

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 631.46:579.873

Актинобиота ризосферы трансгенных растений табака с повышенной солеустойчивостью**И.Г. Широких* , Я.И. Назарова ***Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого,
Россия, 610007, г. Киров, ул. Ленина, д. 166а***e-mail: irgenal@mail.ru*

Оценка безопасности генетически модифицированных растений для почвенного микробного сообщества и окружающей среды в целом – одна из серьезных проблем сегодняшнего дня в связи с постоянно увеличивающимся разнообразием генов, вовлекаемых в конструирование генотипов сельскохозяйственных культур, устойчивых к эдафическим стрессам. В качестве модели в работе использовали растения табака (*Nicotiana tabacum* L.) с геном холиноксидазы (*codA*) из *Arthrobacter globiformis*, отвечающим за синтез ГБ – совместимого осмолита, способствующего стабилизации клеток при солевом стрессе. Растения исходного сорта Самсун и трансгенной линии CodA 38 выращивали в горшечной культуре на обычном почвенном фоне и в условиях солевого стресса, вызванного 150 мМ NaCl. Сравнивали численность, разнообразие и структуру комплексов актиномицетов на родовом и видовом (род *Streptomyces*) уровне, используя непараметрический ранговый метод статистического анализа. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии значимых ($p=0,95$) изменений в численности и таксономической структуре актинобиоты, распространении стрептомицетов-антагонистов фитопатогенных грибов и бактерий, стрептомицетов-целлюлозолитиков в ризосфере растений-трансформантов с усиленной генно-инженерным путем устойчивостью к солевому стрессу. Сделано заключение о необходимости продолжения исследований специфических ответов со стороны почвенных и ризосферных микроорганизмов на различные категории генетически модифицированных растений.

Ключевые слова: засоление почвы, растение-трансформант, ген холиноксидазы, *Streptomyces*, антагонисты, целлюлозолитики

Засоление почв охватывает около 10% поверхности континентов и является серьезной проблемой из-за неблагоприятного воздействия на продуктивность и устойчивость сельского хозяйства. Скопление значительного количества сульфатов, хлоридов, карбонатов в почвенных слоях, доступных для проникновения корневой системы, угнетает рост и жизнеспособность растений. Засолению подвержены почвы разного генезиса и свойств, в любых климатических условиях, поскольку это процесс динамический и является результатом действия как природных, так и антропогенных факторов. Наиболее характерно это явление для аридной климатической зоны, с земледелием на орошаемых почвах. По некоторым оценкам около 20% (45 млн га) орошаемых земель, на которых производится треть мирового продовольствия, подвержены воздействию соли [1]. Объем сельскохозяйственных земель в мире, ежегодно уничтожаемых накоплением соли, оценивается в 10 млн га [2]. По прогнозам, подверженные засолению площади будут неизбежно возрастать из-за связанного с изменением климата

повышения уровня мирового океана (воздействие на прибрежные районы) и среднегодовых показателей температуры (увеличение объемов испарения) [3, 4].

С увеличением площади засоленных территорий связана актуальность создания солеустойчивых растений. Применение генно-инженерных технологий рассматривают сегодня как одну из действенных стратегий усиления устойчивости сельскохозяйственных культур к солевому стрессу [5, 6]. Одной из основных систем защиты от повышенной концентрации солей в среде, как у бактерий, так и у растений, является накопление в клетках осмопротекторных соединений – осмолитов. К числу эффективных осмолитов относят глицинбетаин (ГБ), источником которого служит холин [7]. Рядом авторов было показано, что суперэкспрессия гена холиноксидазы (*codA*) из типичной почвенной бактерии *Arthrobacter globiformis* в трансгенных растениях приводит к усилению устойчивости к соли в связи с накоплением в тканях ГБ [8–10]. Вместе с тем, генно-инженерное вмешательство в геном растения чревато такими

перестройками метаболизма, которые могут сказаться на его взаимодействии с почвенными микроорганизмами [11]. В связи с этим необходима оценка экологической безопасности для почвенного микробиома трансгенных растений с усиленной солеустойчивостью.

