

МОДИФИКАЦИЯ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА
РИЗОСФЕРЫ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА
С ГЕНОМ СИНТЕЗА ГЛИЦИНБЕТАИНАА.А. АНТОНОВ², Е.Н. БАРАНОВА^{1,4}, А.А. ГУЛЕВИЧ¹,
Л.В. КУРЕНИНА¹, А.А. ВАНЬКОВА², Г.Н. РАЛДУГИНА³¹ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАН;² РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева;³ Институт физиологии растений РАН имени К.А. Тимирязева,⁴ Главный Ботанический Сад имени Н.В. Цицина)

*Изменение состава микробиоты почвы в результате выращивания различных сельскохозяйственных культур в агроценозах в настоящее время вызывает повышенный интерес. Изучено влияние корневой системы трансгенных растений томата (*Solanum lycopersicum* L.), выращенных в почвенной культуре, на микробное сообщество ризосферы. Полученные результаты показали, что в результате культивирования трансгенных растений с геном холиноксидазы состав микробного сообщества ризосферы существенно изменился. Выявлено значительное увеличение доли (73%) и видового разнообразия (индекс Шеннона – 2,25) актинобактерий в прикорневой зоне почвы трансгенных по *codA* растений томата по сравнению с контрольными растениями (10 и 0,95% соответственно). Содержание псевдомонад и микромицетов существенно сокращается (25 и 12% у трансгенных растений; 70 и 81% у контрольных растений соответственно). Таким образом, генетически модифицированные растения способны оказывать влияние на структуру микробного сообщества ризосферы.*

Ключевые слова: холиноксидаза, *codA*, томат, ризосфера, микроорганизмы, растительно-микробные взаимодействия.

Введение

Обеспечение растущего населения планеты безопасными, экологически чистыми полноценными продуктами питания, – первоочередная задача современного сельскохозяйственного производства. В качестве одного из перспективных способов ее решения предлагается введение в культуру трансгенных растений. Трансгенный (генно-модифицированный) организм – это организм, в геноме которого присутствует искусственно введенный ген, который не мог быть приобретен естественным образом. Таким образом, генетически модифицированным организмам можно придать новые, хозяйственно ценные свойства и признаки: например, повышение урожайности, увеличение содержания витаминов в плодах, возрастание стрессоустойчивости, усиление токсичности в отношении возбудителей болезней и насекомых-вредителей. Последнее позволяет снизить количество обработок сельскохозяйственных культур химическими средствами защиты растений, что весьма актуально, в частности, для такой ценной и популярной овощной культуры, как томат, которая считается самой «химически нагруженной» (за вегетацию проводится до 20 обработок различными химическими препаратами).

В последнее время активно ведутся исследования, направленные на снижение химической нагрузки на растения, в том числе методами сельскохозяйственной биотехнологии. В то же время при встраивании новых генов организм приобретает совершенно новые свойства. Помимо изменений генотипа, отмечались изменения фенотипа. Модификация морфоанатомической структуры корневой системы с изменением типа ветвления, регуляция роста латеральных и боковых корней, формирование дополнительного пула корневых волосков являются в настоящее время активно развивающейся областью структурной ботаники и физиологии растений [23]. Данный подход предусматривает возможность изменения движения внутренних растворов как в проводящих тканях, так и между различными клетками и тканями, что позволяет воздействовать на транспорт осмотически активных и энергетически ценных веществ (например, сахаров) [11, 21]. В условиях засухи, засоления и действия токсических ионов растворы осмолитов являются ключом, обеспечивающим выживание растения [15]. По этой причине представляется важным понимание влияния одного из осмолитов, эффективного в противодействии падению осмотического давления, – глицинбетаина. Интродуцированный ген холиноксидазы *codA*, отвечающий за синтез этого соединения, может изменить биохимические процессы в растении и, как следствие, повлиять на состав и структуру его корневых экссудатов, которые играют огромную роль в жизни почвенных микроорганизмов, так как являются, в частности, питательным субстратом.

Кроме того, именно благодаря экссудации возможны симбиотические и ассоциативные взаимоотношения между микроорганизмами и растениями. Имеются данные о том, что у трансгенных растений изменяются химический состав и структура корневых выделений, что в свою очередь вызывает изменения и в микробном сообществе прикорневого слоя почвы [2]. Очевидно, что само по себе влияние отдельного гена на выделение сахаров и других экссудатов в зоне роста корней трансгенного растения может быть сравнимо с изменениями в микробиоме у разных сортов или видов растений, так как сложное взаимодействие корневой системы, почвы и микрофлоры определяется взаимовлиянием различных экссудатов растительных тканей, метаболитами микроорганизмов и взаимодействием их с почвой [2].

Целью данного исследования является оценка влияния корневой системы трансгенных растений томата, конститутивно экспрессирующих ген холиноксидазы, на микробное сообщество ризосферы.

