



© З. Сташевски¹,
О. Н. Ильинская²

¹ Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Казань

² Казанский государственный университет, Казань

☼ *PVY^{NTN}-CP* ген белка оболочки некротического штамма Y-вируса картофеля (*YBK^{NTN}*) был перенесен в растения двух сортов картофеля *Solanum tuberosum L.* Минденеш и Самодий кифли с помощью агробактериальной трансформации. Экспрессия *PVY^{NTN}-CP* гена была выявлена в 33 (89 %) из 37 и 3 (75 %) из 4 канамицин-устойчивых регенерантов картофеля сортов Минденеш и Самодий кифли, соответственно. Степень устойчивости независимых линий трансгенных растений картофеля к двум штаммам вируса (*YBK^O*, *YBK^{NTN}*) варьировала от крайней устойчивости до полной восприимчивости. У трех линий трансгенных растений картофеля была показана крайняя устойчивость к обоим штаммам *YBK*.

☼ **Ключевые слова:** Y вирус картофеля; белок оболочки вируса; генетическая трансформация; трансгенные растения.

ВИРУСОУСТОЙЧИВОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ *SOLANUM TUBEROSUM L.*, НЕСУЩИХ *PVY^{NTN}-CP* ГЕН БЕЛКА ОБОЛОЧКИ Y ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ

☼ **Список сокращений:** 6-БАП — 6-бензиламинопурин, БО — белок оболочки, ИФА — иммуноферментный анализ, Кп — канамицин, Кпг — канамицин-устойчивые, М — трансформанты сорта Минденеш, МС — питательная среда Мурасиге и Скуг; МСКл — питательная среда для индукции образования микроклубней; МСКо — питательная среда для укоренения; МСП — питательная среда для регенерации побегов; НУК — 1-нафтилуксунная кислота, ПЦР — полимеразная цепная реакция, СК — трансформанты сорта Самодий кифли, Сх — цефотаксим, YBK — Y-вирус картофеля.

ВВЕДЕНИЕ

Уже в начале XX-го века специфические симптомы вырождения картофеля связывали с распространяемым тлями Y-вирусом картофеля (*YBK*). *YBK* является одним из наиболее распространенных и вредоносных вирусов картофеля. У него обнаружен ряд штаммов (*YBK^O*, *YBK^N*, *YBK^C*, *YBK^Z*, *YBK^{NTN}*, *YBK^{N-Wilga}*), отличающихся симптомами и степенью поражения растений картофеля (Шуберт с соавт., 2004). В Западной Европе долгое время наибольший ущерб картофелеводству приносил штамм *YBK^O*, однако в 50-е годы прошлого века в некоторых местностях он был полностью вытеснен штаммом *YBK^N*. Общевропейской проблемой штамм *YBK^N* стал в середине 70-х годов XX века (Weidemann, 1988). В 1980-х годах в Европе обнаружены два новых штамма: *YBK^{NTN}* и *YBK^{N-Wilga}*. *YBK^{NTN}* впервые описан в Венгрии (Veczner et al., 1984), он вызывает на клубнях картофеля кольцевые некрозы. По своим свойствам он относится к группе некротических штаммов, по этому получил название *YBK^{NTN}*. В настоящее время данный штамм обнаружен в большинстве стран Европы, северной Америки и Азии (Шуберт с соавт., 2004). В результате экспансии некротических штаммов *YBK* многие хорошо известные сорта картофеля потеряли свою привлекательность для картофелеводства (Hogvath et al., 1999; Шуберт с соавт., 2004).

У культивируемых сортов и диких видов картофеля *Solanum spp.* обнаружено большое разнообразие типов, форм и степеней устойчивости к вирусам. Наиболее ценным типом устойчивости является крайняя устойчивость к вирусам, контролируемая главными генами (Pосс, 1989; Solomon-Blackburn et al., 2001-a).

В 1986 году были получены устойчивые к вирусу табачной мозаики растения *Nicotiana tabacum L.*, трансформированные конструкциями с геном, кодирующим белок оболочки (**БО**), (Powell-Abel et al., 1986). Впоследствии для создания трансгенной вирусостойчивости были использованы разные фрагменты генома самого вируса — гены, кодирующие белок оболочки вируса, транспортный белок вируса, белок вирусной репликазы, белок вирусной протеазы, рибозимы. Кроме этого для создания вирусосу-

Поступила в редакцию 27.03.2009
Принята к публикации 12.10.2009

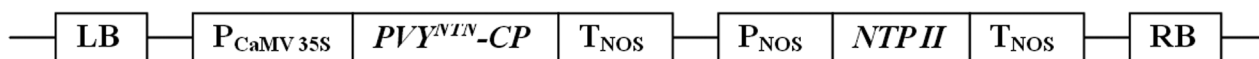


Рис. 1. Схема Т-ДНК вектора для экспрессии *PVY^{NTN}-CP* гена в растениях.

Структура Т-ДНК вектора, использованного для получения трансгенных растений картофеля. LB и RB — левая и правая границы Т-ДНК, соответственно; $P_{CaMV 35S}$ — 35S промотор вируса мозаики цветной капусты; *PVY^{NTN}-CP* — ген белка оболочки *PVY^{NTN}*, T_{NOS} — терминатор гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*, P_{NOS} — промотор гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*, *NTP II* — ген неомицин-фосфотрансферазы II, селективный маркерный ген для растений.

стойчивых трансгенных растений были использованы и другие нуклеотидные последовательности: ген анти-вирусного белка *Phytolacca americana*, ген крысиной 2'–5'-олигоденилат синтазы, ген дрожжевой РНК-специфичной рибонуклеазы рис. 1, гены, кодирующие антитела млекопитающих. Защита от вирусной инфекции может быть обусловлена экспрессией вышеперечисленных последовательностей, самим трансгеном или его РНК-транскриптом (Solomon-Blackburn et al., 2001-b; Harrison et al., 2005).