Почвенные актиномицеты синтезируют широкий спектр физиологически активных соединений (антибиотики, фитогормоны, сидерофоры, витамины и т.д.), что позволяет им эффективно взаимодействовать с растением, а также контролировать численность фитопатогенных микроорганизмов [12, 13]. По сравнению с другими группами почвенных микроорганизмов, среди актиномицетов наиболее велика доля стимуляторов роста растений (Plant Growth-Promoting Bacteria, PGPB) [14]. Благодаря продукции экзогидролаз, актиномицеты утилизируют в почвах разнообразные растительные полимеры, обеспечивают растениям благоприятные условия существования, играют ведущую роль в регуляции почвенного гомеостаза и реализации почвой своих экологических функций [12]. В связи с этим актиномицеты представляют очевидный интерес в качестве модельной биоиндикационной группы микроорганизмов.

Целью работы стало изучение влияния растений-трансформантов по гену синтеза ГБ (*codA*) на актиномицетный комплекс в ризосфере табака, выращенного в обычных эдафических условиях и при солевом стрессе.

Материалы и методы

В работе использовали табак обыкновенный (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Самсун и полученную на его основе генетически модифицированную линию *CodA* 38. Пробиорочные растения с молекулярно подтвержденной экспрессией гена *codA* из *A. globiformis* были любезно предоставлены Г.Н. Ралдугиной (Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева, Россия). Растения микроклонально размножили на среде Мурасиге-Скуга без добавления гормонов и витаминов [15]. При достижении возраста 6 нед. (хорошо сформированная корневая система) растения высаживали по одному в вегетационные сосуды (1 л), заполненные универсальным почвогрунтом (Гера, Keva Bioterra, Россия) со следующими характеристиками: $C_{\text{общ}}$ – 4,8%; P_2O_5 – 130,43 мг-экв/100 г; K_2O – 213,47 мг-экв/100 г; Ca – 20,3 мг-экв/100 г; Mg – 5,4 мг-экв/100 г; $pH_{\text{сол}}$ 7,6.

Растения выращивали на двух эдафических фонах: 0 – контроль; NaCl – солевой стресс, вызванный проливом воздушно-сухого почвогрунта 150 мМ раствором NaCl в объеме, рассчитанном на полную влагоемкость ($54 \pm 1,5\%$) субстрата, которую определяли согласно ранее опубликованной методике [16]. В контроле для пролива использовали в том же объеме воду, очищенную

фильтрованием через бытовой фильтр Аквафор. При выборе солевой нагрузки на почву руководствовались данными работы Цяо и соавт. [17]. На том и другом фоне сравниваемые генотипы были представлены шестью клонами каждый.

Растения в возрасте 10 нед. извлекали из сосудов, освобождали интенсивным отряхиванием корневую систему от почвы и объединяли по вариантам. Из каждого объединенного образца отбирали по две навески (2 г) корней с почвой, оставшейся после отряхивания (ризосфера). Отдельно анализировали исходный почвогрунт, свободный от корней. Все образцы перед посевом прогревали в течение 1 ч при 100 °С для ограничения роста немиецелиальных бактерий, гомогенизировали в ступке и готовили серию разведений для посева. Выделяли и выявляли структуру комплексов актиномицетов на агаре с пропионатом натрия (г/л): KH_2PO_4 – 0,5, Na_2HPO_4 – 0,7, KNO_3 – 0,1, NaCl – 0,3, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,1, $CaCO_3$ – 0,02, $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,0002, $MnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,00002, $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,00018, пропионат натрия – 0,2, агар – 20; стрептомицетов – на казеин-глицериновом агаре (КГА) (г/л): гидролизат казеина с дрожжевым экстрактом – 0,3; глицерин – 10 мл; KNO_3 – 2; K_2HPO_4 – 2; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,05; $FeSO_4 \times H_2O$ – 0,01; $CaCO_3$ – 0,02; NaCl – 2; агар – 20. Колонии учитывали дифференцированно по морфологическим типам. Доминирующие на чашках 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 [18] и, выборочно, результаты анализа фрагмента 16S рРНК. Первичный сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей и последовательностей 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 антагонистические свойства и целлюлозолитическую активность [19] выделенных культур. Характеризуя структуру ризосферных комплексов актиномицетов, использовали показатели долевого участия и частоты встречаемости таксона, а также относительное обилие в комплексе стрептомицетов – антагонистов и целлюлозолитиков (%).

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами непараметрического и рангового анализа (U-критерий Манна-Уитни). Подсчет средних значений и стандартных отклонений выполняли в программе Microsoft Excel. Попарное сравнение независимых выборок осуществляли с помощью программы PAST Version 4.06.

