

УДК 631.46:579.873

АНАЛИЗ АКТИНОБИОТЫ РИЗОСФЕРЫ ТАБАКА С ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМ ГЕНОМ ХОЛИНОКСИДАЗЫ ИЗ *Arthrobacter globiformis*

© 2022 г. И. Г. Широких*, **, @, Я. И. Назарова*, Г. Н. Ралдугина***, А. А. Гулевич****, Е. Н. Баранова****

*ФАНЦ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого, ул. Ленина, 166а, Киров, 610007 Россия

**Вятский государственный университет, ул. Московская, 36, Киров, 610000 Россия

***Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276 Россия

****ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, ул. Тимирязевская, 42, Москва, 127550 Россия

@E-mail: irgenal@mail.ru

Поступила в редакцию 08.04.2020 г.

После доработки 26.11.2020 г.

Принята к публикации 27.11.2020 г.

Путем агробактериальной трансформации получены растения табака (*Nicotiana tabacum*) сорта Sam-sun с геном холинксидазы (*cod A*), отвечающим за синтез глицинбетаина. Для оценки возможных воздействий трансформантов на почвенную микробную систему изучали их ризосферные комплексы, используя актиномицеты в качестве биоиндикационной группы микроорганизмов. Сравнивали численность, таксономический состав, функциональную структуру ризосферных комплексов исходного сорта и трансгенных линий CodA7 и CodA17, с различной экспрессией гена *codA*. Существенной разницы в таксономической структуре, встречаемости антагонистов фитопатогенных грибов и целлюлозолитиков в ризосфере исходных растений и растений-трансформантов не выявлено. Актиномицетные комплексы трансформантов характеризовались варьированием, сопоставимым по величине с варьированием, вызванным стрессовым воздействием почвенного фона.

Ключевые слова: трансгенные культуры, почва, актиномицеты, *Streptomyces*, частота встречаемости, антагонисты, целлюлозолитики

DOI: 10.31857/S1026347022010139

Применение генно-инженерных технологий для повышения устойчивости сельскохозяйственных культур к абиотическим стрессам рассматривают в настоящее время как действенную стратегию решения проблем продовольственной безопасности (Brookes, Barfoot, 2017). Актуализация генно-инженерных технологий выдвигает задачу оценки их экологических последствий для окружающей среды, включая влияние на микробные сообщества почвы (Ladics *et al.*, 2015). Кроме того, трансгенные растения широко используются в качестве экспериментальных моделей, позволяющих оценивать влияние отдельных генов, а также исследовать функции сетей взаимодействующих генов, контролируемых формированием морфологических, биохимических и физиологических признаков в процессе развития растения и при воздействии внешних факторов различной природы (Кочетов, Шумный, 2016).

Интродукция гетерологичного гена может повлечь изменения в характере микробно-растительных взаимодействий и вызвать перестройки в структуре комплексов ризосферной биоты. Боль-

шинство исследований, посвященных этому вопросу, выполнено на RR-растениях, несущих ген енолпирувилшикимат-3-фосфат-синтетазы (EP-SP-синтетазы) из *Agrobacterium* sp. CP4, который придает устойчивость к гербициду раундап (Meriles *et al.*, 2006; Zablutowicz, Reddy, 2007; Kremer, Means, 2009), и Bt-растениях, устойчивых к насекомым-вредителям благодаря гену дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* (Zhang *et al.*, 2014; Singh, Dubey, 2016; Li *et al.*, 2019). Авторы отмечают сильное варьирование наблюдаемых эффектов в зависимости от конкретного вида, техники трансформации, встраиваемой генетической конструкции, а также от экологических условий выращивания растений. Неизвестным остается, существуют ли специфические ответы со стороны микроорганизмов на различные категории, разработанных на сегодняшний день трансгенных растений, с учетом конкретной технологии и используемой генетической конструкции (Turrini *et al.*, 2015).

Особое место среди существующего разнообразия подходов к управлению молекулярно-генетическими механизмами адаптации растений за-

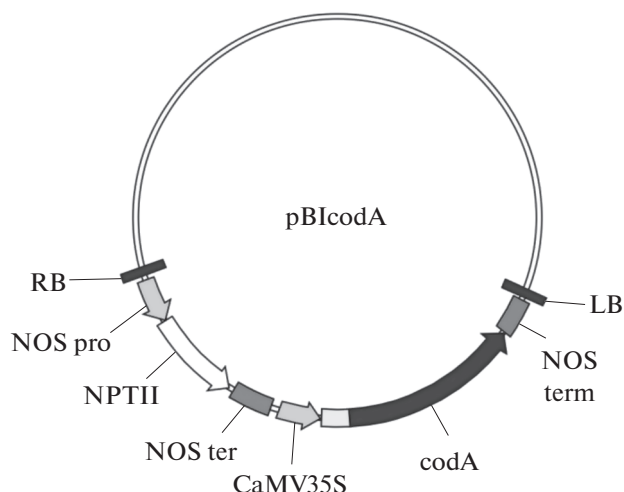


Рис. 1. Схема экспрессионного вектора pB1codA, содержащего маркерный ген *NPTII* и целевой ген холинноксидазы *codA*. NOSpro — промотор гена нопалинсинтазы; *NPTII* — маркерный ген неомоцинофосфотрансферазы; NOSter — терминатор гена нопалинсинтазы; CaMV35S — промотор 35S из вируса мозаики цветной капусты; ss — сигнальная последовательность из гена рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы томата; *codA* — ген холинноксидазы из *Arthrobacter globiformis*.