Среди всех функциональных последовательностей вируса для трансформации растений наиболее широко используется ген БО вируса. БО опосредованная устойчивость была получена для вирусов различных таксономических групп в разных растениях (Lawson et al., 1990; Feher et al., 1992; Gonsales et al., 1993; Okamoto et al., 1996; Beachy, 1997; Hassairi et al., 1998; Romano et al., 2001).

Обобщая литературные данные, можно сделать вывод, что экспрессия гена БО вируса в трансгенных растениях дает высокую степень устойчивости к вирусу, ген БО которого был использован для трансформации, а также к другим близкородственным вирусам. Целью данной работы явилось повышение вирусоустойчивости перспективных сортов картофеля с помощью генно-инженерных методов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус и генная конструкция

Для создания генной конструкции был использован *PVY-N* Венгерский изолят некротического штамма *YBK^{NTN}*, вызывающий образование кольцевых некрозов на клубнях картофеля (Veszteg et al., 1984). Коллар с соавторами (Kollar et al., 1993) *PVY^{NTN}-CP* ген белка оболочки *YBK^{NTN}* (Thole et al., 1993) был клонирован в вектор pGA482 (An et al., 1986) для трансформации растений. Созданная генная конструкция *pGAYHCP* в пределах Т-ДНК области содержит ген *PVY^{NTN}-CP* под контролем промотора $P_{CaMV 35S}$ вируса мозаики цветной капусты и селективный маркерный ген *NTP II* для растений, обуславливающий устойчивость к антибиотику канамицину (рис. 1). Трансформацию растений картофеля проводили с использованием Gram-C58C1 (Rif^r) штамма *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski et al., 1983).

Растения и трансформация

Асептические, безвирусные растения картофеля (*Solanum tuberosum L.*) сортов Минденеш и Самодий кифли, были получены из Института селекции картофеля (г. Кестхей, Венгрия). Нетрансформированные растения картофеля выращивали на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) (Murashige et al., 1962), содержащей 2 % сахарозы и 0,8 % агара, pH 5,7. В качестве эксплантов для ко-культивации с *A. tumefaciens* использовали микроклубни картофеля. Микроклубни получали в асептической культуре на микрочеренках растений картофеля, высаженных на питательной среде для индукции образования микроклубней (МСКл), приготовленной на основе питательной среды МС, с добавлением 6 % сахарозы, 2,5 мг/л кинетина согласно методу, описанному Боркю с соавт. (Borjue et al., 1987). Перед посадкой удаляли $\frac{3}{4}$ листа микрочеренков. Колбы (100 мл) с пятью микрочеренками инкубировали при +19 °С в темноте. Трансформацию дисков микроклубней и регенерацию растений картофеля проводили согласно указаниям Ишида с соавт. (Ishida et al., 1989). Микроклубни разрезали на диски толщиной в 2–5 мм в стерильных условиях и помещали в чашки Петри на питательную среду для регенерации побегов (МСП), приготовленную на основе питательной среды МС, содержащей 3 % сахарозы, 1 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л НУК (Ishida et al., 1989). В течение 2 суток диски микроклубней преинкубировали при 16-часовом световом периоде и температуре +23 °С. Культуру микроорганизмов *A. tumefaciens* для инокуляции готовили в жидкой питательной среде Лурия-Бертани Броф (Miller, 1972) без добавления антибиотиков на ротационной термостатируемой качалке (50 оборотов/мин.) в течение 15 часов при +28 °С. На диски микроклубней наносили 5–10 мкл ночной культуры бактерии *A. tumefaciens*. После двухдневной инкубации в темноте при температуре +23 °С диски микроклубней в течение 30 минут отмывали в растворе цефотаксима (Сх) (500 мг/л). Раствор с дисков микроклубней удаляли стерилизованной фильтровальной бумагой. Экспланты переносили в колбы (100 мл) на питательную среду МСП, содержащую 500 мг/л Сх, 100 мг/л канамицина (Км). В одну колбу помещали 5–8 микродисков клубней, в зависимости от их размера. По восемь неинокулированных *A. tumefaciens* эксплантов каждого сорта использовали в виде контроля. Четыре из них высаживали на питательную среду МСП, для контроля ре-

генерации побегов на данной среде. Оставшиеся четыре помещали на питательную среду МСП + Сх (500 мг/л) + Км (100 мг/л), для контроля действия селективного агента на регенерацию побегов и селекцию трансформантов. Пересадку дисков микроклубней, на свежую питательную среду МСП, проводили каждые две недели. Регенерировавшие побеги размером 1–2 см срезали и помещали на питательную среду для укоренения (МСКо), приготовленную на основе питательной среды МС, содержащую 2 % сахарозы, 0,1 мг/л НУК, 300 мг/л Сх, 50 мг/л Км (Ishida et al., 1989). Укоренившиеся Км^r-растения высаживали в стерильную почву и помещали в теплицу.

Определение интеграции PVY^{NTN}-CP гена в геном Км^r-регенерантов картофеля

Экстракцию растительной ДНК проводили согласно методике, описанной Рубино с соавт. (Rubino et al., 1992). ПЦР проводили в условиях, отработанных при изучении трансгенных растений табака (Jozsa et al., 2002). Праймеры 5'-САТТГСТСГАГТАТГСТС САСАГС-3', гомологичные нуклеотидам 8776-8800 и 5'-СГТССГГАГАСАСТАСА-3', комплементарные нуклеотидам 9376-9394, подобранные из последовательностей гена БО и 3NTR YBK^{NTN}, амплифицируют последовательность ДНК длиной в 618 п. н. Схема ПЦР: 1) 94 °С — 4 мин.; 2) 94 °С — 1 мин.; 3) 56 °С — 1 мин.; 4) 72 °С — 2 мин. Шаги 2–4 повторяли 40 раз. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле.