Результаты и обсуждение

Доля актиномицетов в прокариотном комплексе ризосферы, в зависимости от генотипа табака и почвенного фона, изменялась от 1,6 до 6,0%, тогда как в почве, лишенной корней, составляла 3,78% (табл. 1). У растений-трансформантов показатели долевого участия актиномицетов в прокариотном комплексе были в 2,8–3,5 раза выше, чем у растений исходного сорта. В условиях солевого стресса доля мицелиальных прокариот от общего количества бактерий была выше, чем у растений, выращенных в обычных условиях. В ответ на засоление показатель в большей степени увеличивался у растений исходного сорта (на 0,52%), чем в ризосфере трансформантов (на 0,37%).

Таксономическое разнообразие актинобиоты, оцениваемое с помощью индексов Шеннона, в ризосфере трансформантов было ниже ($H = 0,6–0,8$), чем у исходного сорта и во внекорневой почве ($H = 1,1 \pm 0,18$). Наиболее значительно снизился индекс разнообразия в ризосфере линии CodA 38, выращенной в условиях солевого стресса.

Сравнение исходного сорта и трансгенной линии CodA 38 по таксономической структуре ризосферного комплекса, выявляемого на среде с пропионатом натрия, показало, что на корнях табака в различном соотношении и с различной частотой встречались представители родов *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Streptoverticillium* и олигоспоровые формы актиномицетов. По показателю относительного обилия в ризосфере доминировали стрептомицеты (от 53,9 до 91,5%), тогда как во внекорневой почве – микромоноспоры (от 40,9 до 73,0%). В ризосфере исходных растений микромоноспоры входили, наряду со стрептомицетами, в число доминирующих родов, а в ризосфере трансформантов – нет. Помимо микромоноспор, в актиномицетном комплексе линии CodA 38 значительно ниже, чем

у исходного сорта, были показатели относительного обилия олигоспоровых форм и стрептоспорангиумов.

Существенных перестроек под влиянием солевого стресса у сравниваемых генотипов табака в таксономической структуре ризосферной актинобиоты на уровне родов не выявлено. Вместе с тем, на корнях растений, выращенных на разных почвенных фонах, были отмечены различия в видовой структуре рода *Streptomyces*. К роду *Streptomyces* относили культуры, при микроскопии которых обнаруживали типичные морфологические признаки: нефрагментированный субстратный и воздушный мицелий, длинные цепочки спор на воздушном мицелии и отсутствие спор на субстратном мицелии. Выборочный анализ фрагментов гена 16S рРНК у изолятов данного морфотипа подтвердил, что выделенные культуры являются представителями рода *Streptomyces* семейства Streptomycetaceae порядка Streptomycetales класса Actinobacteria. Однако видовая идентификация культур на основе сиквенсов фрагмента гена 16s рРНК оказалась невозможной, 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 или даже полногеномный анализ, ценность которых была продемонстрирована в работах последнего времени [20, 21]. В связи с этим, помимо генетических данных, учитывали фенотипические признаки изолятов, такие как цвет воздушного и субстратного мицелия на среде Гаузе 1 [18]. Это позволило в ризосферных комплексах стрептомицетов определить доленое участие видов, относимых к отдельным цветовым секциям и сериям.

В ризосфере растений исходного сорта, выращенных в обычных условиях и на фоне засоления, различия в видовой структуре стрептомицетов

Таблица 1

Численность и структура комплексов актиномицетов в зависимости от фона почвы и генотипа растения

Показатель	Ризосфера табака				Почва вне ризосферы
	Самсун		CodA 38		
	0	NaCl	0	NaCl	
Общая численность прокариот, вырастающих на КГА, млн КОЕ/г	16,4 ± 5,52	14,8 ± 1,62	19,0 ± 5,11	13,8 ± 4,61	9,8 ± 3,16
Доля актиномицетов в прокариотном комплексе, %	1,61	2,13	5,63	6,0	3,78
Количество секций и серий рода <i>Streptomyces</i>	6	7	6	6	5
Количество родов, выделяемых на среде с пропионатом натрия	5	5	5	5	5
Индекс Шеннона (H)	1,1 ± 0,19	1,1 ± 0,17	0,8 ± 0,16	0,6 ± 0,19	1,1 ± 0,18
Относительное обилие в комплексе представителей родов, %:					
<i>Streptomyces</i>	53,9–69,7	67,2–68,2	67,7–90,3	80,4–91,5	23,2–54,0
<i>Micromonospora</i>	21,8–35,5	22,6–26,1	7,1–28,2	7,6–17,8	40,9–73,0
Олигоспоровые формы	1,4–8,0	2,3–8,7	0–1,0	0,4–0,9	1,6–3,5
<i>Streptosporangium</i>	1,4–2,6	1,1–1,5	0–1,0	0–0,9	0–3,5
<i>Streptoverticillium</i>	0–5,7	0–2,3	0,6–4,1	0–0,5	0–0,4