нимает генная инженерия осмолитов, ориентированная на создание устойчивых форм путем интродукции генов, связанных с ответами на осмотический стресс, который сопровождает многие виды негативных воздействий окружающей среды — высокую соленость, холод и засуху. К числу эффективных осмопротекторов относят глицинбетаин (ГБ), источником которого служит холин. Рядом авторов было показано, что бактериальный ген холинноксидазы *codA* может обеспечивать в ответ на стресс накопление ГБ в растениях, повышая тем самым их адаптивность к различным абиотическим стрессам (Prasad *et al.*, 2000; Sakamoto, Murata, 2000; Agarwal, Jha, 2010; You *et al.*, 2019). При трансформации геном *codA* древесных видов *Eucalyptus globulus* и *E. camaldulensis* группой японских исследователей отмечено отсутствие существенной разницы между трансформированными и нетрансформированными растениями по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) актиномицетов и других бактерий в прикорневой зоне почвы (Oguchi *et al.*, 2014; Tran *et al.*, 2018). Однако эти данные, как и значительная часть работ, выполненных с использованием генно-молекулярных методов, не позволяют судить о физиологических особенностях и экологических функциях почвенных микроорганизмов. В связи с этим сохранили свою значимость традиционные методы посева с последующим выделением микроорганизмов в чистые культуры, способные дать информацию об изменениях функциональной

структуры модельных микробных комплексов. Кроме того, сам по себе вклад отдельного гена в перестройку ризосферного сообщества трансгенного растения должен быть сопоставлен с влиянием иных факторов, например, влиянием эдафических условий.

Цель работы — сравнительный анализ комплексов актиномицетов ризосферы *Nicotiana tabacum* сорт Samsun и трансгенных по гену холинноксидазы *codA* линий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали *N. tabacum* сорта Samsun (далее Самсун) и полученные на его основе с помощью агробактериальной трансформации линии CodA7 и CodA17. В качестве целевого был использован ген *codA*, под контролем CaMV 35S промотора. В качестве маркерного использовали ген *NPTII* неомоцинофосфотрансферазы, дающий возможность отбирать трансгенные проростки на среде с канамицином. Целевой ген *codA* был снабжен сигнальной последовательностью, отвечающей за доставку белкового продукта внутрь плазматического компартмента (рис. 1).

Трансгенный статус — наличие гетерологичного гена в полученных трансформантах — подтверждали методом ПЦР с использованием праймеров, которые были оптимизированы для выявления внедренного гена *codA*: codF 5'-CGCCAАСТТСТТС-CAGATCAA-3' — прямой, и codR 5'-GGGT-GTTCATGTСGAACG-3' — обратный. Длина амплифицированного фрагмента ДНК составила 507 п. о.

ДНК выделяли из растительной ткани с использованием набора реагентов “ДНК-Экстрэн” производства фирмы “Синтол” (Россия) согласно методике производителя. Реакцию ПЦР проводили в следующих условиях: 4 мин при 94°C; далее 35 циклов со следующими параметрами — 1 мин — 94°C, 30 с — 59°C, 30 с — 55°C, 30 с — 50°C; заключительные 10 мин — 72°C.

Экспрессию гена *codA* определяли с помощью обратной цепной реакции (ОТ-ПЦР). РНК выделяли стандартным методом с использованием набора “РНК-Экстрэн” фирмы “Синтол” согласно методике производителя. Концентрацию выделенной РНК определяли спектрофотометрически, кДНК получали по методике производителя (набор фирмы “Синтол”).

Клональное микроразмножение пробирочных растений исходного сорта и линий CodA7 и CodA17 проводили на среде МС без гормонов и витаминов (Murashige, Skoog, 1962). Растения, имеющие развитую корневую систему, высаживали в вегетационные сосуды и выращивали в условиях искусственного климата на двух почвенных фонах: 1) природная дерново-подзолистая почва с

$pH_{\text{сол}}$ 3.6 и содержанием подвижного алюминия 12.8 мг/100 г почвы (стресс), 2) искусственный торфо-перегнойный почвогрунт с $pH_{\text{сол}}$ 6.0, без алюминия (контроль). Каждый вариант был представлен шестью клонами, которые выращивали в трех сосудах по два растения в каждом.