Материалы и методы

Растительный материал. В работе использовали растения томата (*Solanum lycopersicum* L.): трансгенные (с внедренным геном фермента холиноксидазы (*codA*) из почвенной бактерии *Arthrobacter globiformis*) и нетрансгенные линии ЯЛФ. Трансгенные растения были получены в ВНИИСБ (г. Москва) посредством агробактериальной трансформации [3]. В качестве экспрессионной плазмиды использовали стандартный вектор pVI, содержащий целевой ген *codA* и маркерный ген NPTII (рис. 1а). Размножение данных растений проводили черенкованием *in vitro* на агаризованной среде МС [20].

Молекулярно-генетический анализ. Для анализа геномной ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали молодые листья зеленых растений томата, выращиваемых в условиях климакамеры. Использовали набор реагентов «ДНК-Экстрен-4» (ЗАО Синтол) согласно инструкции изготовителя. Фрагменты листьев (до 35 мг) предварительно помещали в морозильную камеру (–20°C) на один час. Для амплификации были использованы 2 праймера: CHL-For (5'-ACAACCTGTCATCGCCTTCT-3')

и CHL-Rev (5'-GCATCAACAGCTTCGGCGTAT-3') (ЗАО Синтол). Смесь для амплификации содержала 1 мкл ДНК (20–100 нг); 1 мкл полимеразы Tag-DNA (5000 ед/мл); 4 мкл 10x ПЦР-буфер с MgCl₂; 1,5 мкл смеси dNTPs (2,5 мМ всех нуклеотидов), по 0,5 мкл каждого праймера (0,25 мМ) и 13 мкл деионизированной воды (общей реакционный объем – 20 мкл). Использовали реактивы НПО СибЭнзим. ПЦР проводили по стандартной методике «BIO-RAD» (USA). Температура отжига составляла 60°C. Режим амплификации: денатурация при 95°C в течение 2 мин; далее – 40 циклов с повторами: денатурация при 95°C – 30 сек., отжиг праймеров при 60°C – 45 сек., синтез при 72°C – 2 мин, завершающий цикл – 72°C в течение 5 мин. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1,4%-ном агарозном геле (с добавлением бромистого этидия). Размер полученных фрагментов ДНК определяли визуально, сравнением с шаблонной ДНК (100 bp + 1,5 kb) (НПО «СибЭнзим»).

Условия эксперимента. Клонированные растения трансгенной линии (№ 31) ЯЛФ томата были пересажены для адаптации в сосуды объемом 300 мл, содержащие почвогрунт, составленный из смеси торфа и песка в соотношении 3:1. Растения постепенно были адаптированы к условиям открытой воздушной среды и выращивались при естественном освещении в условиях оранжереи. Были высажены 3 клонированных растения трансгенной линии 31 ЯЛФ томата (3-кратная повторность). В качестве контроля были взяты также 3 клона от исходной нетрансгенной линии ЯЛФ, размноженных в условиях *in vitro*.

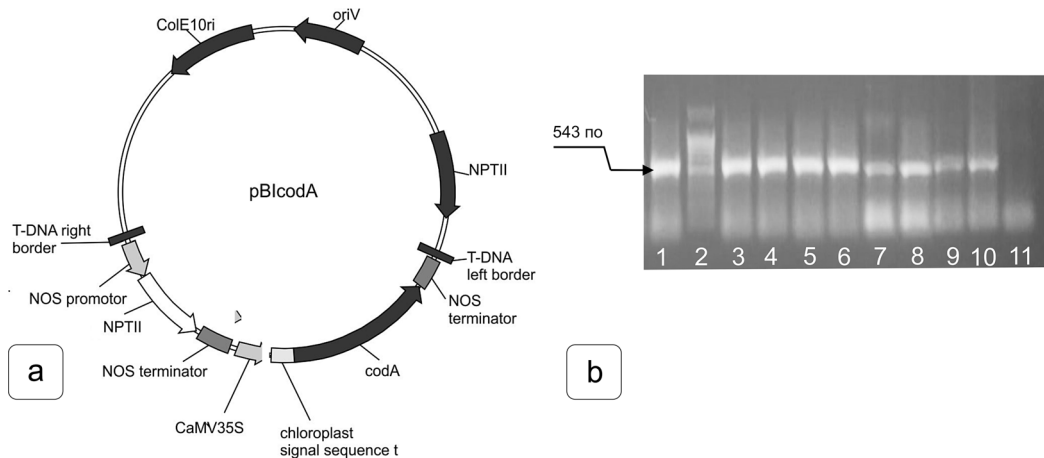


Рис. 1. Схема экспрессионного вектора pBcodA, содержащего маркерный ген NPTII и целевой ген холиноксидазы codA – а.

Электрофореграмма продуктов ПЦР дорожки (слева направо):

- 1 – плазмидная ДНК; 2 – маркер молекулярных весов; 3, 7 – трансгенная линия 13;
- 4, 8 – трансгенная линия 16; 5, 9 – трансгенная линия 22; 6, 10 – трансгенная линия 31;
- 11 – контрольное нетрансформированное растение b

Микробиологический анализ. Через 6 недель из прикорневого слоя растений были отобраны пробы для микробиологического анализа. Изучение численности и состава микробного сообщества проводили традиционным методом посева на питательные среды МПА (мясо-пептонный агар) для выявления культивируемых бактерий сапротрофного комплекса и ПДС (полная дрожжевая среда) – для выявления микромицетов. Для ингибирования роста микромицетов в среду МПА добавляли нистатин (0,25 г/л). Инкубация посевов осуществлялась при 28°C в течение 5 сут. Дифференцированный учет микроорганизмов по группам проводили на основании культуральных особенностей и микроскопии основных типов колоний [4, 5].

