

ORIGINAL ARTICLE

Biological Effects of Potato Plants Transformation with Glucose Oxidase Gene and their Resistance to Hyperthermia

O.I. Grabelnych^{1,2}, O.A. Borovik¹, I.V. Lyubushkina^{1,2},
K.Z. Gamburg¹, A.V. Fedyaeva¹, I.V. Fedoseeva¹,
A.V. Stepanov¹, E.G. Rikhvanov¹, D.V. Sauchyn³,
O.Yu. Urbanovich³, G.B. Borovskii^{1*}

¹ *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia*

² *Irkutsk State University, Irkutsk, Russia*

³ *Institute of Genetics and Cytology of NAS of Belarus, Minsk, Belarus*

*E-Mail: borovskii@sifibr.irk.ru

Received November 7, 2016

It is known that regulation of plant tolerance to adverse environmental factors is connected with short term increase of the concentration of endogenous reactive oxygen species (ROS), which are signalling molecules for the induction of protective mechanisms. Introduction and expression of heterologous *gox* gene, which encodes glucose oxidase enzyme in plant genome, induce constantly higher content of hydrogen peroxide in plant tissues. It is not known how the introduction of native or modified *gox* gene affects the plant resistance to high-temperature stress, one of the most commonly used model for the study of stress response and thermal tolerance. In this study, we investigated biological effects of transformation and evaluated the resistance to temperature stress of potato plants with altered levels of glucose oxidase expression. Transformation of potato plants by *gox* gene led to the more early coming out from tuber dormancy of transformed plants and slower growth rate. Transformants containing the glucose oxidase gene were more sensitive to lethal thermal shock (50 °C, 90 min) than the transformant with the empty vector (pBI) or untransformed plants (CK). Pre-heating of plants at 37 °C significantly weakened the damaging effect of lethal thermal shock. This attenuation was more significant in the non-transformed plants.

Key words: heat stress tolerance, high temperature, hydrogen peroxide, glucose oxidase, potato

Известно, что повышению защитных свойств растений к неблагоприятным факторам внешней среды способствует увеличение концентрации эндогенных активных форм кислорода (АФК) в растительной ткани, которые являются сигнальными молекулами для запуска ряда защитных механизмов. Введение и экспрессия в растительном геноме гетерологичных генов, в частности, гена *gox*, который кодирует фермент глюкозооксидазу, приводит к постоянному повышенному содержанию пероксида водорода в тканях растения. Это может повысить защитные свойства растений без изменения других ценных признаков сельскохозяйственных культур (Wu *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2002; Selvakumar *et al.*, 2013). Созданы трансгенные формы растений картофеля, табака, хлопка, капусты и риса с геном глюкозооксидазы, проявляющие повышенный уровень устойчивости к широкому ряду грибных и бактериальных фитопатогенов (Wu *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2002; Kachroo *et al.*, 2003). Тем не менее, пока не известно, как введение нативного или модифицированного гена *gox* отражается на устойчивости растений к высокотемпературному стрессу, одному из наиболее часто используемых модельных стрессов для изучения стресс-реакции и устойчивости растений.

Ранее нами было показано, что трансформация растений картофеля векторными конструкциями с нативным и модифицированным геном глюкозооксидазы *gox* повышает содержание эндогенного пероксида водорода и приводит к изменению синтеза Hsp60 и Hsp17.6C-2 (Borovskii *et al.*, 2015), что может быть связано и с изменением базовой температурной устойчивости трансгенных по гену *gox* растений. В данной работе проводилось исследование биологических эффектов трансформации и оценка устойчивости к температурному стрессу пробирочных растений картофеля с измененным уровнем экспрессии глюкозооксидазы.

MATERIALS AND METHODS

Получение трансгенных растений.

Трансгенные растения картофеля получали методом агробактериальной трансформации (Fraley *et al.*,

1983; Kartel *et al.*, 1994; Sauchyn *et al.*, 2011). В экспериментах использовали растения картофеля сорта белорусской селекции Скарб и агробактериальный штамм *Agrobacterium tumefaciens* Agl0 с векторными конструкциями pBI-L-GOX, pBI-F-GOX (Sauchyn *et al.*, 2011) и pBI-GOXmod (Sauchyn *et al.*, 2015), несущими нативный или модифицированный ген глюкозооксидазы под контролем конститутивного промотора 35S РНК CaMV. Отбор и дальнейшее культивирование растений в условиях *in vitro* осуществляли на средах MC (Murashige and Skoog, 1962), с добавлением сахарозы, витаминов и регуляторов роста. В качестве селективного агента использовали антибиотик канамицин в концентрации 50 мг/л. Подтверждение интеграции гетерологичной вставки проводили с помощью ПЦР со специфичными праймерами (Sauchyn *et al.*, 2012). Синтез функционально активной формы целевого белка в отобранных трансгенных линиях подтвержден методом ренатурирующего гель-электрофореза белков в ПААГ с последующей детекцией глюкозооксидазной активности (Sauchyn *et al.*, 2012). Контрольные и трансформированные геном *gox* и *gox-mod* растения для получения клубней выращивали в закрытой укрывным материалом теплице в вегетационных сосудах.