В возрасте 10 недель растения извлекали из сосудов, корневую систему освобождали от почвы отряхиванием, объединяли в усредненные образцы по вариантам. Из каждого усредненного образца брали по две навески (2.0 г) корней с почвой, оставшейся после отряхивания (считали это ризосферой), прогревали в течение 1 ч при 100°C для ограничения роста немитцелиальных бактерий, гомогенизировали в ступке и готовили серию разведений для посева. Учитывали, выделяли и определяли структуру комплексов актиномицетов на казеин-глицериновом агаре (КГА) и агаре с пропионатом натрия. Колонии на чашках учитывали дифференцировано по морфологическим типам. Доминирующие колонии выделяли в чистую культуру, фиксируя их принадлежность к определенному образцу. Для каждого образца составляли выборки не менее 15 изолятов. Таксономическое положение изолятов определяли, используя фенотипические признаки (Определитель бактерий Берджи, 1997; Гаузе и др., 1983) и, выборочно, результаты анализа фрагмента гена 16S рРНК (“Синтол”, Москва). ДНК экстрагировали из чистых изолятов, ген 16S рРНК амплифицировали с помощью ПЦР с использованием универсальных бактериальных праймеров 16SF75 – AGTGGCGGACGGGTGAGTAA и 16SR1100 – TТАCTAGCGATTCGACTTCA. Условия для ПЦР использовали следующие: начальная денатурация при 95°C в течение 4 мин, 32 цикла 94°C в течение 20 с, 58°C в течение 30 с и 72°C в течение 45 с, после чего окончательное удлинение 5 мин при 68°C. Продукты ПЦР секвенировали на анализаторе ДНК ABI3130xl (Thermo Fisher Scientific, США). Первичный сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностями из базы данных GenBank проводили с помощью программы NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Парное выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы LALIGN (https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html).

Дополнительно изучали антифунгальные (Егоров, 2004) и целлюлозолитические (Teather, Wood, 1982) свойства выделенных культур. Характеризуя структуру ризосферных комплексов актиномицетов, использовали показатели долевого участия и частоты встречаемости таксона в комплексе, а также относительное обилие видов антагонистов и видов с различной целлюлозолитической активностью (%).

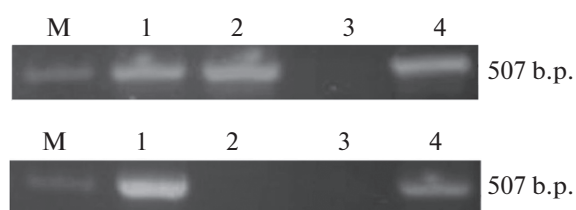


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов ПЦР (верхняя) и ОТ-ПЦР (нижняя). Дорожки слева направо: М – маркер молекулярных весов; 1 – трансгенная линия CodA17; 2 – трансгенная линия CodA7; 3 – контрольное нетрансформированное растение; 4 – плазмидная ДНК.

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами с использованием пакета программ EXCEL и STATGRAFICS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы была проведена молекулярная проверка трансгенной природы независимо трансформированных линий табака CodA7 и CodA17. По результатам электрофореза продуктов амплификации наличие гетерологичной вставки *codA* обнаружено как у линии CodA7, так и у линии CodA17 (рис. 2).

В результате проведения ОТ-ПЦР было получено подтверждение экспрессии интродуцированного гена *codA* только у одной линии – CodA17. С учетом выявленных различий между линиями CodA7 и CodA17 по экспрессии гетерологичных вставок, обе линии были взяты для дальнейшего изучения актинобиоты в их ризосфере.

Выбор актиномицетов в качестве модельной биоиндикационной группы микроорганизмов определялся многообразием аспектов их взаимодействия с растением. Актиномицеты способны к биосинтезу широкого спектра физиологически активных соединений (антибиотики, фитогормоны, сидерофоры, витамины и т.д.) с фиторегуляторным и контролирующим развитие фитопатогенов действием (Viaene *et al.*, 2016; Vurukonda *et al.*, 2018). Благодаря продукции гидролитических ферментов (протеазы, целлюлазы, лигноцеллюлазы, ксиланазы и хитиназы), актиномицеты в почвах участвуют в утилизации разнообразных растительных полимеров и минерализации мономеров, создают для растений благоприятные условия существования (de Jesus Sousa, Olivares, 2016; Bhatti *et al.*, 2017).

Сравнительный анализ численности и состава актиномицетных комплексов в ризосфере показал, что в обычных условиях (контроль) численность мицелиальных прокариот на корнях табака исходного сорта была в 2.8–3.6 раза выше, чем на корнях растений, подвергнутых трансформации

Таблица 1. Численность и структура комплексов актиномицетов в ризосфере табака в зависимости от почвенного фона и генотипа