были более выраженными, чем в ризосфере растений-трансформантов (рисунок). Стрептомицетный комплекс исходного сорта Самсун включал в обычных условиях виды шести, а в условиях засоления почвы – семи секций и серий. На фоне засоления увеличилось долевое участие в комплексе видов серии *Albus Albus*, а виды серии *Helvolo-Flavus Helvolus* были отмечены как вновь появившиеся. Доминировали в ризосфере сорта

Самсун на том и другом почвенном фоне виды серий *Cinereus Achromogenes* (33–34%) и *Cinereus Chromogenes* (30–36%). В ризосфере трансгенной линии CodA 38 количество цветковых секций и серий, а также состав доминантов практически не изменились по сравнению с исходным сортом, но показатели частоты встречаемости и долевого участия видов-доминантов при этом возросли, что указывает на концентрацию доминирования видов определенных цветковых групп на корнях подвергнутых трансформации растений. Различия между исходным сортом и линией CodA 38 отмечены также в отношении долевого участия в комплексе видов минорных секций и серий *Azureus*, *Imperfectus* и *Cinereus Violaceus*. В ризосфере трансформантов при солевом стрессе, как и в ризосфере исходного сорта, увеличилось по сравнению с обычными почвенными условиями относительное обилие видов серий *Albus Albus* и *Helvolo-Flavus Helvolus*.

Перестройки таксономической структуры актинобиоты, выявленные в ризосфере трансформантов табака, сопоставимы по величине с диапазоном изменчивости, наблюдаемой в ризосфере других культур и сортов, созданных традиционными методами селекции [22]. Следовательно, нет оснований считать, что имеющиеся различия в таксономической структуре актинобиоты связаны с функциональной активностью бактериального гена, встроенного в геном растения.

Ризосферные комплексы табака Самсун и трансгенной линии CodA 38 сравнивали также по функциональной структуре мицелиальных прокариот. Одной из важнейших экологических функций актиномицетов является регуляция численности других групп микроорганизмов в почве и ризосфере растений. Ни один штамм среди почвенных изолятов не обладал антифунгальной активностью при тестировании *in vitro*. Рост фитопатогенных бактерий *Pseudomonas putida* и *Clavibacter michiganensis* ограничивали соответственно 6% и 12% культур, выделенных вне ризосферы (табл. 2). Среди изолятов с корней исходного сорта Самсун, выращенного в обычных условиях, антагонисты грибов *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *Bipolaris sorokiniana* и *Alternaria* sp. встречались с частотой от 5% до 20%, а антагонисты бактерий – с частотой от 5% до 50% в зависимости от тест-культуры.

В выборке стрептомицетов из ризосферы трансгенной линии CodA 38 не выявлено штаммов с антибактериальной активностью, а встречаемость культур с антифунгальным действием в отношении тест-культур *Alternaria* sp., *F. proliferatum* и *Bipolaris sorokiniana* была одинаковой и составила по 22% в каждом случае.

Культуры стрептомицетов, полученные из ризосферы табака в условиях засоленной почвы, тоже проявили антагонистическую активность, но