Получение пробирочных растений. Клубни проращивали в темноте при 23 °С в течение трех недель. Ростки стерилизовали 70%-ным этанолом 30 сек и 1%-ным NaOCl 15 мин. Затем нарезали черенки и высаживали в пробирки со средой MC (Murashige and Skoog, 1962), с добавлением сахарозы, витаминов и регуляторов роста. Выращивание проводили в цикле: освещение 16 часов (23 °С), темнота 8 часов (18 °С), влажность воздуха 65%, с пересадками на свежую среду через 4 недели. Для опытов использовали 3-х недельные растения.

Определение устойчивости линий картофеля к повышенной температуре.

Изучали устойчивость пробирочных растений к прогреву при 50 °С. Предварительно была подобрана продолжительность прогрева 90 мин, при

которой выявляется разница между трансгенными линиями, линией с пустым вектором и контрольными растениями. Перед проведением опыта производили измерение высоты растений. Верхнюю часть растений длиной 4-6 см срезали и помещали в чашки Петри диаметром 13 см с увлажненной водой фильтровальной бумагой. Чашки закрывали тонкой полиэтиленовой пленкой и переносили в термостат с температурой 50 °C на 90 мин в темноте. В ряде опытов перед прогревом при 50 °C пробирки с растениями выдерживали 2 часа при 37 °C для индукции терморезистентности. После окончания прогрева верхушки растений длиной 12-15 мм срезали и высаживали в пробирки со свежей средой для определения способности к росту. Оставшуюся в пробирках часть прогретых растений использовали для определения активности глюкозооксидазы.

Определение активности глюкозооксидазы.

Определение глюкозооксидазной активности проводили с помощью теста по способности растений генерировать пероксид водорода в присутствии глюкозы (Sauchyn et al., 2012). Для этого части растительной ткани (этиолированные побеги клубней или стебли и листья пробирочных растений) помещали на 1% агарозный гель, содержащий 50 мМ йодида калия, 5% крахмала, 200 мМ D-глюкозы. В результате окисления глюкозы глюкозооксидазой образуется пероксид водорода, который окисляет йодид калия до свободного йода, окрашивающего крахмал среды в синий цвет, что и является подтверждением присутствия фермента глюкозооксидазы. Первое окрашивание наблюдали через 15-30 минут после начала эксперимента, окончательную регистрацию результата проводили через 2 часа. По интенсивности окрашивания судили об уровне синтеза глюкозооксидазы.

Определение содержания АФК. Образование АФК определяли с использованием ксиленолового оранжевого, где гидропероксид восстанавливался ионами железа в растворе серной кислоты с образованием комплекса железо-ксиленоловый оранжевый, определяемого спектрофотометрически при 560 нм (Wolff, 1994). Для этого растительную ткань (зеленые листья) растирали в фарфоровых ступках с охлажденным ацетоном и

центрифугировали гомогенат при 12000 об./мин в течение 10 мин. Затем к супернатанту добавляли равный объем раствора ксиленолового оранжевого и выдерживали пробы 45 мин при комнатной температуре. После этого прореагировавшую смесь центрифугировали при 10000 об./мин в течение 5 мин и по оптической плотности образца при 560 нм судили о количестве пероксида водорода. Количество пероксида водорода определяли по калибровочной кривой, построенной на основании разных концентраций H_2O_2 .

Повторности и статистика. В каждом варианте опыта было 4-6 растений. Опыты были повторены 3 раза. Были рассчитаны средние значения и стандартные отклонения.

RESULTS

Продуктивность линий при росте в культуральных сосудах в закрытой теплице. В 2015 г. был собран урожай картофеля сорта Скарб контрольного варианта - не подвергавшегося трансформации, линии рВ1 - трансформированной пустым вектором, линии L - со слабой экспрессией глюкозооксидазы (*gox*), линии F - со средней экспрессией *gox* и линии M - с сильной экспрессией *gox*. С каждого куста картофеля независимо от линии собрали в среднем по 280-320 г клубней. Можно отметить тенденцию к увеличению количества клубней у трансформированных глюкозооксидазой растений картофеля и снижению веса клубня (табл. 1).

Выход клубней из состояния зимнего покоя.