Результаты и обсуждение

В результате генетической трансформации после отбора на агаризованной среде MSc добавлением 40 мг/л антибиотика канамицина (Km) были получены 7 независимых линий-трансформантов томата селекционной линии ЯЛФ, обладающих устойчивостью к канамицину. Для молекулярно-генетического анализа были выбраны линии 13, 16, 22 и 31, сохранявшие зеленую окраску при отборе на Km. ПЦР показала наличие гена *codA* в геноме этих линий томата (рис. 1b). Для дальнейших экспериментов была использована трансгенная линия 31 (31 ЯЛФ).

Введение гена не оказывало влияния на процесс регенерации растений из каллуса (рис. 2a). Но у полученных трансформантов (рис. 2d) наблюдали изменение фенотипа по сравнению с контролем (рис. 2b). Трансгенные по *codA* растения имели более выраженную зеленую окраску и уступали по высоте и общему габитусу исходной линии. Можно предположить, что у трансгенных растений была увеличена плотность цитоплазмы ввиду продукции осмотического вещества глицинбетаина (рис. 2b, c, d, e). Подобный эффект достаточно часто наблюдали у растений-регенерантов с повышенным содержанием осмотически активных веществ – например, пролина [24].

Результаты микробиологического анализа ризосферы томата выявили у трансгенных растений ряд отличий от исходного сорта. Общая численность бактерий, выявленных на МПА в ризосфере трансгенных растений, существенно не изменилась, однако в структуре прокариотного комплекса наблюдались изменения. Выявлено значительное увеличение доли (73%) и видового разнообразия ($H = 2,25$) актинобактерий в ризосфере трансгенных по *codA* растений томата по сравнению с контрольными растениями (табл. 1).

Наблюдаются пигментообразующие виды, окрашивающие питательную среду в темно-коричневый цвет. Схожие результаты получены в работе [6], где было выявлено увеличение родового и видового разнообразия актиномицетов в микробном сообществе прикорневого слоя почвы трансгенных растений томата с введенным геном железосодержащей супероксиддисмутазы Fe-SOD.

В составе ризосферного комплекса трансгенных растений установлено существенное сокращение долевого участия (25%) и видового разнообразия бактерий р. *Pseudomonas*, которые являются типичными обитателями зоны корня томата [1]. Индекс Шеннона ($H = 0,98$) в 2 раза ниже аналогичного показателя в ризосфере контрольных растений ($H = 1,97$) (табл. 1). В качестве минорного компонента выявлены бациллы, содержание которых у трансгенных растений в 2,5 раза ниже по сравнению с контрольными растениями при сохранении видового разнообразия. Количество микроорганизмов, выявленных на ПДС из ризосферы трансгенных растений, больше, чем у контрольных растений (табл. 1). Кроме колоний микромицетов, на этой среде были обнаружены колонии дрожжей

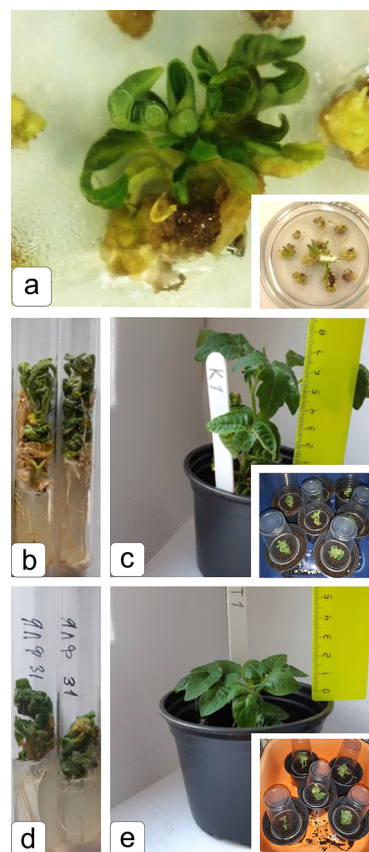


Рис. 2. Получение, клональное размножение и адаптация трансгенных растений томата к культивированию в вегетационных сосудах

и актинобактерий. В ризосфере трансгенных растений выявлено существенное сокращение доли (12%) и разнообразия ($H = 2,76$) мицелиальных грибов. Если в ризосфере контрольных растений представлены в основном микромицеты родов *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, то у трансгенных растений доминирует р. *Penicillium*. В то же время наблюдается увеличение содержания дрожжей.

