

ЭКСПРЕССИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ГЕНА АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ *pro-SmAMP2* ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ К ВОЗБУДИТЕЛЯМ АЛЬТЕРНАРИОЗА И ФУЗАРИОЗА

© 2016 г. Е. М. Ветчинкина¹, В. В. Комахина¹, Д. А. Высоцкий¹, Д. В. Зайцев²,
А. Н. Смирнов², А. В. Бабаков¹, Р. А. Комахин¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва 127550

²Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева,
кафедра защиты растений, Москва 127550

e-mail: recombination@iab.ac.ru, anny.shirly@gmail.com

Поступила в редакцию 23.11.2015 г.

Ген *pro-SmAMP2* из растения мокрицы (*Stellaria media* L.) кодирует гевеин-подобные пептиды, обладающие *in vitro* антимикробной активностью по отношению к некоторым вредоносным микроорганизмам. Эти пептиды играют важную роль в защите растений мокрицы от инфекции, а кодирующий их ген ранее был использован для защиты трансгенных растений арабидопсиса и табака от фитопатогенов. В данной работе ген *pro-SmAMP2* под контролем вирусного промотора CaMV35S или под контролем собственного промотора *pro-SmAMP2* был трансформирован в растения культурного картофеля двух сортов, различающихся по устойчивости к альтернариозу: Юбилей Жукова (устойчивый) и Скороплодный (восприимчивый). Количественным методом ПЦР в реальном времени было показано, что трансгенные растения картофеля экспрессировали ген *pro-SmAMP2* под контролем обоих промоторов на уровне сопоставимом или превышающем уровень экспрессии гена актина картофеля. Методом оценки иммунного статуса трансформантов было показано, что экспрессия гена антимикробных пептидов *pro-SmAMP2* способна повышать устойчивость к комплексу фитопатогенов *Alternaria* sp. и *Fusarium* sp. только растений картофеля сорта Юбилей Жукова. В работе обсуждается возможная роль продуктов гена *pro-SmAMP2* в защите картофеля от *Alternaria* sp. и *Fusarium* sp.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, *Stellaria media*, трансгенные растения, картофель

DOI: 10.7868/S0016675816080142

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) — наиболее важная продовольственная культура в мире после пшеницы, риса и кукурузы. При этом картофель поражается различными фитопатогенными микроорганизмами, что приводит к экономически значимому уменьшению урожайности его клубней и снижению их качества [1]. Создание сортов с широкой и прочной устойчивостью к болезням является оптимальным способом для повышения валового сбора качественных клубней, а также для контроля над распространением болезней картофеля. Большинство известных генов расоспецифичной (вертикальной) резистентности способны придавать растениям картофеля кратковременную устойчивость, которая преодолевается с появлением новых рас фитопатогенов [2–4]. Для продления и расширения спектра устойчивости к высокоспециализированному патогену *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary в растения культурного картофеля были одновременно трансформированы несколько генов вертикальной устойчивости *Rpi-sto1*, *Rpi-vnt1.1* и *Rpi-blb3* из

родственных видов *S. stoloniferum*, *S. venturii* и *S. bulbocastanum* [5]. Однако не ясно, насколько долго и надежно эти гены смогут защищать растения культурного картофеля и не будут ли они способствовать появлению новых гибридных рас фитофторы. Кроме того, в отличие от *P. infestans* некоторые вредоносные микроорганизмы, например возбудитель серой гнили (*Botrytis cinerea*), являющийся неспециализированным фитопатогеном, способны поражать многие сельскохозяйственные растения вне зависимости от наличия в них генов вертикальной устойчивости.