В процессе хранения картофеля в холодных (4 °C) условиях обнаружили, что линии L, F и M значительно раньше выходят из зимнего покоя, чем контрольные растения и растения рВ1. На рис. 1 представлены клубни картофеля от 10 февраля 2016 г., где хорошо видно, что у клубней картофеля линий L, F и M образуется большое количество длинных побегов, в то время как у контрольных растений (вариант СК) и растений, трансформированных пустым вектором (рВ1), число ростков меньше и они значительно короче. Так, число ростков у контрольных растений и растений рВ1 линии не превышало 4, в то время как у растений

линий L, F и M число ростков достигало 10, а их длина составляла 1-4 см.

Активность гена *gox* в побегах клубней картофеля. При анализе этиолированных ростков клубней картофеля контрольного варианта, линии pBI и линий, трансформированных геном *gox*, тест для определения активности глюкозооксидазы выявил различную интенсивность окрашивания. Так, вокруг срезов побегов контрольных растений (линия СК) и растений, трансформированных пустым вектором (линия pBI), развития синей окраски не происходило (рис. 2), в то же время вокруг срезов побегов картофеля трансформированных линий наблюдалось окрашивание, которое было наиболее интенсивно выражено у растений линии М. У линий со сравнительно слабой активностью *gox* можно было заметить, что активность глюкозооксидазы была выше всего в камбии проводящих пучков. В случае большей активности глюкозооксидазы окраска сливается и рассмотреть внутритканевую локализацию окраски становится сложнее. Следует отметить, что внутри линий L, F и M существуют значительные различия по экспрессии глюкозооксидазы, поскольку интенсивность окрашивания у растений, трансформированных одинаковой генетической конструкцией, значительно варьировала: от слабого окрашивания до очень сильного. Такие различия выявлены внутри линии F и линии М (рис. 2).

На основании вышеприведенных данных по активности глюкозооксидазы и содержанию пероксида водорода (рис. 3), для получения пробирочных растений нами были использованы линия L17.2 со слабой экспрессией глюкозооксидазы и линия М7.3 с сильной экспрессией *gox*, а также нетрансформированные растения (СК) и растения, трансформированные пустым вектором (pBI).

Проверка пробирочных растений на экспрессию глюкозооксидазы. После получения пробирочных растений картофеля проводили определение экспрессии глюкозооксидазы в листьях и стеблях полученных растений. Результаты теста подтвердили, что глюкозооксидаза экспрессируется в листьях и стеблях растений линий L17.2 и М7.3

(рис. 4). Также подтвердились различия в степени экспрессии глюкозооксидазы между линиями L и М: в стеблях растений линии L синее окрашивание было в меньшей степени выражено, чем в стеблях растений линии М. На листьях различия между линиями заметны хуже, поэтому в дальнейших экспериментах использовали стебли.

Рост растений в пробирках. Растения измеряли на 20-ый день после пересадки микрочеренков в пробирки со свежей средой (перед началом опыта с температурными обработками). Выявлено, что растения линии М7.3 с наиболее активной глюкозооксидазой имели наименьшую высоту по сравнению с другими линиями (Табл. 2). При этом меньшая длина у линии М7.3 была обусловлена меньшей длиной междоузлий, что, вероятно, связано с интенсивной экспрессией гена глюкозооксидазы у этой линии.

Температурная устойчивость контрольных и трансформированных пробирочных растений картофеля. После 90-минутного прогрева при 50 °C срезанные верхушки всех линий не имели видимых повреждений и потери тургора. Через 6 дней у растений контрольного варианта (СК) все верхушки оставались живыми, но имели частичное отмирание листьев. У линии pBI из 6 верхушек 3 оказались полностью погибшими, а у трех сохранились зеленые стебли и листья. Верхушки линий М7.3 и L17.2 погибли, и лишь на некоторых листьях оставались небольшие зеленые участки. Предварительное выдерживание пробирок с растениями при 37 °C позволило им лучше противостоять повреждающему влиянию прогрева при 50 °C. Сама по себе обработка при 37 °C не оказывала существенного влияния на растения. Через 22 дня все растения всех линий, не получившие обработку при 37 °C, оказались погибшими (рис. 5). В результате предварительной обработки 37 °C в вариантах СК и pBI все растения выжили и возобновили рост, а в вариантах L и М – только 50%. Таким образом, линии СК и pBI обладали более высокой устойчивостью к прогреву при 50 °C, а М7.3 и L17.2 – меньшей. Предварительное выдерживание при 37 °C увеличивало устойчивость к последующему прогреву

при 50 °С у всех линий, однако у растений, происходил в меньшей степени. трансформированных геном *gox*, рост устойчивости

Table 1. Некоторые параметры продуктивности картофеля с внедренным геном *gox* в сравнении с исходным сортом

Вариант	Кол-во клубней, шт.	Вес всех клубней с куста, г	Вес одного клубня, г
	2015 г.		
СК	5±1	309±12	70,4±21,0
pBI	6±2	339±62	59,7±19,8
L	9±4	288±14	45,5±24,7
F	9±2	325±94	41,7±23,9
M	7±2	280±34	41,7±10,5

Исследовали сорт картофеля Скарб (СК) и растения картофеля, трансформированные пустым вектором (pBI), вектором с конструкцией pBI-L-GOX (L), pBI-F-GOX (F) и pBI-GOXmod (M). Приведены средние значения и стандартные отклонения.