Таблица 1

Численность и состав микробного сообщества ризосферы трансгенных растений томата

Показатель	Контрольные растения	Трансгенные растения
Общая численность бактерий на МПА, млн КОЕ/г/индекс Шеннона (H)	22,9±8,60/ 2,81	25,3±8,60/ 3,05
Доля в прокариотном комплексе, %/индекс Шеннона (H):		
актинобактерии	10/0,95	73/2,25
псевдомонады	70/1,97	25/0,98
бациллы	5/0,99	2/0,99
Общая численность микроорганизмов на ПДС, млн КОЕ/г/индекс Шеннона (H)	0,6±0,12/3,71	4,6±0,12/3,32
Доля, %/индекс Шеннона (H):		
микромицеты	81/3,25	12/2,76
дрожжи	9/0,97	15/1,00

Из ризосферы трансгенных и контрольных растений были выделены доминирующие морфотипы колоний микроорганизмов, проведены их дифференцированный учет и микроскопирование (рис. 3).

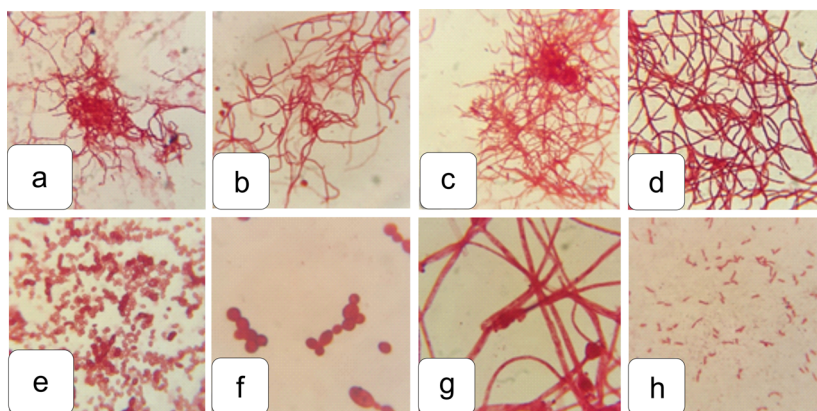


Рис. 3. Доминирующие микроорганизмы в ризосфере трансгенных (a-d) и контрольных (e-h) растений томата: a, b, c, d – актинобактерии; e – бактерии рода *Bacillus*; f – дрожжи; g – микромицеты рода *Penicillium*; h – бактерии рода *Pseudomonas*, ×1600

Таким образом, результаты микробиологического анализа показали, что в ризосфере трансгенных растений наблюдаются возрастание общей численности микроорганизмов и изменение структуры микробного комплекса, что может быть связано с увеличением объема выделяемых корневых экссудатов или/и изменением их состава. Выявленные изменения в структуре микробного сообщества могут привести к изменению его функций, а именно нарушению процессов трансформации органических веществ, синтеза биологически активных веществ, необходимых растению, почвенного гомеостаза.

Имеется достаточное количество экспериментальных доказательств изменения структуры микробных сообществ ризосферы в зависимости от состава корневых экзометаболитов [8, 20]. Трансгенное растение может обеспечивать селективное преимущество микроорганизмам, способным утилизировать продукты, синтез которых вызван трансформацией [19].

Корневые экссудаты растений являются мощным фактором воздействия на почвенные микроорганизмы. Колонизация корней бактериями и проявление ими полезных, в том числе фунгистатических свойств, зависят от генетически детерминированного соотношения индивидуальных компонентов (сахаров и органических кислот) корневых выделений. Одним из актуальных вопросов биобезопасности выращивания трансгенных культур, таких как рапс, картофель, люцерна и др., является мониторинг и детекция изменений структуры сообществ микроорганизмов в корнеобитаемой зоне почвы [9, 10, 13, 18, 22]. Анализ результатов многочисленных работ достаточно противоречив. Так, в некоторых случаях трансгенные растения не оказывали значимого эффекта [14]. Однако в другой работе эффект авторами был отмечен [19]. Одной из явных причин неоднозначности получаемых результатов является конструкция экспрессионных векторов, применяемых для трансформации растений. Для того чтобы состав корневых выделений трансгенных растений ощутимо изменился, необходимо, чтобы продукт экспрессии внедренного трансгена проявлял свою функцию как можно ближе к участкам растительных тканей, осуществляющих экссудацию различных метаболитов во внекорневую среду. Это, главным образом, такие ткани корня как эпидермис с корневыми волосками, клетки коры, клетки корневого чехлика. Однако, в генно-инженерных экспериментах авторы зачастую добиваются экспрессии целевого трансгена в органах растения, находящихся относительно далеко от тканей корня, для которых свойственна экссудация. За ткане-специфическую экспрессию отвечает промотор, применяемый в генно-инженерных конструкциях. Например, если промотор обеспечивает синтез продукта гена исключительно в семенах, то едва ли последствия изменения метаболизма в репродуктивных органах растения будут сказываться на покровных тканях корня. Так, в работе Liang и др. (2014) изучалась популяция ризосферных бактерий у трансгенной линии сои сорта Zigongdongdou и у исходного сорта. Трансгенные растения были получены посредством трансформации генетической конструкцией, которая содержала ген цистатионин-γ-синтазы из *Arabidopsis*, приводящей к увеличению синтеза метионина. Ген находился под контролем промотора легумина В4, обуславливающего экспрессию целевого гена исключительно в семенах. Таким образом, результат трансгеноза не оказывал воздействия на изменение метаболизма в тканях корня. Авторы зафиксировали с помощью пиросеквенирования на основе 16S рРНК, что не наблюдалось статистически значимых различий в структуре бактериального сообщества между трансгенной линией и исходным контрольным сортом [17]. Li и др. (2014) получили трансгенный рис с улучшенным составом каротиноидов в зерновках. Генетическая конструкция состояла из четырех целевых генов синтеза каротиноидов под контролем эндосперм-специфичного *gluB-1* промотора, что обуславливало функционирование данных генов только в эндосперме зерновок. Экспрессия этих генов также не влияла на метаболизм тканей корня. Авторы