С помощью генетической инженерии для повышения неспецифической устойчивости растений картофеля к болезням были использованы разнообразные гены антимикробных белков или пептидов из различных источников: микроорганизмов, позвоночных, растений [6–10]. Однако с экологической точки зрения для защиты картофеля целесообразно использовать гены растительного происхождения, кодирующие антимикробные белки или пептиды [11]. Трансгенные

растения картофеля, экспрессирующие ген дефензина из васоби (*Wasabia japonica* L.) под контролем вирусного промотора CaMV35S, имели повышенную устойчивость к серой гнили *B. cinerea* [10]. Показана задержка в развитии фитофторы на листьях растений картофеля, экспрессирующих под контролем промотора CaMV35S ген осмотина из табака (*Nicotiana tabacum*) [12]. Ген дефензина *alfAFP* из семян люцерны (*Medicago sativa*) способствовал повышению устойчивости картофеля к *Verticillium dahlia*, *Alternaria solani* и *Fusarium culmorum*, но не к возбудителю фитофтороза [13]. Повышенная экспрессия гена антимикробного пептида *SN1* из дикорастущего вида *Solanum chacoense* под контролем промотора CaMV35S повышала устойчивость трансгенных растений культурного картофеля к *Pectobacterium carotovorum* (*Erwinia carotovora*) и *Rhizoctonia solani* [14].

В целом для создания долговременной устойчивости в новых сортах картофеля целесообразно одновременно комбинировать (пирамидировать) несколько генов вертикальной и неспецифической резистентности к фитопатогенам. Однако в этом случае повышается вероятность нахождения в одном растении нескольких генов резистентности под контролем одного и того же промотора [8, 10]. Как следует из приведенных выше примеров, в трансгенных растениях картофеля для экспрессии генов неспецифической устойчивости использовался конститутивный промотор CaMV35S, созданный на основе промоторной области гена белка оболочки 35S вируса мозаики цветной капусты CaMV [15]. Важно отметить, что в генетических конструкциях для трансформации растений часто целевые и селективные гены в Т-ДНК находятся под контролем одного и того же промотора CaMV35S (например, pCambia 2301 или pCambia 1301). Промотор CaMV35S обеспечивает стабильный уровень экспрессии гетерологичных генов в растениях, но инфицирование трансгенных растений вирусом CaMV может приводить к сайленсингу гетерологичного гена под его контролем [16]. Кроме этого, при широком использовании промотора CaMV35S увеличивается вероятность инактивации экспрессии гетерологичных генов, находящихся под его контролем, благодаря эффекту гомологичной рекомбинации [17, 18]. Поэтому в современных исследованиях при создании генетически модифицированных растений картофеля для экспрессии зарекомендовавших себя положительно генов неспецифической устойчивости стали применяться разнообразные промоторы генов растений. Например, в трансгенных растениях культурного картофеля экспрессия гена антимикробного пептида *GSL2* картофеля находилась под контролем свето-индукционного промотора *Lhca3* из картофеля [19]. Таким образом, создание растений картофеля с повышенной неспецифической устойчивостью к

фитопатогенам за счет экспрессии генов антимикробных белков или пептидов под контролем растительных промоторов является актуальной задачей современных исследований.

Ранее из семян растения мокрицы (*Stellaria media* L.) было выделено два новых гевеин-подобных пептида SmAMP1.1a (CBJ21248.1) и SmAMP2.2a (CBJ21249.1), которые обладали высокой антигрибной активностью по отношению к ряду фитопатогенных грибов: *A. solani*, *A. consortiale*, *B. cinerea*, *Bipolaris sorokiniana*, *R. solani*, *F. culmorum*, *F. oxysporum* и *Thielaviopsis basicola* [20]. Высокий уровень антигрибной активности выделенных природных соединений предполагает их активную роль в защите семян и проростков мокрицы от почвенных фитопатогенных грибов. Нами было показано, что ген антимикробных пептидов *pro-SmAMP2*, кодирующий пептиды SmAMP1.1a и SmAMP2.2a, под контролем вирусного промотора CaMV35S может повышать устойчивость трансгенных растений арабидопсиса к *B. sorokiniana*, а трансгенных растений табака к *T. basicola* [20]. Оказалось также, что гетерологичная экспрессия гена *pro-SmAMP2* в томате приводила к небольшому повышению его устойчивости к возбудителю фитофтороза [21].