Определение экспрессии PVY^{NTN}-CP гена в трансгенных растениях картофеля

Трансляцию PVY^{NTN}-CP гена в Км^r-регенерантах картофеля изучали с помощью Вестерн-блот анализа. Для приготовления белкового экстракта у тепличных растений картофеля брали по два листовых диска (≈20 мг), вырезанных с помощью крышки пробирки «Эппендорф». Белковые экстракты растений фракционировали в 12 % полиакриламидном геле, переносили на мембрану (Нубоп-С). БО YBK^{NTN}, в исследуемых образцах трансгенных растений, выявляли с помощью антител, специфичных к YBK, сопряженных с щелочной фосфатазой (Anti-potato virus Y-antibody-AP-conjugate Boehringer Mannheim GmbH Cat No. 647 420) (Sambrook et al., 1989). В качестве положительного контроля использовали нетрансформированные инфицированные YBK^{NTN} растения картофеля, в качестве отрицательного — нетрансформированные, свободные от вирусов растения картофеля.

Иммуноферментный анализ

ИФА проводили, с использованием поликлональных антител к YBK (Loewe Biochemica GmbH) согласно методике, описанной Кларк и Адамс (Clark et al., 1977).

Первичный анализ вирусоустойчивости трансгенных растений картофеля в тепличных условиях.

Для оценки вирусоустойчивости вегетативное потомство (клубни) Км^r-регенерантов высаживали в теплице.

Каждая независимая линия была представлена 5-ю растениями. В виде положительного контроля инокуляции были высажены нетрансформированные, свободные от вирусов сорта картофеля Минденеш и Самодий кифли, по 5 растений каждого сорта. Для искусственного заражения растений картофеля были использованы очищенные вирусные препараты двух штаммов YBK: YBK^{NTN} (изолят D-10) и YBK^{O/C} (изолят Ка-49). Инокулят готовили с помощью разведения очищенного вирусного препарата в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,2) до конечной концентрации вирусных частиц в растворе 5 и 20 мкг/мл. Инокуляцию проводили на стадии 4-х листочков методом механической инокуляции — нанесения инокулята стеклянным шпателем на посыпанные карборундом листья третьего яруса. На 36 день после инокуляции проводили визуальную оценку развития симптомов вирусной болезни. На 37 день после инокуляции проводили изучение растений на скрытую зараженность YBK методом ИФА и с помощью биотеста на индикаторных растениях межвидового гибрида А6 *S. demissum* × *S. tuberosum*. Отделенные листья гибрида А6 обрабатывали соком исследуемых трансгенных и контрольных растений с помощью механической инокуляции. Соком одного изучаемого растения обрабатывали по два листа тестерного растения. Инокулированные листья инкубировали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге при комнатной температуре. Учет симптомов проводили на 7-й день после обработки.

Определение вирусоустойчивости трансгенных растений картофеля в полевых условиях

Исследуемые трансгенные растения картофеля были высажены на небольших делянках, окруженных рядами кукурузы. Схема посадки следующая: 1) борозда с нетрансформированными растениями сорта Самодий кифли, зараженными YBK^{NTN}; 2) борозда с изучаемыми трансгенными растениями картофеля; 3) борозда с нетрансформированными безвирусными растениями сортов Минденеш или Самодий кифли. Повторность двукратная. Длина борозды 5 м. На каждой борозде высаживали по 20 клубней. В течение вегетационного периода проводили наблюдения за развитием симптомов вирусной болезни, а также определяли скрытую зараженность растений YBK методом ИФА. Растительный материал для ИФА отбирали во время цветения и во время клубнеобразования (через 30 дней после первого срока отбора проб). Полученное вегетационное потомство изучаемых трансгенных растений использовали для повторения эксперимента в следующем вегетационном сезоне.

Определение вирусоустойчивости трансгенных растений картофеля методом прививки

Для инокуляции были взяты два побега от каждой исследуемой линии трансгенных растений картофеля и привиты на зараженные YBK^{NTN} растения табака *N. tabacum* L. Одновременно три побега зараженного YBK^{NTN} томата

Таблица 1

Результаты агробактериальной трансформации дисков микроклубней картофеля геном PVY^{NTN}-CP

Сорт картофеля	Микрочеренки	Микроклубни >3мм + <3мм	Количество, шт. (%)						
			Диски микроклубней	Ко-культив. с <i>A. tumefaciens</i>	Регенерировавшие растения				
					Контроль	Кпт-регенеранты	PVY ^{NTN} -CP (+)	БО (+)	
Минденеш	25	19 (76) ¹ + 3 (12) ¹	4+4 ⁴	41	7 (175) ²				0 (0) ²
Самодий кифли	25	14 (56) +9 (31)	4 (2) ⁵ +4 (2) ⁵	17 (4) ⁴	6 (150)	0 (0)	4 (23)	4 (100)	3 (75)
Всего	50	33+12	16	58	25	0	41	39	36

¹ — соотношение количества полученных микроклубней с количеством микрочеренков, высаженных на питательную среду для индукции клубнеобразования (%); ² — соотношение количества регенерировавших растений с количеством дисков микроклубней (%); ³ — соотношение количества PVY^{NTN}-CP (+) и БО (+) растений с количеством регенерировавших Кпт растений (%); ⁴ — 4 экспланта высаживали на МСП + 4 экспланта на МСП + Сх (500мг/л) + Кпт (100 мг/л); ⁵ — экспланты в виде целых микроклубней размером < 3мм.