работы заключили, что анализ активности четырех различных почвенных ферментов и разнообразия ризосферных бактерий, не дал никаких указаний на то, что генетическая модификация с четырьмя синтетическими генами и их экспрессия в трансгенном рисе АНЗЗ имеет какие-либо специфические эффекты на структуру бактериального сообщества [16]. Однако, если изучались трансгенные растения, созданные с применением индуцибельных или конститутивных промоторов, наблюдалась иная картина. В работе Zhao и др. (2020) трансгенные растения сахарного тростника экспрессировали транскрипционный фактор Ea-DREB2B, усиливающий устойчивость к засухе и засолению, под контролем индуцибельного промотора RD28A, который может экспрессироваться почти во всех органах растения, в том числе и в корнях. Авторы подтвердили, что разнообразие и состав бактериального сообщества были изменены благодаря генетической модификации сахарного тростника [25]. Широких и др. (2016) было изучено изменение в ризосферной микрофлоре трансформантов томата (*Solanum lycopersicon* L.) с внедренным геном фермента Fe-супероксиддисмутазы, который отвечает за нейтрализацию вредоносных активных форм кислорода. Здесь ген находился под контролем конститутивного CaMV 35S промотора, обеспечивающего экспрессию в том числе, и в корневой ткани. Было обнаружено, что в ризосфере трансгенной линии bn4 произошли перестройки в структуре комплексов актиномицетов, выразившиеся в изменении частоты встречаемости и долевого участия в комплексе представителей отдельных родов, секций и серий, а также видов-антагонистов, целлюлозолитиков и продуцентов ауксинов [6]. Таким образом степень воздействия растительных трансгенов на структуру бактериального сообщества сильно зависит от регуляторных элементов трансгена, обеспечивающих специфичность экспрессии.

Чаще всего такие работы используют методы молекулярно-генетической диагностики по 16S рРНК, что имеет существенное ограничение, так как позволяет идентифицировать только известные виды. Кроме того, значительная часть микробного ризосферного сообщества, представленная микромицетами, остается вне сферы внимания исследователей, несмотря на разнообразные и важные в практическом отношении (участие в патогенном комплексе) аспекты их взаимодействия с растением-хозяином. Также преимущественно используемые в приведенных работах методы не дают возможности адекватно оценить перестройки в структуре комплексов прокариотных микроорганизмов на физиологическом уровне: например, изменение фунгистатической активности или способности к синтезу соединений, стимулирующих рост растений отдельными представителями.

В данном случае детекция изменений состава микроорганизмов в корнеобитаемой зоне почвы трансгенных растений с геном синтеза глицинбетаина (кодирующего фермент холиноксидазу) вызвала существенное изменение состава микробного сообщества. Несмотря на то, что продуцируемое вещество само по себе токсичным для микроорганизмов не является, изменения, привнесенные в метаболизм данных растений, способны оказывать заметные эффекты по крайней мере на соотношение разных групп микроорганизмов. Генетически модифицированные *codA*-растения оказывают влияние на численность и структуру микробного сообщества почвы, что, вероятно, обусловлено изменением химического состава корневых экссудатов.

Полученные в работе результаты могут служить основой для дальнейшего, более детального изучения последствий внесения генетически измененных организмов в окружающую среду и их влияния на сложные биологические системы, характерные для такого разнообразного и динамического объекта, как почвенное микробное сообщество.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-016-00207 и госзадания РФ АААА-А18-118051890089-0; РФ 18-118021490111-5.