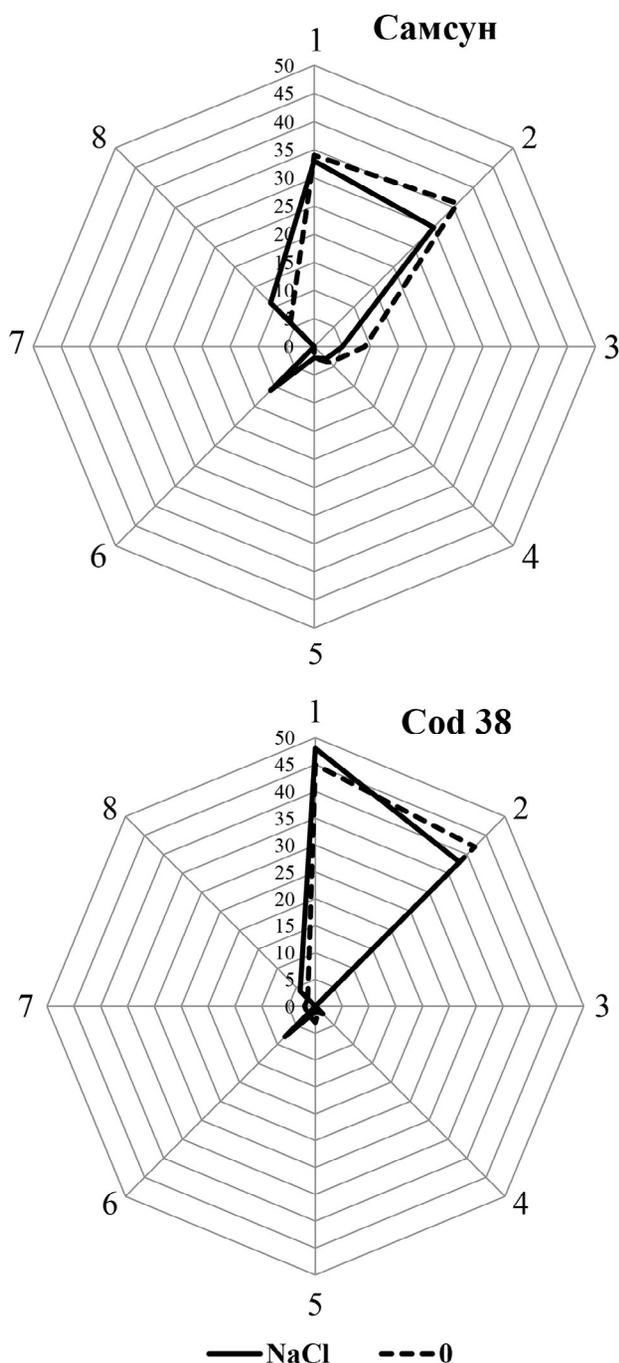


Рисунок. Долевое участие (%) в ризосферных комплексах табака стрептомицетов из секций и серий: 1 – *Cinereus Achromogenes*, 2 – *Cinereus Chromogenes*, 3 – *Cinereus Aureus*, 4 – *Cinereus Violaceus*, 5 – *Imperfectus*, 6 – *Helvolo-Flavus Helvolus*, 7 – *Azureus*, 8 – *Albus Albus*.

набор ингибируемых ими тест-культур грибов и бактерий количественно и качественно отличался от того, который был выявлен при тестировании стрептомицетных изолятов из почвы, не подвергнутой солевому стрессу. Так, в условиях засоления ризосферные изоляты исходного сорта утратили способность ингибировать рост гриба *F. proliferatum*, а также бактерий *Erwinia rhapontici* и *P. putida*. Снизилась частота встречаемости антагонистов *Alternaria* sp. (на 10%) и *C. michiganensis* (на 20%). Среди изолятов из ризосферы трансгенной линии CodA 38, наоборот, на фоне засоления увеличилась доля антагонистов грибов *F. proliferatum* (на 51%), *Alternaria* sp. (на 31%), *F. oxysporum* (на 13%) и фитопатогенной бактерии *C. michiganensis* (на 60%). Но при этом в три раза снизилась частота встречаемости антагонистов гриба *B. sorokiniana* (с 22% до 7%), тогда как в выборке изолятов с корней табака исходного сорта этот показатель, напротив, на фоне засоления увеличился с 10% до 30%.

Оценку достоверности различий в распространении стрептомицетов-антагонистов, наблюдаемых между выборками изолятов из ризосферы растений исходного сорта и трансгенной линии, проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. Результаты обработки полученных данных с помощью рангового метода анализа показали, что найденное фактическое значение $U = 22$ больше критического значения $U_{кр} = 13$ для 5%-го уровня статистической значимости (объемы сравниваемых выборок n_1 и n_2 равны 8). Это позволяет заключить, что различия в рассматриваемых вы-

борках не являются статистически значимыми и носят случайный характер.