были привиты на растения изучаемых линий трансгенного картофеля. Все подвой и привой были одного возраста и имели по 8–10 листьев. Накопление вирусных частиц в тканях инокулированных растений оценивали с помощью ИФА анализа. В виде контроля заражения YBK^{NTN} были использованы нетрансформированные безвирусные растения картофеля сорта Минденеш.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение микроклубней картофеля в условиях асептической культуры

Возможность регенерации растений была показана для эксплантов, приготовленных из разных органов и тканей картофеля. Согласно литературным данным (Ishida et al., 1989; Esna-Ashari et al., 1998) и по результатам собственных исследований (не опубликованы) высокой эффективности регенерации растений можно добиться при использовании для агробактериальной трансформации дисков микроклубней картофеля, полученных в асептической культуре. Данные экспланты обладают целым рядом преимуществ: 1) отсутствует необходимость стерилизации растительного материала; 2) прямо на поверхности микроклубней, в почках (глазках) находится недифференцированная ткань 3) ткани микроклубней являются достаточно молодыми, что значительно повышает возможность спонтанного эмбриогенеза; 4) возможность прямого побегообразования (Ishida et al., 1989). В течение первых 20–30 дней инкубации на питательной среде МСКл из пазушных почек микрочеренков кар-

тофеля вырастали 1–2 см столоны. В дальнейшем на свободном конце столона происходило формирование микроклубней. У кругло-клубневого сорта Минденеш формировались круглые микроклубни, которые в течение 30–40 дней достигли размера от 3 до 8 мм. Глазки (3–7 штук) были отчетливо видны и практически равномерно рассредоточены по всей поверхности. Из данных микроклубней готовили от 1 до 3 эксплантов, с помощью их разрезания на диски толщиной 2–5 мм (табл. 1).

Клубни сорта Самодий кифли имеют продолговатую форму, соотношение ширины и длины от 1:1,5 до 1:2. При использовании выше описанной методики индукции клубнеобразования в течение 30–40 дней у данного сорта сформировались длинные и тонкие микроклубни. Их длина составляла 10–20 мм, в то время, как толщина была всего лишь 1–3 мм. При увеличении продолжительности инкубации микрочеренков до 50–60 дней, микроклубни в длину росли на много быстрее чем в ширину. В конце инкубации на микроклубнях было 2–5 шт. отчетливо видимых глазков, причем большинство из них было сосредоточено на апикальном конце. В связи с этим, часть полученных микроклубней не разрезали на диски, а использовали целиком для ко-культивирования с *A. tumefaciens* (табл. 1).

Трансформация и регенерация растений

Эффективная и воспроизводимая на разных сортах картофеля система регенерации побегов является необходимым условием получения генетически модифицированных растений. Перспективным является метод прямой регенерации побегов из дисков клубней карто-



Рис. 2. Регенерация Kt^r-микрорастений картофеля сорта Минденеш на селективной канамицин (100 мг/л) содержащей среде

феля, исключая вероятность появления соматклонов (Ishida et al., 1989; Esna-Ashari et al., 1998).

Регенерация Kt^r-побегов на трансформированных эксплантах началась на 22 день их инкубации на Kt^r-содержащей селективной среде (табл. 1). Побегообразование на нетрансформированных (рис. 2) дисках микроклубней, инкубируемых на питательной среде МСП, началось на 20 день. В первую очередь побеги появились на более крупных и тонких (2–3 мм) дисках микроклубней, со срезами с обеих сторон. У трансформированных эксплантов регенерация Kt^r-побегов проходила исключительно по периметру диска, независимо от того одна или обе его стороны были срезаны (рис. 2). В случае нетрансформированных эксплантов образование побегов также в первую очередь проходило по периметру диска и только позже побеги появлялись из глазков, расположенных в апикальной части дисков микроклубней с односторонним срезом. На некоторых трансформированных дисках микроклубней с односторонним срезом происходил рост побегов из почек, расположенных в апикальной части экспланта. Данные побеги в течение одной недели с начала их появления обесцвечивались и погибали. Аналогично этому, побеги появлялись и погибали на контрольных нетрансформированных целых микроклубнях сорта Самодий кифли и дисках микроклубней обоих сортов с односторонним срезом, высаженных на питательную среду МСП + Сх (500мг/л) + Кт (100 мг/л). По периметру нетрансформированных дисков с двухсторонним срезом на селективной питательной среде побеги не образовывались. Данный факт свидетельствует о том, что

для агробактериальной трансформации более целесообразно использовать диски микроклубней картофеля с двухсторонним срезом и толщиной 2–3 мм. Целые микроклубни оказались менее всего пригодными для этой цели. Из 4 целых микроклубней с локальными надрезами, ко-культивированными с *A. tumefaciens* не удалось получить ни одного Kt^r-регенеранта. Kt^r-побеги, также не были получены из дисков микроклубней, выделенных из дистальной (столонной) части удлиненных микроклубней сорта Самодий кифли. По-видимому, в данном эксперименте микроорганизмы *A. tumefaciens* наиболее эффективно трансформировали недифференцированные клетки меристематической ткани, находящиеся в почках (глазках) дисков микроклубней. В тоже время у сорта Самодий кифли эффективность регенерации побегов с трансформированных и нетрансформированных дисков с двухсторонним и односторонним срезом, полученных из апикальной части микроклубней (с глазками), на МСП селективной среде и МСП без добавления антибиотиков, соответственно, была сопоставима с аналогичным процессом у сорта Минденеш (в табл. 1 не показано). Несмотря на это, нельзя исключить, что причина низкого выхода Kt^r-регенерантов у сорта Самодий кифли (23 %) кроется в реакции генотипа на условия агробактериальной трансформации и регенерации, так как у картофеля способность к регенерации побегов является генотип-зависимым процессом (Ishida et al., 1989; Heeres et al., 2002; Anjum et al., 2004).