Показатель	Почвенный фон	Генотип растения		
		Самсун	CodA7	CodA17
Общая численность актиномицетов, вырастающих на КГА, тыс. КОЕ/г	Контроль	387 ± 10.1	140 ± 9.4	108 ± 6.84
	Стресс	165 ± 8.6	102 ± 3.2	512 ± 1.7
Доля актиномицетов в прокариотном комплексе, %	Контроль	1.54	0.46	0.23
	Стресс	0.58	0.46	4.74
Долевое участие в комплексе представителей родов, % :				
<i>Streptomyces</i>	Контроль	98.1	96.0	95.8
	Стресс	98.3	95.7	96.7
<i>Micromonospora</i>	Контроль	0.60	0.92	1.33
	Стресс	0.46	0.80	0.06
олигоспоровые формы	Контроль	0.82	1.58	2.00
	Стресс	0.76	2.28	1.92
<i>Streptosporangium</i>	Контроль	0	0.26	0.58
	Стресс	0	0.58	0.47
<i>Streptoverticillium</i>	Контроль	0.45	1.19	0.25
	Стресс	0.46	0.68	0.82

(табл. 1). Кроме того, у исходного сорта доля актиномицетов в прокариотном комплексе ризосферы была в 3–6 раз значительнее, чем у линий CodA7 и CodA17. На фоне стресса, обусловленного токсичностью ионов алюминия в кислой почве, количество актиномицетов на корнях исходного сорта и линии CodA7 существенно снизилось, тогда как в ризосфере трансформанта CodA17, с экспрессией интродуцированного гена, напротив, увеличилось как абсолютное (в пять раз), так и относительное их содержание (в 20 раз). Количественная разница в отклике ризосферной актинобиоты на стресс у трансформантов может быть связана с различиями в экспрессии гена холиноксидазы и, соответственно, в накоплении растениями ГБ, а также с плейотропным действием гетерологичной вставки.

Сравнение исходного сорта и трансгенных линий по таксономической структуре ризосферного комплекса, выявляемого на среде с пропионатом натрия, показало, что на корнях табака с различной частотой встречались представители родов *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Streptoverticillium* и олигоспоровые формы актиномицетов (рис. 3). В ризосфере всех трех генотипов по долевого участию доминировали представители рода *Streptomyces* (95.7–98.1%), как в контроле, так и в стрессовых условиях (табл. 1). В отличие от стрептомицетов, долевого участия ви-

дов рода *Micromonospora* изменялось в зависимости от генотипа растения, увеличиваясь от 0.46–0.60% в ризосфере исходного сорта до 0.80–0.92% на корнях трансформанта CodA7. Линия CodA17 отличалась наиболее значительным варьированием долевого вклада микромоноспор (0.06–1.33%). У всех исследуемых генотипов табака доля микромоноспор на фоне стресса снизилась по сравнению с обычными условиями. Большая, чем у стрептомицетов и представителей других родов, чувствительность *Micromonospora* sp. к кислотности почвы нами уже отмечалась ранее (Shirokikh *et al.*, 2002, 2004).

При выращивании табака в обычных условиях актинобиота в ризосфере исходного сорта и линий трансформантов различалась незначительно. На фоне стресса изменения в частоте встречаемости представителей отдельных таксонов зависели от генотипа растений. В минимальной степени стресс отразился на структуре актиномицетного комплекса линии CodA7, не экспрессирующей бактериальный ген холиноксидазы. В ризосфере исходного сорта и линии CodA17 реакция на стресс была более выраженной и заключалась в изменении относительного обилия, главным образом, микромоноспор и стрептовертициллов (табл. 1). Долевой вклад актиномицетов, объединенных в группу олигоспоровых, увеличивался в ризосфере трансформантов (1.58–2.28%) по срав-

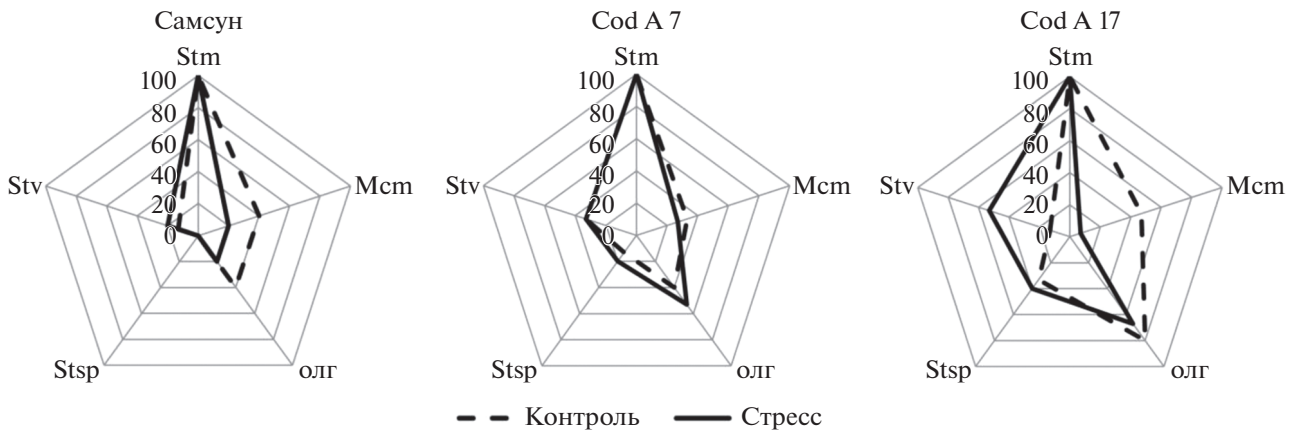


Рис. 3. Частота встречаемости (%) в ризосферных комплексах табака различных родов актиномицетов: Stm – *Streptomyces*, Mcm – *Micromonospora*, Stv – *Streptoverticillium*, Stsp – *Streptosporangium*; олг – олигоспоровые формы.