Figure 1. Образование ростков у клубней картофеля контрольного варианта (СК); растений, трансформированных пустым вектором (pBI); растений, трансформированных геном *gox* (линии L, F, M).

Table 2. Высота контрольных и трансгенных пробирочных растений через 20 дней после пересадки.

Линии	Высота, мм	%, среднее по 3 опытам
СК	107 ± 7	100
pBI	112 ± 10	108 ± 4
L17.2	109 ± 12	99 ± 5
M7.3	79 ± 9	71 ± 7

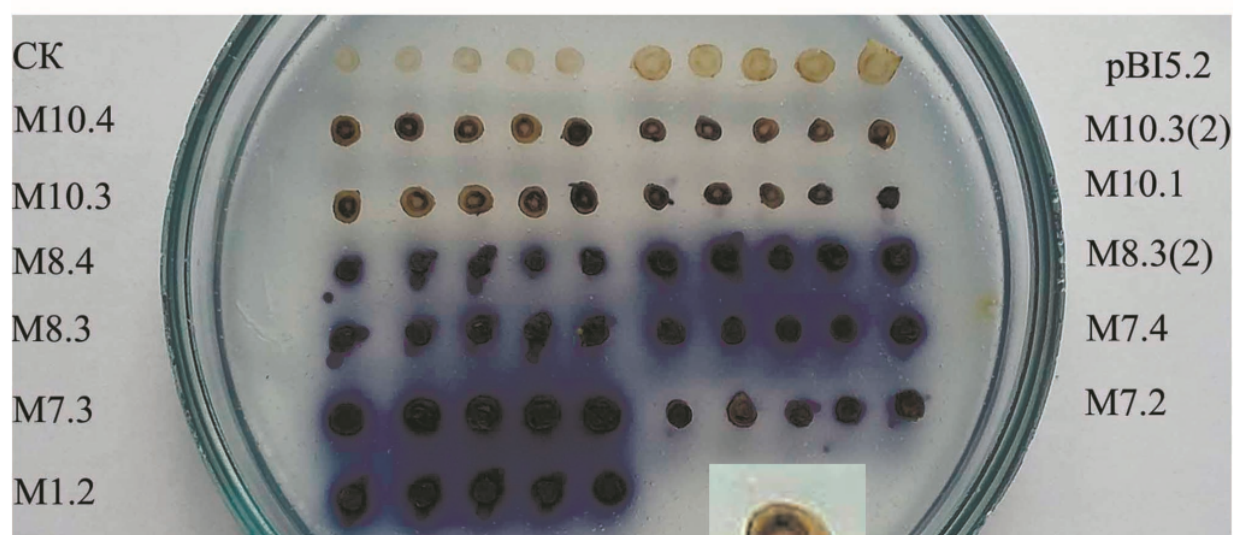
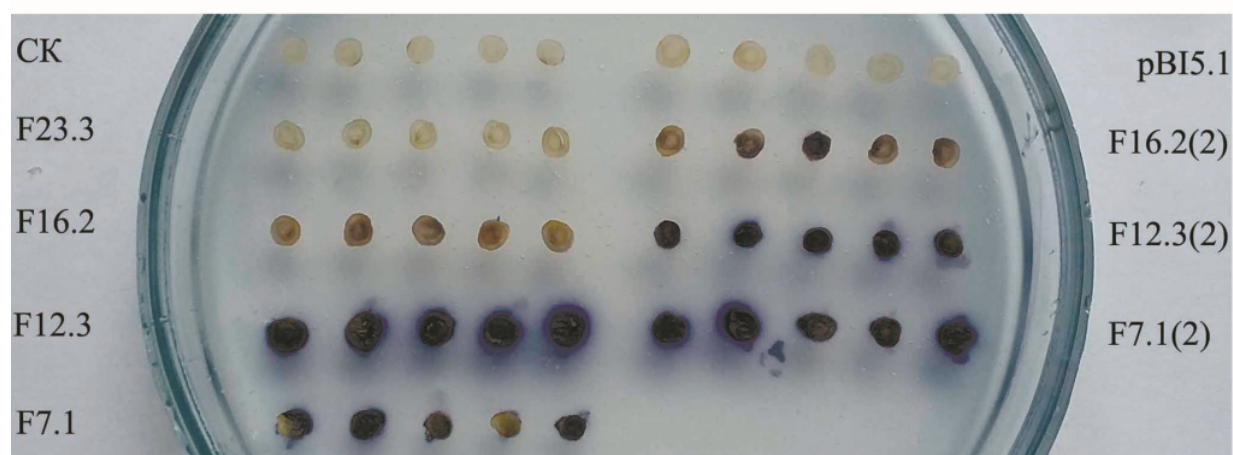