Наряду с антагонистическим действием в отношении фитопатогенов актиномицеты участвуют в конвейерной переработке поступающего в почву растительного опада. Важную роль в деструкции наиболее распространенного растительного полимера – клетчатки – играет синтез ферментов целлюлазного комплекса. При лабораторном тестировании ризосферных изолятов на среде с добавлением карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) в качестве единственного источника углерода практически все культуры в той или иной степени проявили способность к утилизации этого полимера. Частота встречаемости стрептомицетов-целлюлозолитиков в ризосфере линии CodA 38 (92%–100%) незначительно отличалась от встречаемости в ризосфере растений исходного сорта (95%–100%) (табл. 3). Однако у трансформантов в обычных условиях доля изолятов с величиной зоны деструкции КМЦ, превышающей 30 мм, была почти вдвое меньше (42%), чем у исходного сорта (80%). В условиях солевого стресса различия между сравниваемыми генотипами растений по этому показателю, а также по средним значениям величины зоны деструкции КМЦ были незначительными, на что указывают расчетные значения примененного U-критерия ($U_{факт.} > U_{кр.}$ при $p = 0,95$).

Таким образом, встройка бактериального гена *codA* в геном табака для повышения его солеустойчивости не вызвала значимых изменений в численности и таксономической структуре ак-

Таблица 2

Распространение стрептомицетов-антагонистов в почве и ризосфере в зависимости от генотипа табака и почвенного фона

Почва	Фон	Частота встречаемости антагонистов фитопатогенов, %							
		<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium culmorum</i> P-3/16	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Alternaria</i> sp. Я19/3	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Erwinia rhapontici</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>
Вне ризосферы	0	0	0	0	0	0	0	6	12
Из ризосферы табака Самсун	0	20	15	5	20	10	5	5	50
	NaCl	20	15	0	10	30	0	0	30
Из ризосферы табака CodA 38	0	0	0	22	22	22	0	0	0
	NaCl	13	0	73	53	7	0	0	60

Таблица 3

Характеристика способности изолятов стрептомицетов к разложению целлюлозы в зависимости от генотипа табака и почвенного фона

Параметр	Ризосфера табака				Почва вне ризосферы
	Самсун		CodA 38		
	0	NaCl	0	NaCl	
Частота встречаемости целлюлозолитиков, %	95	100	92	100	94
Доля изолятов с зоной деструкции КМЦ ≥ 30 мм, %	80	45	42	53	38
Величина зоны деструкции КМЦ в среднем, мм	$30,7 \pm 8,1$	$28,7 \pm 7,0$	$25,8 \pm 10,8$	$29,9 \pm 4,8$	$22,9 \pm 10,0$

Примечание: КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза

тинобиоты, ассоциированной с корнями растений-трансформантов, за исключением снижения родового разнообразия, измеренного с помощью индекса Шеннона, и концентрации доминирования в стрептомицетном комплексе видов серий *Cinereus Achromogenes* и *Cinereus Chromogenes*.

Трансформация табака по гену холиноксидазы не сопровождалась изменением функциональной структуры выделенного из ризосферы комплекса стрептомицетов. Различия в соотношении изолятов с антимикробной и целлюлозолитической активностью в ризосфере исходного сорта и трансгенной линии имели случайный характер, о чем свидетельствуют результаты обработки данных непараметрическим методом статистического анализа.

В литературе были описаны случаи, когда экспрессия в растениях гетерологичных генов влекла за собой перестройки ризосферных микробных сообществ, существенные для экологического состояния почвы. В частности, негативные тенденции были связаны с интродукцией в геном растений гена *4 epsps* – енолпирувилшикиматфосфат-синтетазы из *Agrobacterium* sp. CP4 – для придания устойчивости к гербициду раундап [23] и гена *cryIAb* – дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* – для защиты от насекомых-вредителей [24]. Авторы полагают, что установленное влияние растений-трансформантов на почвенное микробное сообщество обусловлено, прежде всего, корневой экскрецией в ризосферу новых трансгенных белков. Отсутствие видимых эффектов трансгена *codA*, в отличие от случаев, описанных в литературе, может быть объяснено локальным накоплением нового трансгенного продукта – ГБ – в надземной части растений. Встроенная в наш случай генетическая

конструкция была снабжена сигнальной последовательностью, отвечающей за доставку белкового продукта внутрь пластидного компартмента [25].