нению с ризосферным комплексом исходного сорта (0.76–0.82%). Актиномицеты рода *Streptosporangium*, не обнаруженные в ризосфере исходного сорта, на корнях трансформантов были представлены в качестве минорного компонента, наряду с видами рода *Streptoverticillium*. Существенного влияния на варьирование их долевого вклада ни генотип растения, ни почвенный фон не оказали.

Далее ризосферные комплексы табака Самсун и его трансгенных линий CodA7 и CodA17 сравнивали по видовому составу рода *Streptomyces*. При микроскопии его представители имели типичные морфологические признаки: нефрагментированный субстратный и воздушный мицелий, длинные цепочки спор на воздушном и отсутствие спор на субстратном мицелии. Выборочный анализ фрагментов гена 16S рРНК у изолятов с данным морфотипом подтвердил, что выделенные культуры являются представителями рода *Streptomyces*, семейства *Streptomycetaceae*, порядка *Streptomycetales*, класса *Actinobacteria*. Однако для видовой идентификации культур одной последовательности по локусу гена 16S рРНК, оказалось недостаточно, поскольку все нуклеотидные фрагменты, выданные BLAST для исследуемых штаммов, более чем на 98% соответствовали введенным последовательностям. Очевидно, для идентификации штаммов *Streptomyces* на видовом уровне в большинстве случаев необходим мультилокусный анализ, ценность которого была продемонстрирована в нескольких недавно опубликованных работах (Labeda, 2016; Labeda *et al.*, 2017). В связи с этим, помимо генетических данных, учитывали такие фенотипические признаки изолятов, как цвет воздушного и субстратного мицелия при посеве на среду КГА. Это позволило в стрептомицетных комплексах табака определить доленое участие представителей отдельных цветковых секций и серий (Гаузе и др., 1983).

У исходного сорта комплекс стрептомицетов включал виды пяти секций и серий, как в обычных условиях, так и при стрессе (рис. 4). В контроле доминировали виды серии *Cinereus Violaceus* (50.9%), а при стрессе – *Cinereus Achromogenes* (47.5%). В ризосфере растений-трансформантов количество цветковых секций и серий, по сравнению с исходным сортом, практически не изменилось. Незначительные отличия касались в основном долевого участия в комплексе видов минорных секций и серий *Imperfectus* и *Helvolo-Flavus Helvolus*. Доминировали на обоих почвенных фонах в ризосфере линии CodA7 виды серии *Cinereus Violaceus* (37 и 67%), тогда как в ризосфере линии CodA17 – виды серии *Cinereus Achromogenes* (49%) в контроле и виды серии *Cinereus Violaceus* (30%) – при стрессе. Таким образом, разница между исходным сортом и линиями трансформантов по таксономическому составу актинобиоты не имела принципиального характера и, скорее всего, была обусловлена случайными факторами.

Табак Самсун и трансгенные линии CodA7 и CodA17 сравнивали также по функциональной структуре комплексов стрептомицетов в их ризосфере. При лабораторном тестировании на способность разлагать целлюлозу практически все изоляты, в той или иной степени, проявили способность к деструкции КМЦ в тесте с конго красным и, в соответствии с величиной зон деструкции КМЦ, были разделены на три группы: со слабой (тест-зона разложения КМЦ не более 30 мм), умеренной (тест-зона изменяется от 31 до 40 мм) и сильной (тест-зона более 40 мм) целлюлазной активностью. Соотношение долей изолятов, отнесенных к каждой из выделенных групп в ризосфере исходного сорта Самсун и линий трансформантов было различным, но средние значения зоны деструкции КМЦ изменялись в зависимости от генотипа растений и почвенного фона незначительно – в пределах от 34.1 ± 18.50 до 46.8 ± 12.33 мм (табл. 2).