Figure 2. Активность глюкозооксидазы в этилированных побегах картофеля. На вставке изображен увеличенный срез этилированного побега линии M10.4

СК – контрольные растения; pBI – растения, трансформированные пустым вектором; L, F, M – линии трансгенных растений.

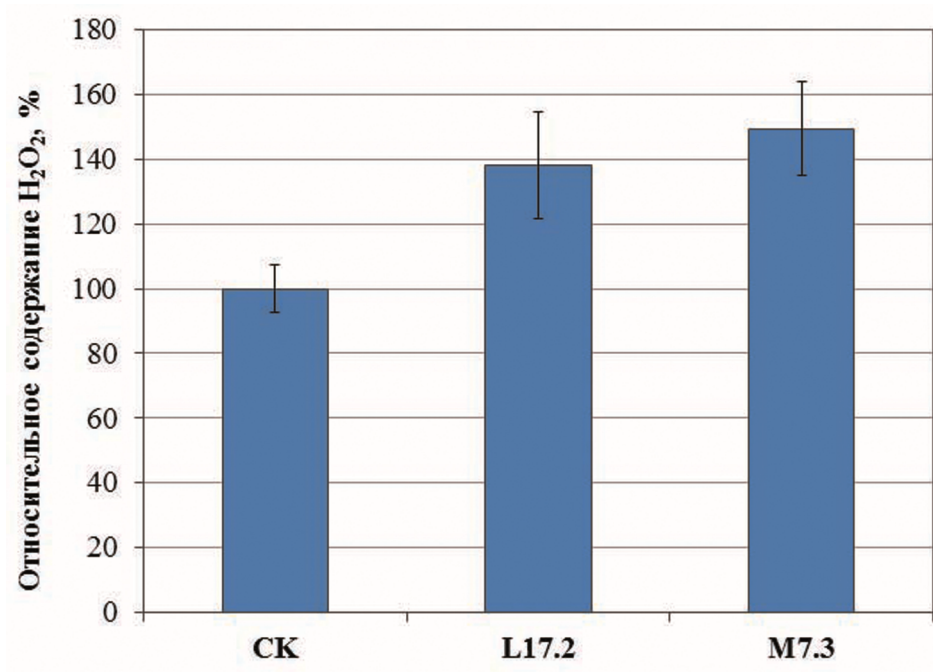


Figure 3. Содержание АФК в листьях растений картофеля.

АФК определяли с помощью ксиленолового оранжевого в листьях растений, выращенных в культуральных сосудах в закрытой среде (полевой сезон 2015 г.)