В генной инженерии растений, устойчивых к солевому и другим эдафическим стрессам, в настоящее время используется довольно значительное количество разнообразных генов, вовлекаемых в пути передачи сигнала, регуляции экспрессии, а также генов, кодирующих ферменты синтеза функциональных и структурных соединений с протекторным действием [5, 6]. Потенциал их воздействия на окружающую среду и, в первую очередь, на почву может варьировать в зависимости от конкретного вида и экологических условий выращивания растений, а также от техники трансформации и встраиваемой генетической конструкции. Поэтому исследования, направленные на выяснение того, существуют ли специфические ответы со стороны почвенных и ризосферных микроорганизмов на различные категории генетически модифицированных растений, разработанных на сегодняшний день, продолжают сохранять свою актуальность. Своевременная диагностика негативных тенденций позволит сохранить природный гомеостаз почвенного микробного сообщества, необходимый для оптимального круговорота питательных веществ, подавления фитопатогенов, стимуляции роста растений и поддержания в норме экологического состояния почвы и окружающей среды.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №19-016-00207_а). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Machado R.M.A., Serralheiro R.P. Soil salinity: effect on vegetable crop growth. Management practices to prevent and mitigate soil salinization // Horticulturae. 2017. Vol. 3. N 2: 30.
2. Pimentel D., Berger B., Filiberto D., Newton M., Wolfe B., Karabinakis E., Clark S., Poon E., Abbett E., Nandaopal S. Water resources: Agricultural and environmental issues // BioScience. 2004. Vol. 54. N 10. P. 909–918.
3. Singh A. Soil salinization management for sustainable development: A review // J. Environ. Manage. 2021. Vol. 277: 111383.
4. Butcher K., Wick A.F., DeSutter T., Chatterjee A., Harmon J. Soil salinity: a threat to global food security // J. Agron. 2016. Vol. 108. N 6. P. 2189–2200.
5. Kolodyazhnaya Y.S., Kutsokon N.K., Levenko B.A., Syutikova O.S., Rakhmetov D.B., Kochetov A.V. Transgenic plants tolerant to abiotic stresses // Cytol. Genet. 2009. Vol. 43. N 2. P. 132–149.
6. Reguera M., Peleg Z., Blumwald E. Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops // Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech. 2012. Vol. 1819. N 2. P. 186–194.
7. Negrão S., Schmöckel S.M., Tester M. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress // Ann. Bot. 2017. Vol. 119. N 1. P. 1–11.
8. Liang C., Zhang X.Y., Luo Y., Wang G.P., Zou Q., Wang W. Overaccumulation of glycine betaine alleviates the negative effects of salt stress in wheat // Russ. J. Plant Physiol. 2009. Vol. 56. N 3. P. 370–376.
9. Goel D., Singh A.K., Yadav V., Babbar S.B., Murata N., Bansal K.C. Transformation of tomato with a bacterial *codA* gene enhances tolerance to salt and water stresses // Russ. J. Plant Physiol. 2011. Vol. 168. N 11. P. 1286–1294.
10. Tran N.H.T., Oguchi T., Matsunaga E., Kawaoka A., Watanabe K.N., Kikuchi A. Transcriptional enhancement of a bacterial choline oxidase A gene by an

HSP terminator improves the glycine betaine production and salinity stress tolerance of *Eucalyptus camaldulensis* trees // Plant Biotechnol. (Tokyo). 2018. Vol. 35. N 3. P. 215–224.

11. Ladics G.S., Bartholomaeus A., Bregitzer P., Doerr N.G., Gray A., Holzhauser T., Parrott W. Genetic basis and detection of unintended effects in genetically modified crop plants // Transgenic Res. 2015. Vol. 24. N 4. P. 587–603.

12. Shrivastava P., Kumar R. Actinobacteria: Eco-friendly candidates for control of plant diseases in a sustainable manner // New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. Actinobacteria: Diversity and biotechnological applications / Eds. B.P. Singh, V.K. Gupta, and A.K. Passari. Elsevier, 2018. P. 79–91.

13. Vurukonda S.S.K.P., Giovanardi D., Stefani E. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes // Int. J. Mol. Sci. 2018. Vol. 19. N 4: 952.