Регенерацию Kt^r-побегов с трансформированных эксплантов проводили в течение 80 дней. Большинство

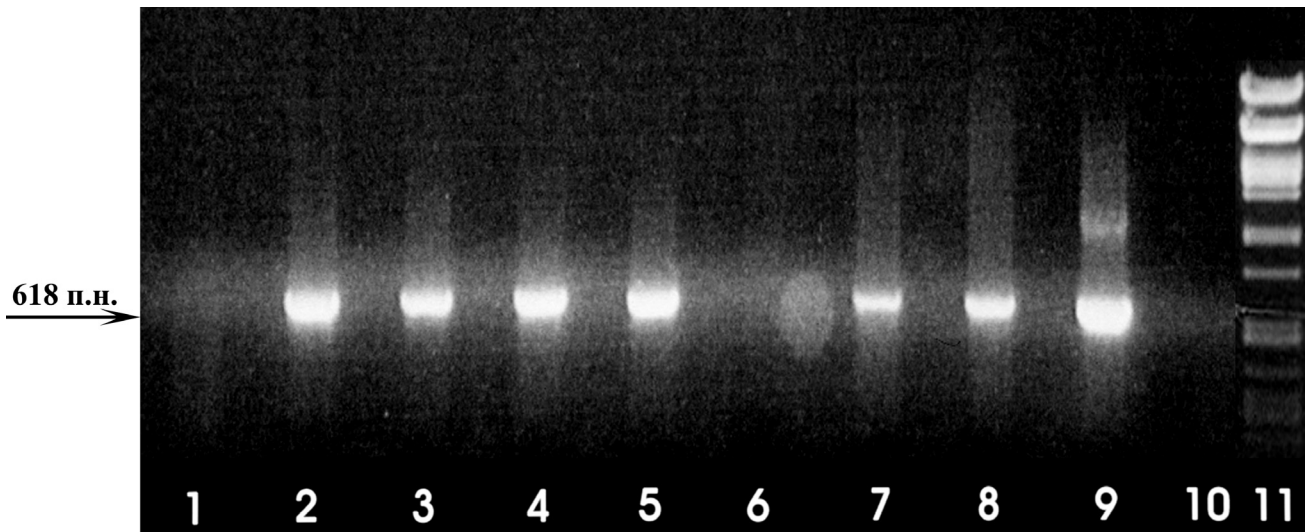


Рис. 3. ПЦР анализ Kpt^r -регенерантов картофеля сорта Минденеш на наличие $PVY^{NTN}-CP$ гена в трансформированных растениях.

1 — отрицательный контроль — нетрансформированное растение сорта М; 2–8 — ДНК Kpt^r -регенерантов картофеля М2 М3, М4, М5, М6, М7, М8; 9 — положительный контроль — ДНК плазмиды рGAYHCP; 10 — отрицательный контроль — ПЦР в отсутствие ДНК-матрицы; 11 — маркер молекулярной массы — ДНК фага λ , обработанная рестриктазой *PstI*.

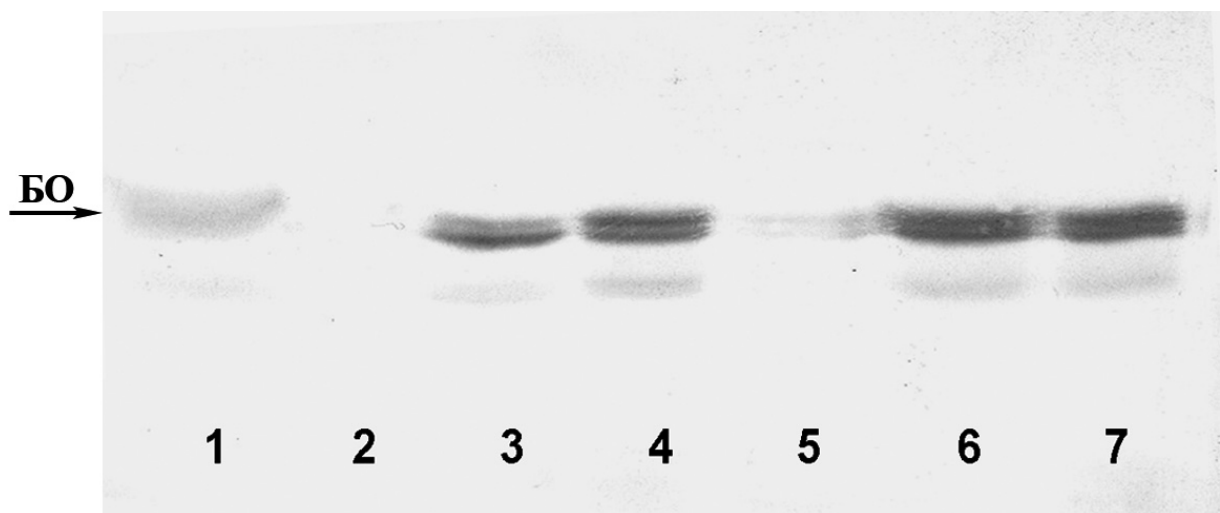


Рис. 4. Вестерн-блот анализ экспрессии $PVY^{NTN}-CP$ гена в Kpt^r -регенерантах картофеля сортов Минденеш и Самодий кифли.

2 — отрицательный контроль — экстракт белков нетрансгенного, свободного от вирусной инфекции растения; 3 — положительный контроль — экстракт белков нетрансгенного, PVY^{NTN} инфицированного растения; 1, 4–7 — экстракт белков Kpt^r -регенерантов картофеля М5, М11, М10, М12, М21.

регенерантов было получено в промежутке между 25–50 днями инкубации на Kpt -содержащей селективной среде. Всего было получено 37 Kpt^r -регенерантов сорта Минденеш и 4 — сорта Самодий кифли (табл. 1).

Молекулярный анализ Kpt^r -регенерантов картофеля

Интеграция $PVY^{NTN}-CP$ гена в полученных Kpt^r -регенерантах была показана методом ПЦР (рис. 3). В результате была установлена интродукция данного

гена в геном 35 Kpt^r -регенерантов сорта Минденеш и 4 устойчивых к канамицину регенерантов сорта Самодий кифли (табл. 1).

Экспрессия гетерологичного гена была показана методом Вестерн-блот гибридизации у 33 $PVY^{NTN}-CP$ растений картофеля сорта Минденеш и у 3 $PVY^{NTN}-CP$ растений картофеля сорта Самодий кифли (рис. 4, табл. 1). При вегетативном размножении полученных трансген-

Таблица 2

Результаты агробактериальной трансформации дисков микроклубней картофеля геном PVY^{NTN}-CP

Линии трансгенных растений картофеля, полученные из исходных сортов	Устойчивые / восприимчивые к YBK линии трансгенных растений картофеля,			
	Механическая инокуляция в теплице ¹		Искусственный инфекционный фон YBK ^{NTN} в поле	Прививка на инфицированные YBK ^{NTN} растения
	YBK ^{NTN}	YBK ^{O/C}		
Минденеш	3/32	3/32	3/32	3/32
Самодий кифли	0/4	0/4	0/4	—

Примечания: ¹ — 20 мкг/мл очищенного вируса.