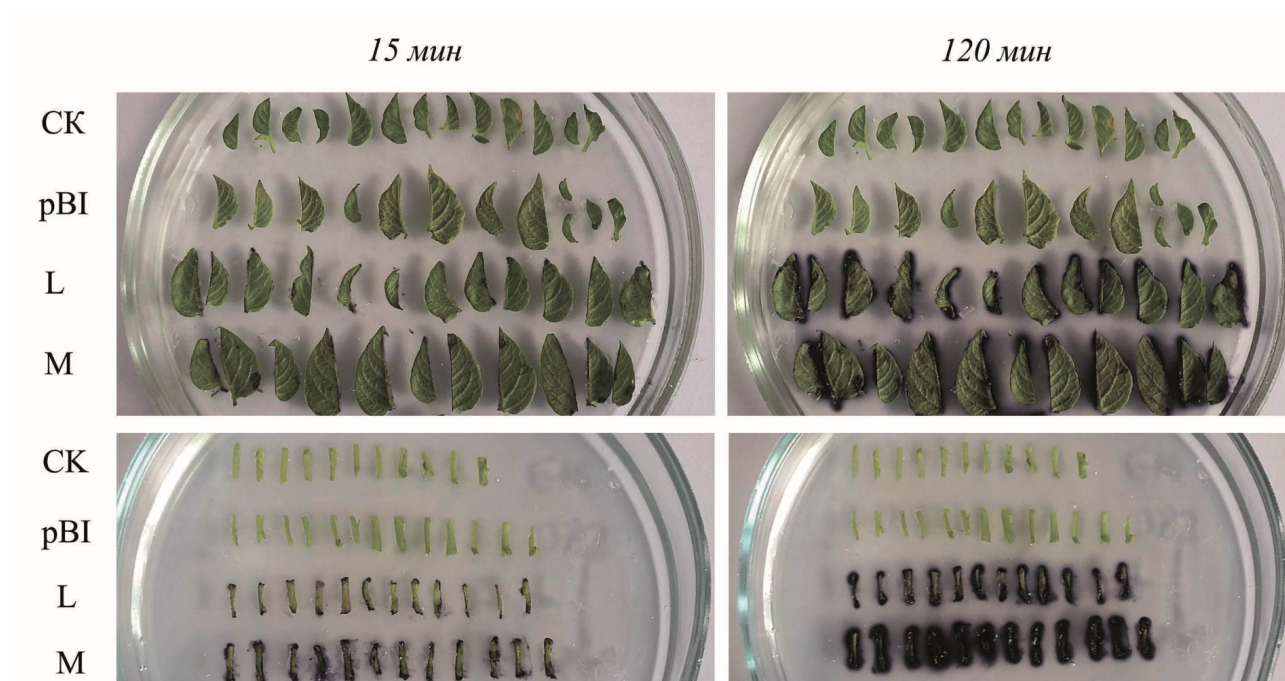


Figure 4. Активность глюкозооксидазы в листьях и стеблях пробирочных растений картофеля.

СК – контрольные растения; pBI – растения, трансформированные пустым вектором; L, F, M – линии трансгенных растений.

