. Arnao M.B., Acosta M., del Río J.A., García-Cánovas F. Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent // Biochimica et Biophysica Acta. 1990. Vol. 1038, no. 1. P. 85–89. DOI: 10.1016/0167-4838(90)90014-7.

23. Valderrama B., Ayala M., Vazquez-Duhalt R. Suicide inactivation of peroxidases review and the challenge of engineering more robust enzymes // Chemistry & Biology. 2002. Vol. 9, no. 5. P. 555–565. DOI: 10.1016/S1074-5521(02)00149-7.

REFERENCES

1. Sauchyn D.V., Panyush A.S., Kartel N.A. Plant genetic transformation using vectors with *Penicillium funiculosum* *gox* gene. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika*. 2011;12:49-55. (In Russian). EDN: ZYHRUD.

2. Sauchyn D.V., Veresova T.N., Mezhnina O.A., Panush A.S., Vyacheslavova A.O., Goldenkova-Pavlova I.V. Codon optimization of the fungal *Penicillium funiculosum* *gox* gene for high-level expression in *Solanum tuberosum* plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2015;1:50-55. (In Russian). EDN: TKS WKP.

3. 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 H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *The Plant Cell*. 1995;7(9):1357-1368. DOI: 10.1105/tpc.7.9.1357.

4. Jaspers P., Kangasjarvi J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum*. 2010;138(4):405-413. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01321.x.

5. Kirgizova I.V., Gajimuradova A.M., Omarov R.T. Accumulation of antioxidant enzymes in potato plants under the conditions of biotic and abiotic stress. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2018;8(4):42-54. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2018-8-4-42-54. EDN: YTDWDJ.

6. Graskova I.A., Borovskii G.B., Vladimirova S.V., Romanenko A.S., Voinikov V.K. Isozyme spectra of potato peroxidases in ring rot pathogenesis. *Doklady Akademii nauk*. 2002;384(6):844-847. (In Russian). EDN: LCYKXD.

7. Rogozhin V.V., Verkhoturov V.V. Steady-state kinetics of combined oxidation of hydroquinone and o-dianisidine by hydrogen peroxide in the presence of horse radish peroxidase. *Biokhimiya*. 1999;64(2):219-224.

8. Akimov G.P., Verkhoturov V.V., Sokolova M.G. The effect of *Azotobacter* on the activity of peroxidase and hydrogen peroxide content in the roots of pea seedlings inoculated with *Rhizobium*. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2017;7(4):126-131.

(In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-4-126-131. EDN: YMQFSN.

9. Akimova G.P., Sokolova M.G., Nechaeva L.V., Luzova G.B., Sidorova K.K. Role of peroxidase in pea plant interactions with *Rhizobium*. *Agrokhimiya*. 2002;12:37-41. (In Russian).

10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72:248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

11. Popov V.N., Antipina O.V., Astakhova N.V. Changes in chloroplast ultrastructure of tobacco plants in the course of protection from oxidative stress under hypothermia. *Fiziologiya rastenii*. 2016;63(3):319-326. (In Russian). DOI: 10.7868/S0015330316030118. EDN: VTQ CER.

12. Pobezhimova T.P., Kolesnichenko A.V., Grabel'nykh O.I. Methods of studying plant mitochondria. *Polarography and electrophoresis*. Moscow: OOO "NPK 'PROMEKOBEPASNOST'"; 2004, 98 p. (In Russian).

13. Lojda Z., Gossrau R., Schiebler T.H. Enzyme histochemistry: a laboratory manual; 1979, 339 p. (Russ. ed.: *Gistokhimiya fermentov: laboratornye metody*. Moscow: Mir; 1982, 272 p.).

14. Enikeev A.G., Kopytina T.V., Semenova L.A., Natyaganova A.V., Gamanetz L.V., Volkova O.D. Agrobacterial transformation as complex biotical stressing factor. *Journal of stress physiology & Biochemistry*. 2008;4(1):11-19. (In Russian). EDN: IUI NPP.

15. Kreslavski V.D., Allakhverdiev S.I., Los D.A., Kuznetsov V.V. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress. *Fiziologiya rastenii*. 2012;59(2):163-178. (In Russian). EDN: OWEOSH.

16. Chen Z., Silva H., Klessig D.F. Active oxygen species

in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*. 1993;262(5141):1883-1886. DOI: 10.1126/science.8266079.

17. Pei Z.-M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G.J., et al. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*. 2000;406(6797):731-734. DOI: 10.1038/35021067.

18. Galvez-Valdivieso G., Mullineaux P.M. The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the nucleus. *Physiologia Plantarum*. 2010;138(4):430-439. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01331.x.

19. Pandey S., Fartyal D., Agarwal A., Shukla T., James D., Kaul T., et al. Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:581. DOI: 10.3389/fpls.2017.00581.

20. Andreeva V.A. Peroxidase: participation in the defense mechanism of plants. Moscow: Nauka; 1988, 128 p. (In Russian).

21. Campo S., Manrique S., García-Martínez J., San Segundo B. Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression. *Plant Biotechnology Journal*. 2008;6(6):585-608. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2008.00339.x.

22. Arnao M.B., Acosta M., del Río J.A., García-Cánavas F. Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1990;1038(1):85-89. DOI: 10.1016/0167-4838(90)90014-7.

23. Valderrama B., Ayala M., Vazquez-Duhalt R. Suicide inactivation of peroxidases: review and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry & Biology*. 2002;9(5):555-565. DOI: 10.1016/S1074-5521(02)00149-7.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Филинова Надежда Владимировна,
к.б.н., научный сотрудник,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Сибирский институт
физиологии и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
filinova_nv@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0328-6716>

Ищенко Алексей Александрович,
к.б.н., младший научный сотрудник,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Сибирский институт
физиологии и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
aspt25@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0003-4963-3917>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Nadezhda V. Filinova,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
filinova_nv@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0328-6716>

Aleksei A. Ishchenko,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
aspt25@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0003-4963-3917>

Копытина Татьяна Васильевна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Сибирский институт
физиологии и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
✉ kopytina@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3788-0895>

Макарова Людмила Евгеньевна,
д.б.н., главный научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
makarova@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4582-8245>

Tatyana V. Kopytina,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ kopytina@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3788-0895>

Liudmila E. Makarova,
Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
makarova@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4582-8245>

Вклад авторов

Н.В. Филинова – проведение исследования, визуализация, валидация результатов, написание черновика рукописи.
А.А. Ищенко – проведение исследования, визуализация.
Т.В. Копытина – разработка концепции, разработка методологии, валидация результатов, написание черновика рукописи.
Л.Е. Макарова – административное руководство исследовательским проектом, научное руководство, редактирование рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 19.08.2024.
Одобрена после рецензирования 13.09.2024.
Принята к публикации 31.05.2025.

Contribution of the authors

Nadezhda V. Filinova – investigation, visualization, validation, writing – original draft.
Aleksii A. Ischenko – investigation, visualization.
Tatyana V. Kopytina – conceptualization, methodology, validation, writing – original draft.
Liudmila E. Makarova – project administration, supervision, editing.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 19.08.2024.
Approved after reviewing 13.09.2024.
Accepted for publication 31.05.2025.