Библиографический список

1. Алексеева А.С. Сравнительная характеристика микробиоценоза ризосферы и ризопланы *Lycopersicum esculentum* Mill. / А.С. Алексеева, Н.И. Потатуркина-Нестерова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 6. – С. 70–81.
2. Гулевич А.А. Генно-инженерный подход в решении «неразрешимых» задач ремедиации почв / А.А. Гулевич, Е.Н. Баранова, И.Г. Широких, А.А. Широких // Теоретическая и прикладная экология. – 2018. – № 2. – С. 5–15.
3. Гулевич А.А. Использование системы таргетинга ферментов Fe-зависимой супероксиддисмутазы и холиноксидазы в хлоропласт как стратегия эффективной защиты растений от абиотических стрессов / А.А. Гулевич, Л.В. Куренина, Е.Н. Баранова // Российская сельскохозяйственная наука. – 2018. – № 1. – С. 7–12.
4. Лысак Л.В. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий / Л.В. Лысак. – М.: МАКС Пресс, 2003. – С. 121.
5. Теннер Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теннер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1993. – С. 175.
6. Широких И.Г. Изменение структуры комплексов актиномицетов в ризосфере трансгенных по гену Fe-SOD1 линий томата (*Solanum lycopersicum* L., *Solanaceae*, *Solanales*) / И.Г. Широких, Я.И. Назарова, С.Ю. Огородникова, Е.Н. Баранова // Поволжский экологический журнал. – 2016. – № 3. – С. 341–351.
7. Bais H.P. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms / H.P. Bais, T.L. Weir, L.G. Perry, S. Gilroy, J.M. Vivanco // Annual Review of Plant Biology. – 2006. – V. 57. – P. 233–266.
8. Broeckling C.D. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity / C.D. Broeckling, A.K. Broz, J. Bergelson, D.K. Manter, J.M. Vivanco // Applied and Environmental Microbiology. – 2008. – V. 74. – P. 738–744.
9. Cirvilleri G. Characterization of antagonistic root-associated fluorescent pseudomonads of transgenic and non-transgenic citrange Troyer plants / G. Cirvilleri, S. Spina, G. Scuderi, A. Gentile, A. Catara // Journal of Plant Pathology. – 2005. – V. 87. – P. 179–186.
10. Dunfield K.E. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified Brassica napus / K.E. Dunfield, J.J. Germinda // FEMS Microbiology Ecology. – 2001. – V. 38. – P. 1–9.
11. Flowers T.J. Solute transport in plants / T.J. Flowers, A.R. Yeo // Springer Netherlands, 2012. – 176 p.
12. Folman L.B. Ecophysiological characterization of rhizosphere bacterial communities at different root locations and plant developmental stages of cucumber grown on rockwool / L.B. Folman, J. Postma, J.A. Veen // Microbial ecology. – 2001. – V. 42. – P. 586–597.
13. Griffiths B.S. Testing genetically engineered potato, producing the lectins GNA and Con A, on non-target soil organisms and processes / B.S. Griffiths, I.E. Geoghegan, W.M. Robertson // Journal of Applied Ecology. – 2000. – V. 37. – P. 159–170.
14. Heuer H. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors / H. Heuer, R.M. Kropfenstedt, J. Lottmann, G. Berg, K. Smalla // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – V. 68. – P. 1325–1335.
15. Honsbein A. A molecular framework for coupling cellular volume and osmotic solute transport control / A. Honsbein, M.R. Blatt, C. Grefen // Journal of Experimental Botany. – 2010. – V. 62. – P. 2363–2370.
16. Li P., Dong J., Yang S., Bai L., Wang J., Wu G., Wu X., Yao Q., Tang X. Impact of β -carotene transgenic rice with four synthetic genes on rhizosphere enzyme activities

and bacterial communities at different growth stages. *European journal of soil biology* // 2014. V. 65. P. 40–46.

17. *Liang J., Sun S., Ji J., Wu H., Meng F., Zhang M., Zheng X., Wu C., Zhang Z.* Comparison of the rhizosphere bacterial communities of Zigongdongdou soybean and a high-methionine transgenic line of this cultivar // *PLoS One*. 2014. V. 9. e103343.

18. *Lottmann J., Heuer H., de Vries J., Mahn A., Düring K., Wackernagel W., Smal-la K., Berg G.* Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community // *FEMS Microbiology Ecology*. 2000. V. 33. P. 41–49.

19. *Motavalli P.P., Kremer R.J., Fang M., Means N.E.* Impact of genetically modified crops and their management on soil microbially mediated plant nutrient transformations // *Journal of environmental quality*. 2004. V. 33. P. 816–824.

20. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiologia Plantarum*. 1962. V. 15. P. 473–497.

21. *Savage J.A., Clearwater M.J., Haines D.F., Klein T., Mencuccini M., Sevanto S., Turgeon R., Zhang C.* Allocation, stress tolerance and carbon transport in plants: how does phloem physiology affect plant ecology? // *Plant, Cell and Environment*. 2016. V. 39. P. 709–725.

22. *Siciliano S.D., Germida J.J.* Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland // *FEMS Microbiology Ecology*. 1999. V. 29. P. 263–272.

23. *Tian H., De Smet I., Ding Z.* Shaping a root system: regulating lateral versus primary root growth // *Trends in Plant Science*. 2014. V. 19. P. 426–431.

24. *Verbruggen N., Hermans C.* Proline accumulation in plants: a review // *Amino acids*. 2008. V. 35. P. 753–759.

25. *Zhao X., Jiang Y., Liu Q., Yang H., Wang Z., Zhang M.* Effects of Drought-Tolerant Ea-DREB2B Transgenic Sugarcane on Bacterial Communities in Soil // *Frontiers in Microbiology*. 2020. V. 11. 704.