Таблица 3

Результаты изучения уровня экспрессии БО и вирусоустойчивости некоторых трансгенных линий картофеля, несущих ген PVY^{NTN}-CP

Линии трансгенных растений картофеля	Уровень экспрессии БО	Количество инфицированных / высаженных растений, шт.			
		Механическая инокуляция в теплице ¹		Искусственный инфекционный фон YBK ^{NTN} в поле	Прививка на инфицированные YBK ^{NTN} растения
		YBK ^{NTN}	YBK ^{O/C}		
Самодий кифли ²	—	5/5	5/5	40/40	—
SK2	Высокий	5/5	5/5	37/37	—
Минденеш ²	—	5/5	5/5	38/38	—
M3	Высокий	5/5	5/5	40/40	—
M8	Низкий	5/5	5/5	40/40	—
M9	—	5/5	5/5	13/13	—
M10	Низкий	5/5	5/5	39/39	—
M11	Высокий	0/5	0/5	0/37	0/5
M12	Высокий	0/5	0/5	0/40	0/5
M15	Высокий	5/5	5/5	40/40	—
M21	Высокий	0/5	0/5	0/40	0/5

Примечания: ¹ — 20 мкг/мл очищенного вируса; ² — растения исходных нетрансгенных сортов.

ных растений методом микрочеренкования в асептической культуре и размножении клубнями, показали стабильное наследование целевого гена.

Определение вирусоустойчивости трансгенных растений картофеля

Согласно литературным данным степень устойчивости независимых линий трансгенных растений, полученных в результате трансформации одним и тем же геном растений одного генотипа, может варьировать от крайней устойчивости до восприимчивости (Smith et al., 1995; Romano et al., 2001).

При оценке на вирусоустойчивость нами были использованы 3 способа инокуляции растений картофеля: механическая инокуляция исследуемых образцов очищенным вирусным препаратом YBK, выращивание исследуемых образцов в поле на искусственном инфекционном фоне и прививка на инфицированные YBK растения (томат, табак) (Росс, 1989). Оценку пораженности исследуемых трансгенных растений осуществляли, ис-

пользуя комплекс методов вирусологического анализа: визуальную оценку, индикаторный метод, ИФА.

Механическая инокуляция исследуемых растений картофеля препаратом, содержащим 5 мкг/мл очищенного YBK, оказалась мало эффективной. Симптомы вирусной болезни были отмечены лишь на единичных растениях из числа нетрансформированных сортов и среди нескольких трансгенных линий. Обработка изучаемых образцов инокулятом, содержащим 20 мкг/мл очищенного YBK, позволила среди независимых линий трансгенных растений выявить полиморфизм по устойчивости к двум штаммам YBK (табл. 2, 3). В растениях, проявивших симптомы вирусной инфекции, параллельно было подтверждено наличие вирусов. В растениях 3 трансгенных линий (M11, M12, M21), не проявивших симптомов вирусной болезни, вирусы не были выявлены (табл. 2, 3).

Дальнейшее изучение вирусоустойчивости трансгенных растений картофеля проводили в полевых условиях на изолированных от внешней вирусной инфекции участ-

ках. Инокуляция исследуемых растений происходила за счет переноса крылатыми тлями вирусов от высаженных на параллельной борозде, *YBK^{NTN}* инфицированных растений сорта Самодий кифли. В результате двухлетних испытаний были выявлены 3 линии трансгенных растений картофеля (M11, M12, M21), которые не проявили симптомов вирусной инфекции и по результатам ИФА анализа были свободны от возбудителя болезни — *YBK* (табл. 2, 3). Положительный контроль заражения, растения нетрансгенных сортов картофеля Минденеш и Самодий кифли сильные симптомы вирусной болезни. Восприимчивые к *YBK* линии трансгенного картофеля, отличались друг от друга по интенсивности и степени развития симптомов вирусной инфекции.

Трансгенные растения линий M11, M12, M21, выделившихся по вирусоустойчивости в результате лабораторного и полевого опытов, были изучены с помощью инокуляции методом прививки на инфицированные *YBK^{NTN}* растения табака и томата. В ходе изучения на привоях и подвоях картофеля, принадлежащих трансгенным линиям M11, M12 и M21, ни симптомов вирусной болезни, ни вирусов не было обнаружено. В подвое табака и привое томата, а также подвое и привое нетрансформированного картофеля сорта Минденеш содержание вируса превышало значение в 10–14 и в 6–10 раз соответственно. Таким образом, у растений трансгенных линий картофеля M11, M12 и M21 не удалось вызвать вирусную инфекцию ни одним из выше перечисленных способов. Данный факт свидетельствует о том, что экспрессия *PVY^{NTN}-CP* гена в трансгенных растениях картофеля линий M11, M12 и M21 полностью подавляет развитие вирусной инфекции и они обладают крайней устойчивостью к *YBK*. Крайняя устойчивость предполагает отсутствие признаков заражения и накопления вирусов в растении (Росс, 1989).