Кроме этого, нами был клонирован и изучен промотор гена *pro-SmAMP2* из мокрицы, который в агроинфицированных растениях *Nicotiana benthamiana* или в трансгенных растениях табака *Nicotiana tabacum* был по эффективности сравним или превосходил вирусный промотор CaMV35S [22, 23].

Цель настоящих исследований состояла в создании трансгенных растений картофеля с повышенной устойчивостью к некоторым фитопатогенам путем гетерологичной экспрессии в нем гена антимикробных пептидов *pro-SmAMP2* под контролем промотора *pro-SmAMP2* или вирусного промотора CaMV35S.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве источника гена *pro-SmAMP2* использовали растительный экспрессионный вектор pBI-SmAMP2, в котором ген *pro-SmAMP2* находится под контролем промотора CaMV35S [20]. С применением праймеров FW 5'-ACGCCATGGCTTACATACAAAAGCTAGTCACAC-3' и RV 5'-ACGCACGTGATTCCGTAGACTTGTGTATGATC-3', соответственно с сайтами рестрикции *NcoI* и *PmlI* была амплифицирована нуклеотидная последовательность гена *pro-SmAMP2*. Затем она была лигирована по сайтам рестрикции *NcoI* и *PmlI* в ранее созданную плазмиду p2120, содержащую делеционный вариант – 2120 пн промотора гена *pro-SmAMP2* [22, 23]. Фрагмент *EcoRI-PmlI* полученной плазмиды p2120-SmAMP2, содержащий

Таблица 1. Праймеры для молекулярно-биологического анализа трансформантов картофеля

Ген	Праймер	Последовательность (5'-3')	Ампликон, пн
<i>virE</i>	VirE-F	CGAATACATTCTCGTGCGTCAAACG	550
	VirE-R	TTTCGAGTCATGCATAATGCCTGA	
<i>pro-SmAMP2</i>	AMP-F	[20]	500
	AMP-R		
	real-f2	CTGTTTGCCTGATATGCCTAATC	100
	real-r2	TTCAATTTGCTTGGTTATAAGCCTC	
<i>Actin</i> (EU938079.1)	Act-f	AATGGAATTGCTGATAGAATGAGC	112
	Act-r	AGCCTCCAATCCAAACACTATAC	

ген *pro-SmAMP2* под контролем промотора *pro-SmAMP2*, был лигирован в плазмиду pCambia 2301 (Cambia, Австралия). Корректность сборки генетической конструкции pKm2120-SmAMP2 была проверена секвенированием. Генетические конструкции для трансформации растений были использованы для получения агробактериальных штаммов на основе *Agrobacterium tumefaciens* AGL0.

Для генетической трансформации использовали растения картофеля сорта Юбилей Жукова и сорта Скороплодный (любезно предоставлены ФГБНУ ВНИИХ им. А.Г. Лорха). В качестве эксплантов использовали молодые листья размером около 0,5 см² от асептически выращенных растений. При получении трансгенных растений в качестве базовой использовали питательную среду МС [24]. Кокультивацию листовых эксплантов с агробактериями проводили газонным методом на агаризованной среде с добавлением 0,1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП в течение трех суток при комнатной температуре в темноте. Для получения регенерантов экспланты переносили на среду с добавлением 1,4 мг/л зеатина, 0,02 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК) и 0,2 мг/л гиббереллина (GA₃) и культивировали при температуре 23°C, освещенности 10 клк и 16/8 ч фотопериоде. На первом пассаже для селекции трансформированных клеток растений использовали антибиотик канамицин в концентрации 50 мг/л, а для элиминации агробактерий антибиотик тиментин в концентрации 300 мг/л. Со второго пассажа концентрацию канамицина увеличили до 75 мг/л, а тиментина снижали до 150 мг/л. Полученные регенеранты растений переносили и селектировали на безгормональной среде с канамицином (100 мг/л).

Асептические растения картофеля выращивали при температуре 23°C, освещенности 10 клк и 16/8 ч фотопериоде, затем их адаптировали к почве в течение трех дней и выращивали в теплице для получения клубней при температуре 24°C, освещенности 15 клк и 12/12 ч фотопериоде.