MODIFIED COMPOSITION OF MICROBIAL COMMUNITY IN THE RHIZOSPHERE OF TRANSGENIC TOMATO PLANTS WITH A GLYCINE BETAINE SYNTHESIS GENE

A.A. ANTONOV², E.N. BARANOVA^{1,4}, A.A. GULEVICH¹,
L.V. KURENINA¹, A.A. VANKOVA², G.N. RALDUGIN³

(¹All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (RAAS),

²Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy,

³Timiryazev Institute of Plant Physiology (RAS),

⁴N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of RAS)

*The change in the composition of soil microbiota as a result of the cultivation of various crops in agroecosystems is currently of great interest. The authors studied the effect of the root system of transgenic tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) grown in soil culture on the microbial community in the rhizosphere. The results showed that as a result of the cultivation of transgenic plants with the choline oxidase gene, the microbial community composition in the rhizosphere has changed significantly. A significant increase in the proportion (73%) and species diversity (Shannon index 2.25) of actinobacteria in the soil root zone of tomato transgenic *codA* plants as compared with control plants (10% and 0.95, respectively) has been revealed. The content of pseudomonads*

and micromycetes is significantly reduced (25 and 12% in transgenic plants; 70 and 81% in control plants, respectively). Thus, genetically modified plants are able to influence the microbial community structure in the rhizosphere.

Key words: cholinoxidase, *codA*, tomato, rhizosphere, microorganisms, plant-microbial interactions.

References

1. Alekseeva A.S., Potaturkina-Nesterova N.I. Sravnitel'naya kharakteristika mikrobiotsenoza rizosfery i rizoplany *Lycopersicum esculentum* Mill. [Comparative characteristics of the microbiocenosis of the rhizosphere and rhizoplans of *Lycopersicum esculentum* Mill.] // *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014; 6: 70–81. (In Rus.)
2. Gulevich A.A., Baranova E.N., Shirokikh I.G., Shirokikh A.A. Genno-inzhenerniy podkhod v reshenii "nerazreshimykh" zadach remediatsii pochv [Genetic engineering approach to solving the "unsolvable" tasks of soil remediation] // *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*. 2018; 2: 5–15. (In Rus.)
3. Gulevich A.A., Kurenina L.V., Baranova E.N. Ispol'zovanie sistemy targetinga fermentov Fe-zavisimoy superoksid-dismutazy i kholinokidazy v khloroplast kak strategiya effektivnoy zashchity rasteniy ot abioticheskikh stressov [Use of the enzyme targeting system of Fe-dependent superoxide dismutase and cholinokidase in chloroplast as a strategy for the effective protection of plants from abiotic stresses] // *Rossiyskaya sel'skokhozyaistvennaya nauka*. 2018; 1: 7–12. (In Rus.)
4. Lysak L.V. Metody otsenki bakterial'nogo raznoobraziya pochv i identifikatsii pochvennykh bakteriy [Methods for assessing bacterial soil diversity and identifying soil bacteria]. M.: MAKS Press, 2003: 121. (In Rus.)
5. Tepper E.Z., Shil'nikova V.K., Pereverzeva G.I. Praktikum po mikrobiologii, 4-e izd., pererab. i dop [Workshop on Microbiology, 4th ed., reviewed and extended]. M.: Kolos, 1993: 175. (In Rus.)
6. Shirokikh I.G., Nazarova Ya.I., Ogorodnikova S.Yu., Baranova E.N. Izmenenie struktury kompleksov aktinomitsvetov v rizosfere transgennykh po genu Fe-SOD1 liniy tomatata [Changes in the structure of the rhizosphere complexes of actinomycetes of transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae, Solanales) with the Fe-SOD1 gene] // *Povolzhskiy ekologicheskiy zhurnal*. 2016; 3: 341–351. (In Rus.)
7. Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms // *Annual Review of Plant Biology*. 2006; 57: 233–266.
8. Broeckling C.D., Broz A.K., Bergelson J., Manter D.K., Vivanco J.M. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity // *Applied and Environmental Microbiology*. 2008; 74: 738–744.
9. Cirvilleri G., Spina S., Scuderi G., Gentile A., Catara A. Characterization of antagonistic root-associated fluorescent pseudomonads of transgenic and non-transgenic citrange Troyer plants // *Journal of Plant Pathology*. 2005; 87: 179–186.
10. Dunfield K.E., Germida J.J. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus* // *FEMS Microbiology Ecology*. 2001; 38: 1–9.
11. Flowers T.J., Yeo A.R. Solute transport in plants // Springer Netherlands, 2012: 176.
12. Folman L.B., Postma J., Veen J.A. Ecophysiological characterization of rhizosphere bacterial communities at different root locations and plant developmental stages of cucumber grown on rockwool // *Microbial ecology*. 2001; 42: 586–597.