Согласно литературным данным зависимость степени вирусоустойчивости трансгенных растений картофеля от уровня экспрессии БО носит неопределенный характер (Angenet et al., 1990; Smith et al., 1995). В настоящей работе экспрессия БО была подтверждена в 33 (89 %) и 3 (75 %) линиях Кп^r-регенерантов картофеля сортов Минденеш и Самодий кифли, соответственно. Высокий уровень экспрессии данного белка показан в 30 (81 %) и 2 (50 %) линиях трансгенных растений, полученных из сортов Минденеш и Самодий кифли, соответственно. В тоже время, вирусоустойчивыми оказались только 3 (8 %) линии трансгенных растений, полученные из сорта Минденеш. Как правило, в БО (+) трансгенных растениях высокая степень устойчивости достигается в результате многоуровневой защиты. Согласно литературным данным в растениях с высоким уровнем экспрессии интродуцированного БО вируса устойчивость против вирусной инфекции может действовать, по крайней мере, на двух уровнях. Во-первых, это блокирование процесса диссимиляции вирионов *YBK*, который необходим для

начала синтеза минус-цепи вирусной РНК. Блокирование диссимиляции может происходить в результате непосредственного взаимодействия БО с вирионом и/или посредством конкурентного связывания БО с факторами растения-хозяина, осуществляющими освобождение вирусной РНК из капсида. Во-вторых, экспрессия гена БО может включать в себя взаимодействия БО с вирусной РНК, необходимые для репликации вируса или сборки вирионов, взаимодействия с вирусными белками Nib и репликазой, а также активацию специфических рецепторов растения-хозяина, приводящую к индукции устойчивости к системной инфекции (Beauchy, 1997, Дьяков с соавт., 2001).

В восприимчивых к *YBK* БО (+) трансгенных растениях процесс блокирования инфекционного цикла *YBK*, возможно, недостаточно эффективен для полной защиты от размножения вирусов в клетках растения и дальнейшего их распространения по всему растению. Это может быть связано с тем, что на уровень защиты влияет не только уровень экспрессии гена БО, но и способность белка образовывать внутриклеточные вирусоподобные агрегаты, взаимодействовать с вирусной РНК, белками и рецепторами растения-хозяина (Дьяков с соавт., 2001). В свою очередь, данная способность зависит от третичной структуры гетерологичного БО, экспрессируемого в трансгенных растениях (Beauchy, 1997).

Все три линии БО (–) трансгенных растений (SK4, M9, M16) оказались восприимчивыми к *YBK*. Отсутствие детектируемого количества БО, может быть связано с феноменом пост-транскрипционного сплайсинга генов (Дьяков с соавт., 2001). В свою очередь, восприимчивость к вирусу у данных образцов может быть связана с недостаточным количеством (< 3) копий гетерологичного гена, интродуцированных в геном растения-хозяина (Goodwin et al., 1996). Причиной отсутствия экспрессии *PVY^{NTN}-CP* гена в трансгенных растениях картофеля, также может быть эффект положения интродуцированного гена в геноме растения хозяина (Wittner et al., 1998).

Сравнительное изучение трансгенных растений и растений исходного сорта Минденеш показало, что вирусоустойчивые трансгенные растения картофеля линий M11, M12 и M21 обладают всеми хозяйственно-ценными свойствами сорта Минденеш. Основными преимуществами данных образцов являются более высокая урожайность в условиях сильного вирусного инфекционного фона, достигающая 43 т/га по сравнению с 19 т/га у нетрансгенного сорта Минденеш, и отсутствие некротических колец вокруг глазков на клубнях вирусоустойчивых трансгенных растений. Таким образом, в данной работе было показано, что с помощью генетической трансформации можно вернуть привлекательность перспективным сортам картофеля, которые не использовались из-за восприимчивости к вирусным болезням.

Полевые эксперименты были проведены в соответствии с авторской лицензией № 54.570/3/2000. Работа выполнена в рамках программ UNESCO/BETCEN и Биотехнология 2000.

Литература

1. Дьяков Ю. Т., Озерецковская О. Л., Джавахия В. Г., Багирова С. Ф., 2001. Общая и молекулярная фитопатология. М.: Общество фитопатологов, 302 с.
2. Росс Х., 1989. Селекция картофеля. Проблемы и перспективы. М.: Агропромиздат, 182 с.
3. Шуберт Й., Рубенштайн Ф., Хрцановска М., Шпаар Д., 2004. К проблеме диагностики штаммов Y-вируса картофеля (PVY) // Вестник защиты растений. Т. 3. С. 3–10.
4. An G., Watson B. D., Chiang C. C., 1986. Transformation of Tobacco, Tomato, Potato, and *Arabidopsis thaliana* Using a Binary Ti Vector System // Plant Physiology. Vol. 81. P. 301–305.
5. Anjum M. A., Ali H., 2004. Effect of Culture Medium on Direct Organogenesis from Different Explants of Various Potato Genotypes // Biotechnology. Vol. 3. P. 187–193.
6. Angenent G. C., Van Den Ouweland J. M. W., Bol J. F., 1990. Susceptibility to virus infection of transgenic plants expressing structural and non-structural genes of tobacco rattle virus // Virology. Vol. 175. P. 191–198.
7. Beachy R. N., 1997. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants // Current Opinion in Biotechnology. Vol. 8. P. 215–220.
8. Beczner L., Horvath J., Romhanyi I., Förster H., 1984. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato // Potato Res. Vol. 27. P. 339–352.
9. Borque J. E., Miller J. C., Park W. D., 1987. Use of an *in vitro* tuberization system to study tuber protein gene expression // In Vitro Cellular and Development Biology Vol. 23. P. 381–386.
10. Clark M. F., Adams A. N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses // J. Gen. Virol. Vol. 34. P. 475–483.
11. Esna-Ashari M., Villiers T. A., 1998. Plant regeneration from tuber discs of potato (*Solanum tuberosum* L.) using 6-benzylaminopurine (BAP) // Potato Research. Vol. 41. P. 371–382.
12. Feher A., Skryabin G. K., Balazs E. et al., 1992. Expression of PVX coat protein gene under the control of extensin-gene promoter confers virus resistance on transgenic potato plants // Plant Cell Report. Vol. 11. P. 48–52.
13. Gonsalves D., Slightom J. L., 1993. Coat-protein-mediated protection: analysis of transgenic plants for resistance in a variety of crops // Semin. Virol. Vol. 4. P. 397–405.
14. Hansen J., Nielsen B., Nielsen S. V. S., 1999. *In vitro* shoot regeneration of *Solanum tuberosum* cultivars: interactions of medium composition and leaf, leaflet, and explant position // Potato Research. Vol. 42. P. 141–151.
15. Harrison B. D., Robinson D. J., 2005. Another quarter century of great progress in understanding the biological properties of plant viruses // Annals of Applied Biology. Vol. 146. P. 15–37.
16. Hassairi A., Masmoudi K., Albouy J. et al., 1998. Transformation of two potato cultivars 'Spunta' and 'Claustar' (*Solanum tuberosum*) with lettuce mosaic virus coat protein gene and heterologous immunity to potato virus Y // Limerick: Plant Sci. Vol. 136. P. 31–42.
17. Heeres P., Schippers-Rozenboom M., Jacobsen E., Visser R. G. F., 2002. Transformation of a large number of potato varieties: genotype-dependent variation in efficiency and somaclonal variability // Euphytica. Vol. 124. P. 13–22.
18. Horvath S., Wolf I., 1999. Virological problems of potato production in Hungary // Abstracts of the 14th Conference of the European Association of Potato Research P. 383–384.
19. Ishida B. K., Snyder G. W., Belknap W. R., 1989. The use of *in vitro* grown microtuber disks in Agrobacterium-mediated transformation of Russet Burbank and Lehi Russet potatoes // Plant Cell Report. Vol. 8. P. 325–328.
20. Jozsa R., Stasevski Z., Balazs E., 2002. High level of field resistance of transgenic tobaccos induced by integrated potato virus Y coat protein gene // Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica. Vol. 37 (4). P. 311–316.
21. Kollar A., Thole V., Dalmay T., Salamon, P., Balazs E., 1993. Efficient pathogen-derived resistance induced by integrated potato virus Y coat protein gene in tobacco // Biochimie. Vol. 75. P. 623–629.
22. Lawson C., Kaniewski W., Haley L. et al., 1990. Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: Resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank // Bio/Technology. Vol. 8. P. 127–134.
23. Miller J. H., 1972. Experiments in molecular genetics. New York.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. P. 184–193.
24. Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol Plant. Vol. 15. P. 473–497.
25. Okamoto D., Nielsen S. V. S., Albrechtsen M., Bork-Hardt B., 1996. General resistance against potato virus Y introduced into a commercial potato cultivar by genetic transformation with PVY^{coat} coat protein gene // Potato Res. Vol. 39. P. 271–282.
26. Powell-Abel P., Nelson R. S., De B., et al., 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express