Трансгенные растения картофеля, выращенные из клубней, для определения уровня экспрессии целевого гена и устойчивости к фитопатогемам растили при температуре 24°C, освещенности 15 клк и 16/8 ч фотопериоде.

Молекулярно-биологический анализ ДНК и РНК из трансформантов картофеля выполняли методом полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров (табл. 1) и в соответствии с профилем амплификации: 94°C – 5 мин; 94°C – 30 с; 60°C – 30 с; 72°C – 1 мин; циклов 30.

Суммарную РНК из трансформантов выделяли с использованием реагента Trizol (“Invitrogen”, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Для устранения примесей геномной ДНК препараты РНК обрабатывали ДНКазой RQ1 RNase-Free (“Promega”, США). Первую цепь кДНК получали методом обратной транскрипции с использованием олигонуклеотида oligodT (“Синтол”, Россия) в качестве затравки и РНК-зависимой ДНК-полимеразы M-MLV в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя фермента.

Оценку экспрессии гена *pro-SmAMP2* (праймеры real-f2 и real-r2) относительно величины экспрессии гена *Actin* (праймеры Act-f и Act-r) проводили в трехкратной повторности (табл. 1). ПЦР в реальном времени проводили на приборе CFX96™ (BioRad, США) в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I в объеме 25 мкл в соответствии с профилем: 94°C – 3 мин; 94°C – 15 с; 60°C – 15 с, 72°C – 30 с; 40 циклов. Специфичность амплификации после последнего цикла реакции проверяли анализом кривой плавления (от 55 до 95°C). Эффективность реакции определяли путем проведения ПЦР при разном разведении кДНК. Статистическую обработку данных ПЦР проводили с использованием программы qgene-96 [25]. Для расчета результатов использовали [$\Delta\Delta$ Ct] метод [26].

Иммунный статус трансформантов картофеля оценивали с использованием комплекса фитопа-

тогенных грибов *Alternaria* sp. и *Fusarium* sp. Известно, что в последние годы в Средней полосе России значительное поражение картофеля вызывает комплекс фитопатогенов, включающий виды родов *Fusarium* и *Alternaria* [27]. Комплексную культуру этих грибов выделили из сильно пораженных листьев картофеля в Московской области непосредственно перед инокуляцией, чтобы сохранить ее максимальную агрессивность — наиболее принципиальный показатель, необходимый для объективности проводимых экспериментов. Для инокуляции использовали листья растений картофеля, выращенных в теплице в течение восьми недель с момента высадки клубней. От трех до шести листьев каждого трансформанта и 7–9 листьев от трех контрольных растений картофеля исходного сорта помещали в чашки Петри, повреждали с помощью стерильной препарировальной иглы и в место поранений наносили по 50 мкл (10000 конидий/мл) суспензии комплекса патогенов. Чашки инкубировали при температуре 18–20°C во влажных камерах в течение 10 дней. На 7-е и 10-е сутки инкубирования определяли показатели поражения, которые переводили в баллы. Размер хлороза (РХ): 1 — хлороза нет; 2 — хлороз до 10% поверхности; 3 — 11–25% поверхности покрыто хлорозом; 4 — 26–50% поверхности покрыто хлорозом; 5 — 51–80% поверхности покрыто хлорозом; 6 — хлороз занимает 81–100% поверхности. Размер некроза (РН): 1 — некрозов нет; 2 — до 10% некротизировано; 3 — 11–30% некротизировано; 4 — 31–60% некротизировано; 5 — 61–90% некротизировано; 6 — 91–100% некротизировано. Интенсивность спороношения (ИС): 1 — спороношения нет; 2 — до 10% покрыто спороношением; 3 — 11–30% покрыто спороношением; 4 — 31–60% покрыто спороношением; 5 — 61–90% покрыто спороношением; 6 — более 90% покрыто спороношением. Инкубационный период 1 (ИП-1) — это период в сутках до появления первых признаков хлороза. Инкубационный период 2 (ИП-2) — это период в сутках до появления некроза. Латентный период (ЛП) — это период в сутках до появления спороношения [28]. На основе присвоенных баллов рассчитывали показатель итогового индекса агрессивности (ИИА) комплекса патогенов по формуле $ИИА = (РХ \times РН \times ИС) / (ИП-1 \times ИП-2 \times ЛП)$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Создание генетической конструкции, в которой ген антимикробных пептидов pro-SmAMP2 из растения мокрицы находится под контролем собственного промотора pro-SmAMP2