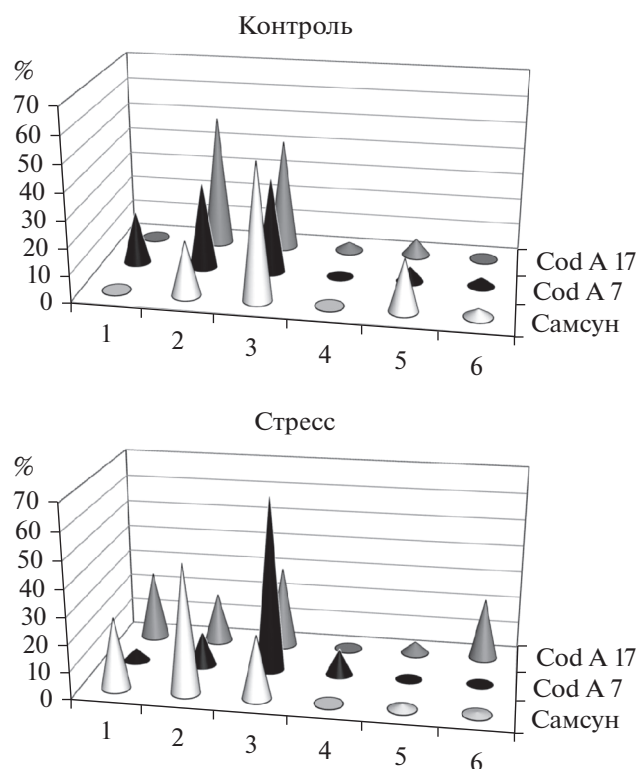


Рис. 4. Долевое участие в ризосферных комплексах табака видов стрептомицетов из секций и серий: 1 – *Cinereus Chromogenes*, 2 – *Cinereus Achromogenes*, 3 – *Cinereus Violaceus*, 4 – *Helvolo-Flavus Helvolus*, 5 – *Albus Albus*, 6 – *Imperfectus*.

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа показали, что варьирование данного показателя достоверно определялось взаимодействием факторов А × В ($F = 3.87, p > 0.0271$), но сами по себе ни почвенный фон (фактор А), ни генотип табака (фактор В) не оказали на него значимого влияния (табл. 3).

При тестировании антифунгальной активности ни один штамм среди выделенных из ризосферы

исходного сорта, выращенного в обычных условиях, не ограничивал рост фитопатогенных тест-грибов *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *F. avenaceum* и *Alternaria* sp. В выборке культур, изолированных из ризосферы исходных растений, выращенных при стрессе, с равной частотой (22%), встречались антагонисты тест-культур *Alternaria* sp., *F. oxysporum* и *F. culmorum* (табл. 4). В комплексе стрептомицетов, изолированных из ризосферы линии CodA7, виды-антагонисты встречались как на обычном (20–30%), так и на стрессовом почвенном фоне (30–50%). Стрептомицетный комплекс линии CodA17 по встречаемости антифунгально активных штаммов (10–30% в зависимости от почвенного фона и тест-культуры гриба) занимал промежуточное положение между комплексами исходного сорта и линии CodA7. Результаты обработки полученных данных методом двухфакторного дисперсионного анализа показали, что на частоту встречаемости в ризосфере табака антагонистов гриба *F. culmorum* достоверное влияние оказали оба фактора – генотип растения ($F = 4.99, p > 0.0321$) и фон почвы ($F = 4.92, p > 0.0332$), как и на встречаемость антагонистов гриба *Alternaria* sp. ($F = 5.2, p > 0.0288$) и ($F = 4.14, p > 0.0496$) соответственно (табл. 3). Но ни один из исследуемых факторов не оказал достоверного влияния на встречаемость в ризосфере стрептомицетов-антагонистов таких фитопатогенов, как *F. oxysporum* и *F. avenaceum*.

В результате интродукции гена холиноксидазы *codA*, участвующей в биосинтезе ГБ, независимо от функциональной активности гетерологичной вставки, значительных изменений в численности и разнообразии актинобиоты, соотношении представителей отдельных таксонов, ассоциированных с корнями растений-трансформантов, не выявлено. Отсутствие значимых различий, очевидно, объясняется локальным накоплением продукта гетерологичного гена (ГБ) в листьях и отсутствием его

Таблица 2. Показатели целлюлозолитической активности стрептомицетов из ризосферы табака исходного сорта и линий трансформантов

Генотип	Фон почвы	Доля изолятов (%) с целлюлозолитической способностью			Средняя величина тест-зоны деструкции КМЦ, мм
		слабой	умеренной	сильной	
Самсун	Контроль	10	20	70	46.8 ± 12.33
	Стресс	20	50	30	38.1 ± 6.04
CodA7	Контроль	20	30	50	43.7 ± 9.75
	Стресс	0	60	40	34.1 ± 18.50
CodA17	Контроль	0	80	20	39.7 ± 2.67
	Стресс	0	50	50	42.7 ± 3.62

Таблица 3. Дисперсионный анализ влияния фона почвы, генотипа растения и их взаимодействия на встречаемость в ризосфере стрептомицетов с различными функциональными свойствами