- the tobacco mosaic virus coat protein gene // Science. Vol. 232. P. 738–743.
27. Romano E., Ferreira A. T., Dusi A. N. et al., 2001. Extreme resistance to two Brazilian strains of Potato virus Y (PVY) in transgenic potato, cv. Achat, expressing the PVY⁰ coat protein // Horticultura Brasileira. Vol. 19. P. 118–122.
 28. Rubino L., Carrington J. C., Russo M., 1992. Biologically active cymbidium ringspot virus satellite RNA in transgenic plants suppresses accumulation of DI RNA // Virology. Vol. 188. P. 429–437.
 29. Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T., 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 30. Wittner A., Palkovics L., Balazs E., 1998. Nicotiana benthamiana plants transformed with the plum pox virus helicase gene are resistant to virus infection // Virus Research, Vol. 53. P. 97–103.
 31. Solomon-Blackburn R. M., Barker H., 2001-a. A review of host major-gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato, genes, genetics and mapped locations // Heredity, Vol. 86. P. 8–16.
 32. Solomon-Blackburn R. M., Barker H., 2001-b. Breeding virus-resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches // Heredity, Vol. 86. P. 17–35.
 33. Thole V., Dalmay T., Burgyan J., Balazs E., 1993. Cloning and sequencing of potato virus Y (Hungarian isolate) genomic RNA // Gene. Vol. 123. P. 149–156.
 34. Weidemann, H.-L., 1988. Importance and control of potato virus YN (PVY^{YN}) in seed potato production // Potato Research. Vol. 31. P. 85–94.
 35. Zambryski P., Joos H., Genetello C. et al., 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity // EMBO J. Vol. 2. P. 2143–2150.

PVY^{NTN}-CP coat protein gene mediated virus resistance of transgenic potato plants

Z. Stasevski, O. N. Ilinskaja

☼ **SUMMARY:** PVY^{NTN}-CP coat protein gene from a necrotic strain of potato virus Y (PVY^{NTN}) has been transferred into two potato *Solanum tuberosum* L. cultivars *Mindenes* and *Somogyi kifli* via *Agrobacterium tumefaciens* transformation. Expression of integrated PVY^{NTN}-CP gene were confirmed for 33 (89 %) of 37 and 3 (75 %) of 4 kanamycin-resistant regenerants of potato cultivars *Mindenes* and *Somogyi kifli* respectively. The level of virus resistance against two virus strains (PVY⁰, PVY^{NTN}) of independent lines of transgenic potatoes varied between extreme resistance to susceptibility. The three independent lines of transgenic potatoes proved to be extreme resistant against both PVY strains.

☼ **KEY WORDS:** potato virus Y; virus coat protein; genetic transformation; transgenic plants.

☼ **Информация об авторах**

Сташевски Зенон — зав. лабораторией селекции картофеля.
ГНУ «Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства» Россельхозакадемии.
420059, г. Казань, Оренбургский тракт, 48
E-mail: zenons@bk.ru

Ильинская Ольга Николаевна — зав. кафедрой микробиологии,
д. б. н., профессор.
КГУ
420008, Россия, Казань, ул. Кремлевская 18.
E-mail: Olga.Ilinskaya@ksu.ru

Stasevski Zenon — head of the department.
Tatar research institute of agriculture.
420059, Kazan, Orenburgsky Trakt str., , 48
E-mail: zenons@bk.ru

Ilinskaja Olga Nikolaevna — head of the department, doctor of biological science, professor.
Kazan State University
Russia, 420008, Kazan, Kremlevskaya str., 18
E-mail: Olga.Ilinskaya@ksu.ru