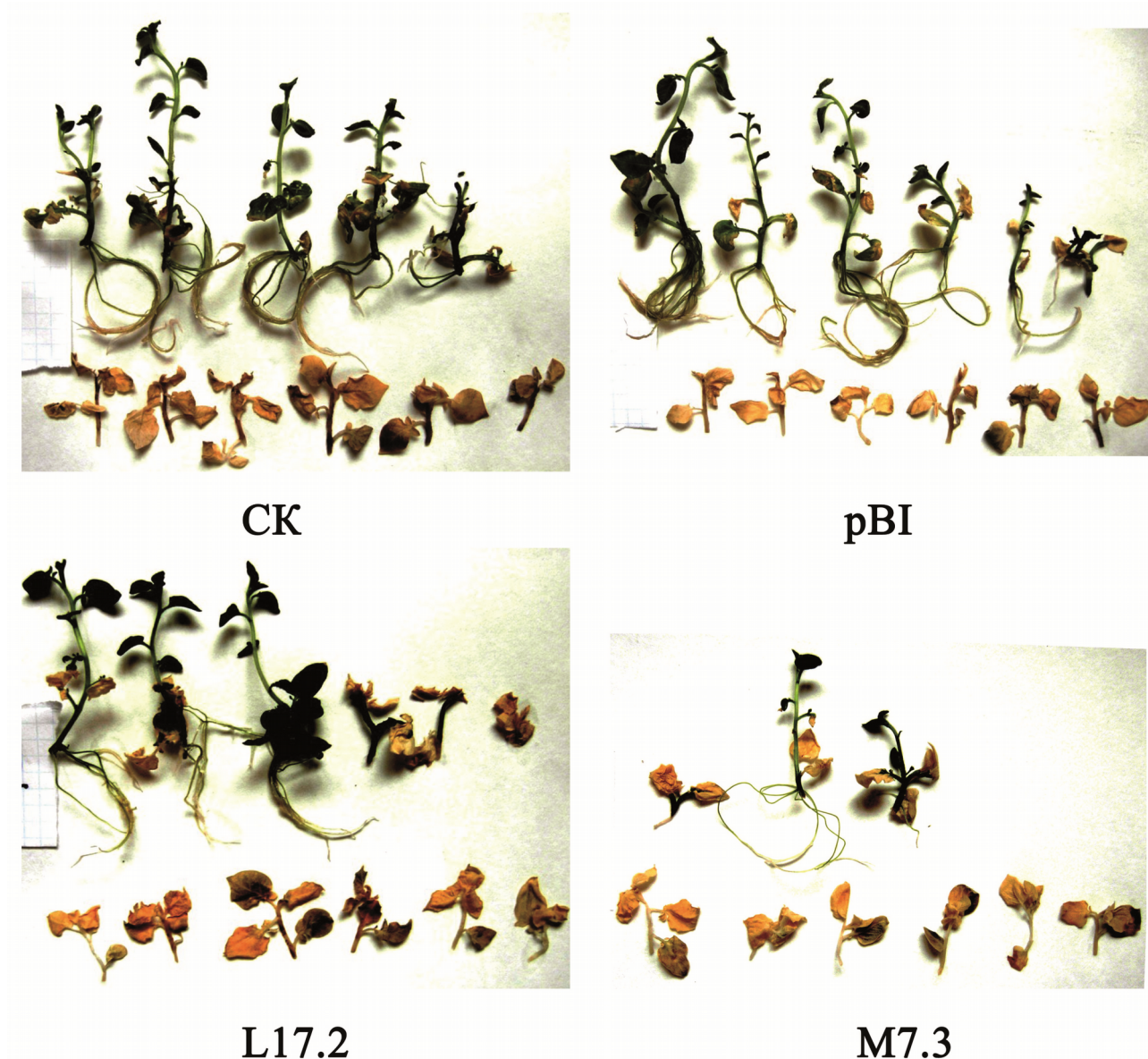


Figure 5. Влияние температурных обработок на пробирочные растения картофеля. Нижние ряды – растения получили обработку 50 °С, 90 мин. Верхние ряды – растения получили обработку 50 °С, 90 мин после предварительного 2-часового прогрева при 37 °С.

DISCUSSION

Трансформация растений картофеля геном *gox* привела к различным биологическим последствиям. Трансформированные растения раньше контрольных выходили из состояния покоя. Известно, что перекись водорода используется для ускорения прорастания картофеля (Bajji *et al.*, 2007). Возможно, образующаяся под влиянием глюкозооксидазы перекись водорода у трансгенов вызывает этот эффект. Количество клубней у трансформированных геном глюкозооксидазы растений несколько

увеличивалось, а средний вес клубня снижался. Следует отметить, что подобный эксперимент для уверенного заключения необходимо повторить при выращивании без ограничений по объему сосуда. Возможно, при выращивании в благоприятных условиях, можно получить иные результаты. Рост пробирочных трансгенных растений с высокой активностью *gox* тормозился в сравнении с нетрансформированными.

Особый интерес представляло для нас определить влияние повышенного содержания H_2O_2

на устойчивость растений к тепловому шоку. Умеренное и кратковременное повышение концентрации АФК является важным сигнальным событием при реакции на стресс и индукции адаптивной реакции. Концентрация АФК в клетке может измениться не только в результате работы механизмов стресс-реакции, но и при работе специально введенных в клетку агентов, одним из которых может быть фермент глюкозооксидаза, кодируемая геном *gox*. Увеличение концентрации H_2O_2 в результате гиперэкспрессии *gox* в картофеле увеличивало устойчивость растений к патогенам (Wu *et al.*, 1995), в трансгенном рисе экспрессия *gox* также вызывала увеличение концентрации H_2O_2 и повышение устойчивости к патогенам, причем это происходило при увеличении активности PR-генов риса (Kachroo *et al.*, 2003).

Ранее Maruthasalam с соавт. (2010) было показано, что растения табака с геном *gox* выдерживают холодовой стресс при температуре $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 12 часов, в то время, как растения исходной линии при таких условиях погибают. Установлено, что повышенная устойчивость к низкой температуре, вероятно, связана с активацией системы антиоксидантной защиты трансгенного табака (Maruthasalam *et al.*, 2010). Однако в наших экспериментах, трансгенные растения, напротив, оказались менее устойчивы к действию температурного фактора, как изначально, так и после предадаптации при умеренном тепловом стрессе. Вероятно, постоянно повышенный уровень пероксида водорода нарушает работу сигнальных систем, которые отвечают за адаптацию клеток к повышенной температуре, и поэтому адаптация происходит не в полной мере, а повышенная активность антиоксидантной системы, возможно, не имеет такого важного значения при гипертермии, как при действии холода на теплолюбивые растения. Вопрос о базовой устойчивости к гипертермии трансгенов нуждается в дополнительном исследовании. Ранее мы показывали, что синтез Hsp17.6C-2 при контрольной температуре у растений трансгенного картофеля был выше, чем у контроля (Borovskii *et al.*, 2015), что обычно связано с ростом устойчивости к тепловому шоку, однако в данной

работе произошло снижение устойчивости. Далее мы планируем более подробно исследовать трансгенный по гену *gox* картофель для выяснения возможных причин снижения его термоустойчивости.

CONCLUSION

Трансформанты, содержащие ген глюкозооксидазы (М и L) оказались более чувствительны к жесткому температурному шоку ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 90 мин.), чем трансформант с пустым вектором (pBI) и не трансформированные растения (СК). Предварительный прогрев растений при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ значительно ослаблял повреждающее действие жесткого теплового шока. Это ослабление было наиболее значительным у нетрансформированных растений. Наименьшим ослабление было у М-трансформантов. Повреждение и отмирание растений после прогрева при $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ развивалось постепенно. Это позволяет предположить, что оно происходит по типу программируемой клеточной гибели. Несмотря на то, что линии М7.3 и L17.2 различались по интенсивности экспрессии глюкозооксидазы, они не различались по степени повреждающего действия на них жесткого теплового шока. Оценить степень зависимости терморезистентности от интенсивности экспрессии глюкозооксидазы можно будет более адекватно при использовании линий, трансформированных одинаковой генетической конструкцией, но отличающихся по интенсивности экспрессии целевого гена.