Источник варьирования	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Антагонизм к <i>F. culmorum</i>				
Фон почвы (фактор А)	1	253.867	5.01	0.0295
Генотип растения (фактор В)	2	712.954	7.03	0.0020*
Взаимодействие факторов А×В	2	200.597	1.98	0.1484
Антагонизм к <i>Alternaria sp.</i>				
Фон почвы (фактор А)	1	376.697	4.14	0.0496
Генотип растения (фактор В)	1	473.735	5.20	0.0288*
Взаимодействие факторов А×В	1	1.79	116.52	0.5649
Антагонизм к <i>F. oxysporum</i>				
Фон почвы (фактор А)	1	1.6363	0.04	0.8506
Генотип растения (фактор В)	2	112.966	2.47	0.0940
Взаимодействие факторов А×В	2	51.0661	1.12	0.3346
Антагонизм к <i>F. avenaceum</i>				
Фон почвы (фактор А)	1	40.909	2.16	0.1472
Генотип растения (фактор В)	2	41.294	2.18	0.1226
Взаимодействие факторов А×В	2	1310.5	3.71	0.1226
Целлюлозолитическая способность				
Фон почвы (фактор А)	1	22.267	0.20	0.6550
Генотип растения (фактор В)	2	60.293	0.55	0.5821
Взаимодействие факторов А×В	2	426.307	3.87	0.0271*

Примечание. *df* – число степеней свободы, *SS* – сумма квадратов, *F* – критерий Фишера, *p* – уровень значимости; * – влияние на варьирование признака достоверно при данном уровне значимости.

Таблица 4. Структура комплекса стрептомицетов-антагонистов фитопатогенных грибов в ризосфере табака исходного сорта и линий трансформантов

Генотип	Фон почвы	Встречаемость антагонистов к тест-культурам грибов, %				
		<i>F. proliferatum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>Alternaria sp.</i>
Самсун	Контроль	0	0	0	0	0
	Стресс	0	22	22	0	22
CodA7	Контроль	0	30	20	0	30
	Стресс	0	30	50	0	50
CodA17	Контроль	0	10	0	0	30
	Стресс	0	0	0	20	20

влияния на корневую экссудацию растений. При определении в ризосфере табака встречаемости представителей с антифунгальной активностью и целлюлозолитической способностью существенной разницы между трансформированными и исходными растениями также не установлено. Варьирование в соотношении изолятов стрептомицетов с различной функциональной активностью в ризосферных комплексах исходного сорта и генетически модифицированных линий по величине было сопоставимо с варьированием, обусловленным другими факторами, в частности – со

стрессовым воздействием подвижного алюминия в кислой почве.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственных заданий (0767-2019-0090 и 0574-2019-0002) и частично поддержана грантом РФФИ (19-016-00207_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешикова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актино-