13. *Griffiths B.S., Geoghegan I.E., Robertson W.M.* Testing genetically engineered potato, producing the lectins GNA and Con A, on non-target soil organisms and processes // *Journal of Applied Ecology*. 2000; 37: 159–170.
14. *Heuer H., Kroppenstedt R.M., Lottmann J., Berg G., Smalla K.* Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors // *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; 68: 1325–1335.
15. *Honsbein A., Blatt M.R., Grefen C.* A molecular framework for coupling cellular volume and osmotic solute transport control // *Journal of Experimental Botany*. 2010; 62: 2363–2370.
16. *Li P., Dong J., Yang S., Bai L., Wang J., Wu G., Wu X., Yao Q., Tang X.* Impact of β -carotene transgenic rice with four synthetic genes on rhizosphere enzyme activities and bacterial communities at different growth stages. *European journal of soil biology* // 2014. V. 65. P. 40–46.
17. *Liang J., Sun S., Ji J., Wu H., Meng F., Zhang M., Zheng X., Wu C., Zhang Z.* Comparison of the rhizosphere bacterial communities of Zigongdongdou soybean and a high-methionine transgenic line of this cultivar // *PLoS One*. 2014. V. 9. e103343.
18. *Lottmann J., Heuer H., de Vries J., Mahn A., Düring K., Wackernagel W., Smalla K., Berg G.* Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community // *FEMS Microbiology Ecology*. 2000. V. 33. P. 41–49.
19. *Motavalli P.P., Kremer R.J., Fang M., Means N.E.* Impact of genetically modified crops and their management on soil microbially mediated plant nutrient transformations // *Journal of environmental quality*. 2004. V. 33. P. 816–824.
20. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiologia Plantarum*. 1962. V. 15. P. 473–497.
21. *Savage J.A., Clearwater M.J., Haines D.F., Klein T., Mencuccini M., Sevanto S., Turgeon R., Zhang C.* Allocation, stress tolerance and carbon transport in plants: how does phloem physiology affect plant ecology? // *Plant, Cell and Environment*. 2016. V. 39. P. 709–725.
22. *Siciliano S.D., Germida J.J.* Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland // *FEMSMicrobiologyEcology*. 1999. V. 29. P. 263–272.
23. *Tian H., De Smet I., Ding Z.* Shaping a root system: regulating lateral versus primary root growth // *Trends in Plant Science*. 2014. V. 19. P. 426–431.
24. *Verbruggen N., Hermans C.* Proline accumulation in plants: a review // *Amino acids*. 2008. V. 35. P. 753–759.
25. *Zhao X., Jiang Y., Liu Q., Yang H., Wang Z., Zhang M.* Effects of Drought-tolerant Ea-DREB2B transgenic sugarcane on bacterial communities in soil // *Frontiers in Microbiology*. 2020. V. 11. 704.

Антонов Алексей Александрович, магистр, РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, Тимирязевская ул., д. 49); младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАН (127500, г. Москва, Тимирязевская ул., д. 42; тел.: (903) 689-80-95; e-mail: antonov4b@yandex.ru).

Баранова Екатерина Николаевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт

сельскохозяйственной биотехнологии РАН (127500, Россия, г. Москва, Тимирязевская ул., д. 42; тел.: (903) 624-59-71; e-mail: greenpro2007@rambler.ru).

Гулевич Александр Анатольевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАН (127500, Россия, г. Москва, Тимирязевская ул., д. 42; тел.: (968) 084-68-78; e-mail: a_gulevich@mail.ru greenpro2007@rambler.ru).

Куренина Людмила Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАН (127500, Россия, г. Москва, Тимирязевская ул., д. 42; e-mail: ludmila.kur2208@gmail.com).

Ванькова Анна Андреевна, доцент кафедры микробиологии и иммунологии, РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, Тимирязевская ул., 49; тел.: 8(499) 9760966; e-mail: anna.vankova@gmail.com).

Ралдугина Галина Николаевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Институт физиологии растений РАН имени К.А. Тимирязева (127276, Россия, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35; тел.: (966) 062-24-41; e-mail: greenpro2007@rambler.ru, raldugina42@mail.ru).

Aleksei A. Antonov, MSc, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 127550 Moscow, 49 Timiryazevskaya Str., Junior Research Associate, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (RAAS), 127500, Russia, Moscow, Timiryazevskaya Str. 42, (903) 689–80–95, antonov4b@yandex.ru

Ekaterina N. Baranova, PhD (Bio), Key Research Associate, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (RAAS), 127500, Russia, Moscow, Timiryazevskaya Str., 42, (903) 624–59–71, greenpro2007@rambler.ru

Aleksandr A. Gulevich, PhD (Bio), Senior Research Associate, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (RAAS), 127500, Russia, Moscow, Timiryazevskaya Str., 42, (968) 084–68–78, greenpro2007@rambler.ru

Lyudmila V. Kurenina, PhD (Bio), Key Research Associate, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (RAAS), 127500, Russia, Moscow, Timiryazevskaya Str., 42, ludmila.kur2208@gmail.com,

Anna A. Vankova, PhD (Bio), Associate Professor, Department of Microbiology and Immunology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy. anna.vankova@gmail.com 127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49; (499) 976–09–66; anna.vankova@gmail.com

Galina N. Raldugina, PhD (Bio), Key Research Associate, Timiryazev Institute of Plant Physiology (RAS), 127276, Russia, Moscow, Botanicheskaya Str., 35, (966) 062–24–41, raldugina42@mail.ru