ACKNOWLEDGEMENTS

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ №16-54-00070 и БРФФИ Б16Р-050.

REFERENCES

- Bajji M., M'Hamdi M., Gastiny F., Rojas-Beltran J.A., du Jardin P. (2007) Catalase inhibition accelerates dormancy release and sprouting in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **11** (2), 121–131.
- Borovskii G.B., Lyubushkina I.V., Borovik O.A., Grabelnych O.I., Sauchyn D.V., Urbanovich O.Yu. (2015) Comparative analysis of some HSPs synthesis in leaves of transgenic potato plants with

- gene *gox* at high temperature. *J. Stress Physiol. and Biochem.*, **11** (4), 5–10.
- Fraley R.T., Rogers S.G., Horsch R.B., Sanders P.R., Flick J.S., Adams S.P., Bittner M.L., Brand L.A., Fink C.L., Fry J.S., Galluppi G.R., Goldberg S.B., Hoffmann N.L., Woo S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **80**, 4803-4807.
- Kachroo A., He Z., Patkar R. Zhu Q., Zhong J., Li D., Ronald P., Lamb C., Chattoo B.B. (2003) Induction of H₂O₂ in transgenic rice leads to cell death and enhanced resistance to both bacterial and fungal pathogens. *Transgenic Res.*, **12**, 577 -586.
- Kartel N.A., Kurochkina S.D., Zabenkova K.I. (1994) Effectivnost agrobakterialnoi transformacii razlichnykh genotipov kartofelia. *Dokl. ANB.*, **38** (2), 67-71. (in Russian).
- Lee Y.H., Yoon I.S., Suh S.C., Ki H.I. (2002) Enhanced disease resistance in transgenic cabbage and tobacco expressing a glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Plant Cell Rep.*, **20**, 857–863.
- Maruthasalam S., Liu Y.L., Sun C.M., Chen P.Y., Yu C.W., Lee P.F., Lin C.H. (2010) Constitutive expression of a fungal glucose oxidase gene in transgenic tobacco confers chilling tolerance through the activation of antioxidative defence system. *Plant Cell Rep.*, **29**, 1035-1048.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
- Sauchyn D.V., Paniush A.S., Kartel N.A. (2012) Sozdanie i analiz trasgennykh rastenii kartofelia i tabaka s genom *gox Penicillium funiculosum*. *Izvestiia NAN Belarusi*, **4**, 16–20. (in Russian).
- Sauchyn D.V., Paniush A.S., Kartel N.A. (2012) Razrabotka technologii otbora i analiza transgennykh rastenii kartofelia s genom *gox Penicillium funiculosum*. *Vestnik BGU. Ser. 2. Chimia, Biologia, Geografia*, **3**, 59–62. (in Russian).
- Sauchyn D.V., Paniush A.S., Kartel N.A. (2011) Geneticheskaya transformatsiya rastenii vektornymi konstruktsiyami s genom *gox Penicillium funiculosum*. In Kilchevsky, A.V. (ed.), *Molekuliarnaia i prikladnaia genetika*. Pravo i ekonomika, Minsk, Belarus, pp. 49–55. (in Russian).
- Sauchyn D.V., Veresova T.N., Mezhnina O.A., Paniush A.S., Viacheslavova A.O., Goldenkova-Pavlova I.V. (2015) Optimizatsiya kodonovogo sostava gribnogo gena *gox Penicillium funiculosum* dlia effektivnoi ekspressii v rasteniyakh *Solanum tuberosum*. *Izvestiia NAN Belarusi*, **1**, 50–56. (in Russian).
- Selvakumar P., Arvinth S., Maruthasalam S., Lin C.H. (2013) Disease resistance conferred by constitutive expression of a fungal glucose oxidase gene in transgenic tobacco plants. *Asian J. Plant Sciences*, **12** (3), 128-136.
- Wolff S.P. (1994) Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods in Enzymology*, **233**, 182–189.
- Wu G., Shortt B.J., Lawrence E.B., Len J., Fitzsimmons K.C., Levine E.B., Raskin I., Shah D. M. (1997) Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiol.*, **115**, 427–435.
- Wu G., Shortt B.J., Lawrence E.B., Levine E.B., Fitzsimmons K.C., Shah D.M. (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell*, **7**, 1357–1368.