- мицетов. Роды *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Chainia*. М.: Наука, 1983. 248 с.
- Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Наука, 2004. 528 с.
- Кочетов А.В., Шумный В.К. Трансгенные растения как генетические модели для изучения функций генов растений // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2016. Т. 20. № 4. С. 476–481.
- Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. / Под ред. Хоулта Дж., Крига Н., Снита П., Стейли Дж., Уилльямса С. М.: Мир, 1997. Т. 2. 800 с.
- Agarwal P.K., Jha B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling // *Biologia Plantarum*. 2010. V. 54. P. 201–212.
- Bhatti A.A., Haq S., Bhat R.A. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health // *Microbial Pathogen*. 2017. V. 111. P. 458–467.
- Brookes G., Barfoot P. GM crops: global socio-economic and environmental impacts 1996–2015 // UK: PG economics LTD, 2017. 201 p.
- de Jesus Sousa J.A., Olivares F.L. Plant growth promotion by streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications // *Chem. Biol. Technol. Agriculture*. 2016. V. 3. № 1. P. 24.
- Kremer R.J., Means N.E. Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms // *Eur. J. Agronomy*. 2009. V. 31. № 3. P. 153–161.
- Labeda D.P. Taxonomic evaluation of putative *Streptomyces scabiei* strains held in the ARS Culture Collection (NRRL) using multi-locus sequence analysis // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2016. V. 109. № 3. P. 349–356.
- Labeda D.P., Dunlap C.A., Rong X., Huang Y., Doroghazi J.R., Ju K.S., Metcalf W.W. Phylogenetic relationships in the family *Streptomycetaceae* using multi-locus sequence analysis // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2017. V. 110. № 4. P. 563–583.
- Ladics G.S., Bartholomaeus A., Bregitzer P., Doerrer N.G., Gray A., Holzhauser T., Parrott W. Genetic basis and detection of unintended effects in genetically modified crop plants // *Transgenic Res*. 2015. V. 24. № 4. P. 587–603.
- Li Z., Cui J., Mi Z., Tian D., Wang J., Ma Z., Niu S. Responses of soil enzymatic activities to transgenic *Bacillus thuringiensis* (Bt) crops—A global meta-analysis // *Scie. Total Envir*. 2019. V. 651. P. 1830–1838.
- Meriles J.M., Vargas Gil, S., Haro R. J., March G.J., Guzman C.A. Glyphosate and previous crop residue effect on deleterious and beneficial soil-borne fungi from a peanut–corn–soybean rotations // *J. Phytopath*. 2006. V. 154. № 5. P. 309–316.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant*. 1962. V. 15. P. 473–497.
- Oguchi T., Kashimura Y., Mimura M., Yu X., Matsunaga E., Nanto K., Shimada T., Kikuchi A., Watanabe K.N. A multi-year assessment of the environmental impact of transgenic *Eucalyptus* trees harboring a bacterial *choline oxidase* gene on biomass, precinct vegetation and the microbial community // *Transgenic Res*. 2014. V. 23. P. 767–777.
- Prasad K.V.S.K., Sharmila P., Kumar P.A., Saradhi P.P. Transformation of *Brassica juncea* (L.) Czern with bacterial *codA* gene enhances its tolerance to salt stress // *Mol. Breeding*. 2000. V. 6. P. 489–499.
- Sakamoto A., Murata N. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance // *J. Experim. Botany*. 2000. V. 51. № 342. P. 81–88.
- Shirokikh I.G., Shirokikh A.A., Merzaeva O.V., Tumasova M.I. Actinomycetes in the Rhizosphere of red clover on a Soddy-Podzolic soil // *Eur. Soil Science*. 2004. V. 37. № 7. P. 762–768.
- Shirokikh I.G., Zenova G.M., Zvyagintsev D.G. Actinomycetes in the rhizosphere of barley grown on acid soddy podzolic soil // *Microbiology*. 2002. V. 71. № 4. P. 455–459.
- Singh A.K., Dubey S.K. Current trends in Bt crops and their fate on associated microbial community dynamics: a review // *Protoplasma*. 2016. V. 253. № 3. P. 663–681.
- Teather R.M., Wood P.J. Use of congo-red polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria the bovine rumen // *Appl. Environ Microbiol*. 1982. V. 43. P. 777–780.
- Tran N.-H.T., Oguchi T., Matsunaga E., Kawaoka A., Watanabe K.N., Kikuchi A. Environmental risk assessment of impacts of transgenic *Eucalyptus camaldulensis* events highly expressing bacterial *choline oxidase A* gene // *Plant Biotechnology*. 2018. V. 35. P. 393–397.
- Turrini A., Sbrana C., Giovannetti M. Belowground environmental effects of transgenic crops: a soil microbial perspective // *Res. Microbiol*. 2015. V. 166. № 3. P. 121–131.
- Viaene T., Langendries S., Beirinckx S., Maes M., Goormachtig S. *Streptomyces* as a plant's best friend? // *FEMS Microbiol. Ecology*. 2016. V. 92. № 8. P. 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw119>
- Vurukonda S.S.K.P., Giovanardi D., Stefani E. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes // *Intern. J. Mol. Scie*. 2018. V. 19. № 4. P. 952.
- You L., Song Q., Wu Y., Li S., Jiang C., Chang L., Zhang J. Accumulation of glycine betaine in transplastomic potato plants expressing choline oxidase confers improved drought tolerance // *Planta*. 2019. V. 249. № 6. P. 1963–1975.
- Zablotowicz R.M.; Reddy K.N. Nitrogenase activity, nitrogen content, and yield responses to glyphosate in glyphosate-resistant soybean // *Crop. Protection*. 2007. V. 26. P. 370–376.
- Zhang Y.J., Xie M., Peng D.L. Effects of the transgenic CryIaC and CpTI insect-resistant cotton SGK321 on rhizosphere soil microorganism populations in northern China // *Plant, Soil Environment*. 2014. V. 60. № 6. P. 285–289.

Analysis of Actinobiota in the Tobacco Rhizosphere with Heterologous Choline Oxidase Gene from *Arthrobacter globiformis*

I. G. Shirokikh^{1, 2, #}, Ya. I. Nasarova¹, G. N. Raldugina³, A. A. Gulevich⁴, and E. N. Baranova⁴

¹Federal Agricultural Research Center of the North-East named N.V. Rudnickiy, ul. Lenina, 166a, Kirov, 610007 Russia

²Vyatka State University, ul. Moskovskaya, 36, Kirov, 610000 Russia

³Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences named K.A. Timiryazev, ul. Botanicheskaya, 35, Moscow, 127276 Russia

⁴All-Russia research institute of agricultural biotechnology, ul. Timiryazevskaya, 42, Moscow, 127550 Russia

[#]e-mail: irgenal@mail.ru

Plants *Nicotiana tabacum* L. with the choline oxidase gene (cod A) responsible for the synthesis of glycine-betaine by agrobacterial transformation were obtained. In order to identify possible environmental consequences during the cultivation of transformants, microbial complexes in the rhizosphere were studied. Soil actinomycetes were used as a bioindication group of microorganisms. The abundance, taxonomic composition, and functional structure of the rhizosphere complexes of the original Samsun variety and independent transgenic lines CodA7 and CodA17 with different *codA* gene expression were compared. There were no significant differences in the taxonomic structure, the occurrence of phytopathogenic fungal antagonists and cellulolytic agents in the rhizosphere of the original plants and transformants. The structure of actinomycete complexes of transformants was characterized by variability comparable in magnitude with variability due to the stress effect of the soil background.

Keywords: transgenic crops, soil, actinomycetes, *Streptomyces*, frequency of occurrence, antagonists, cellulolytics