Ранее нами был получен и изучен делеционный вариант –2120 пн промотора *pro-SmAMP2* из растения мокрицы, который в трансформантах табака проявлял наиболее высокую активность относительно других изученных делеционных ва-

риантов этого промотора, а также в несколько раз превосходил по эффективности вирусный промотор CaMV35S [23]. Делеционный вариант –2120 пн промотора *pro-SmAMP2* находился в составе растительного экспрессионного вектора pCambia 1381Z, обозначенного нами как p2120, в котором контролировал экспрессию репортерного гена *gus* [22, 23]. В этот вектор вместо гена *gus* была вставлена нуклеотидная последовательность гена антимикробных пептидов *pro-SmAMP2* и получена плазмида p2120-*SmAMP2* (см. Материалы и методы). Плазмида pCambia 1381Z в составе Т-ДНК содержит селективный ген гигромицинофосфотрансферазы (*hptII*), придающий трансформированным клеткам растений устойчивость к антибиотику гигромицину, но который сравнительно редко используется для генетической трансформации картофеля. Поэтому экспрессионная кассета с геном антимикробных пептидов *pro-SmAMP2* под контролем делеционного варианта –2120 пн промотора *pro-SmAMP2* была перенесена из плазмиды p2120-*SmAMP2* в растительный экспрессионный вектор pCambia 2301, который в составе Т-ДНК содержит селективный ген неомицинофосфотрансферазы (*nptII*), придающий растениям устойчивость к антибиотику канамицину (рис. 1).

Полученная плазмида, обозначенная как pKm2120-*SmAMP2*, была перенесена в клетки агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL0, который был использован для генетической трансформации растений картофеля.

Получение трансгенных растений картофеля, экспрессирующих ген pro-SmAMP2 под контролем собственного промотора и под контролем вирусного промотора CaMV35S

Экспрессия генов антимикробных белков или пептидов в трансгенных растениях может повышать их устойчивость к фитопатогенам, но, как правило, не создает полного иммунитета к болезням. Степень повышения устойчивости от экспрессии гена антимикробного белка может различаться в зависимости от уровня исходной устойчивости к фитопатогенам у сорта, растения которого были использованы для генетической модификации. В данных исследованиях для генетической трансформации были выбраны два сорта картофеля Юбилей Жукова и Скороплодный. Эти сорта по данным оригинатора имеют среднюю или низкую устойчивость к фитофторе, но Юбилей Жукова устойчив также к альтернариозу и парше [29]. Сорт Юбилей Жукова был использован для генетической трансформации конструкцией pKm2120-*SmAMP2*, а сорт Скороплодный — созданной ранее плазмидой pBI-*SmAMP2*, в которой ген *pro-SmAMP2* находился под контролем вирусного промотора CaMV35S [20]. Трансформация двух сортов картофеля генетическими