14. Hamed J., Mohammadipناه F. Biotechnological application and taxonomical distribution of plant growth promoting actinobacteria // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2015. Vol. 42. N 2. P. 157–171.

15. Murachige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. N 3. P. 473–497.

16. Кауричев И.С., Ганжара Н.Ф., Гречин И.П. Практикум по почвоведению. М.: Колос, 1980. 298 с.

17. Qiao G., Lin S., Xie L., Zhuo R. Over-expression of the *codA* gene by Rd29A promoter improves salt tolerance in *Nicotiana tabacum* // Pak. J. Bot. 2013. Vol. 45. N 3. P. 821–827.

18. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. Роды *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Chainia*. М.: Наука, 1983. 248 с.

19. Teather R.M., Wood P.J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen // Appl. Environ. Microbiol. 1982. Vol. 43. N 4. P. 777–780.

20. Labeled 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. Vol. 110. N 4. P. 563–583.

21. Subramaniam G., Thakur V., Saxena R.K., Vadlamudi S., Purohit S., Kumar V., Varshney R.K. Complete genome sequence of sixteen plant growth promoting *Streptomyces* strains // Sci. Rep. 2020. Vol. 10. N 1: 10294.

22. Shirokikh I.G., Zenova G.M., Merzaeva O.V., Lapygina E. V., Batalova G.A., Lysak L.V. Actinomycetes in the prokaryotic complex of the rhizosphere of oats in a soddy-podzolic soil // Eurasian Soil Sci. 2007. Vol. 40. N 2. P. 158–162.

23. Kremer R.J., Means N.E. Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms // Eur. J. Agron. 2009. Vol. 31. N 3. P. 153–161.

24. Conner A.J., Glare T.R., Nap J.P. The release of genetically modified crops into the environment: Part II. Overview of ecological risk assessment // Plant J. 2003. Vol. 33. N. 1. P. 19–46.

25. Гулевич А.А., Куренина Л.В., Баранова Е.Н. Использование системы таргетинга ферментов Fe-зависимой супероксиддисмутазы и холинксидазы в хлоропласт как стратегия эффективной защиты растений от абиотических стрессов // Росс. с.-х. наука. 2018. № 1. С. 7–12.

Поступила в редакцию 22.09.2021

После доработки 05.11.2021

Принята в печать 15.11.2021

RESEARCH ARTICLE

Actinobiota in the rhizosphere of transgenic tobacco plants with increased tolerance to salt stress

I.G. Shirokikh* , Ya.I. Nazarova 

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

*e-mail: irgenal@mail.ru

Assessment of the safety of genetically modified plants for the microbial community of the soil and the environment is important due to the increase in the diversity of genes involved in the creation of genotypes of crops resistant to edaphic stress. Genetically engineered tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) with the ability to synthesis glycinebetaine in chloroplasts was established by introducing the *codA* gene for choline oxidase from soil bacteria *Arthrobacter globiformis*. Synthesis of glycinebetaine helps to stabilize cells under salt stress. Plants wild type (variety Samsun) and the CodA 38 transgenic line were grown in pot culture on a normal soil background and under conditions of salt stress caused by 150 mM NaCl. The abundance, diversity and structure of actinomycete complexes were compared at the generic and species

level (*Streptomyces*) using parametric and rank methods of statistical analysis. The obtained data indicate the absence of significant ($p = 0.95$) changes in the number and taxonomic structure of actinobiota, frequency of occurrence of streptomyces-antagonists of phytopathogenic fungi and bacteria, streptomyces-cellulolytics in the rhizosphere of transformant plants with genetically increased resistance to salt stress. It is concluded that it is necessary to continue research on the specific reactions of soil and rhizosphere microorganisms to various categories of genetically modified plants.

Keywords: *soil salinization, transgenic plants, choline oxidase gene, Streptomyces, antagonists, cellulolytics*

Funding: This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project no. 19-016-00207_a.

Сведения об авторах

Широких Ирина Геннадьевна – докт. биол. наук, зав. лабораторией биотехнологии растений и микроорганизмов Федерального аграрного научного центра Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого. Тел.: 8-3332-33-10-39; e-mail: irgenal@mail.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-3319-2729>

Назарова Янина Иордановна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории биотехнологии растений и микроорганизмов Федерального аграрного научного центра Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого. Тел.: 8-3332-33-10-39. e-mail: yan1997183@yandex.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-2945-5282>