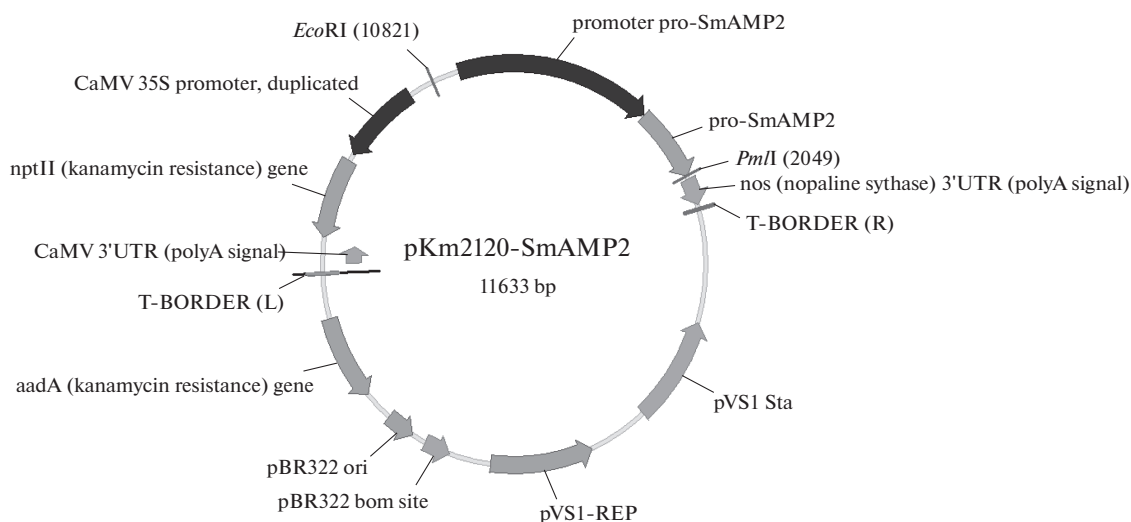


Рис. 1. Карта генетической конструкции pKm2120-SmAMP2, полученной на основе вектора pCambia 2301. Промотор pro-SmAMP2 (делеционный вариант –2120 пн) контролирует экспрессию гена антимикробных пептидов *pro-SmAMP2*. CaMV35S – вирусный промотор, *nptII* – ген неомицинфосфотрансферазы. T-Border – последовательности левой (L) и правой (R) границ T-ДНК. Обозначение остальных элементов доступно на сайте Института Cambia (Австралия).

конструкциями с разными промоторами для экспрессии гена антимикробных пептидов *pro-SmAMP2* предполагала в дальнейшем возможность комбинирования (пирамидирования) генов неспецифической устойчивости при минимальном риске их транскрипционной инактивации.

Для подбора оптимальных условий генетической трансформации была проведена серия экспериментов по определению гормонального состава питательных сред для эффективной регенерации побегов из сегментов листьев растений картофеля сортов Юбилей Жукова и Скороплодный. Было установлено, что в течение шести недель около 20–22% эксплантов обоих сортов картофеля были способны образовать морфогенный каллус при использовании питательной среды на основе солей МС [24] с добавлением гормонов зетина (1.4 мг/л), НУК (0.02 мг/л) и гиббереллина (0.2 мг/л). В дальнейшем в течение двух–трех месяцев на этой же питательной среде из морфогенных каллусов регенерировали многочисленные побеги. Полученные экспериментальные результаты свидетельствовали о возможности со-

здавать независимые трансформанты картофеля обоих сортов в необходимом количестве.

В результате агробактериальной трансформации растений картофеля генетическими конструкциями pKm2120-SmAMP2 и pBI-SmAMP2 были получены регенеранты, устойчивые к антибиотику канамицину в концентрации 100 мг/л (табл. 2).

Из табл. 2 следует, что при использовании обеих конструкций pKm2120-SmAMP2 и pBI-SmAMP2 соответственно только 37 и 33 из 160 взятых для экспериментов эксплантов формировали морфогенный каллус, на котором затем происходила регенерация устойчивых к канамицину побегов картофеля. От каждого каллуса, в зависимости от интенсивности укоренения на среде с канамицином, был взят один или два регенеранта для создания двух групп из независимых растений, обозначенных pR2120-SmAMP2 и pRBI-SmAMP2.

Молекулярно-биологический анализ растений pR2120-SmAMP2 и pRBI-SmAMP2 был проведен с использованием метода ПЦР. Для предупре-

Таблица 2. Агробактериальная трансформация растений картофеля

Конструкция	Экспланты, шт.		Канамицин-устойчивые растения, шт.
	ко-культивированные с агробактериями	регенерирующие канамицин-устойчивые побеги	
pKm2120-SmAMP2	160	37	62
pBI-SmAMP2	160	33	45

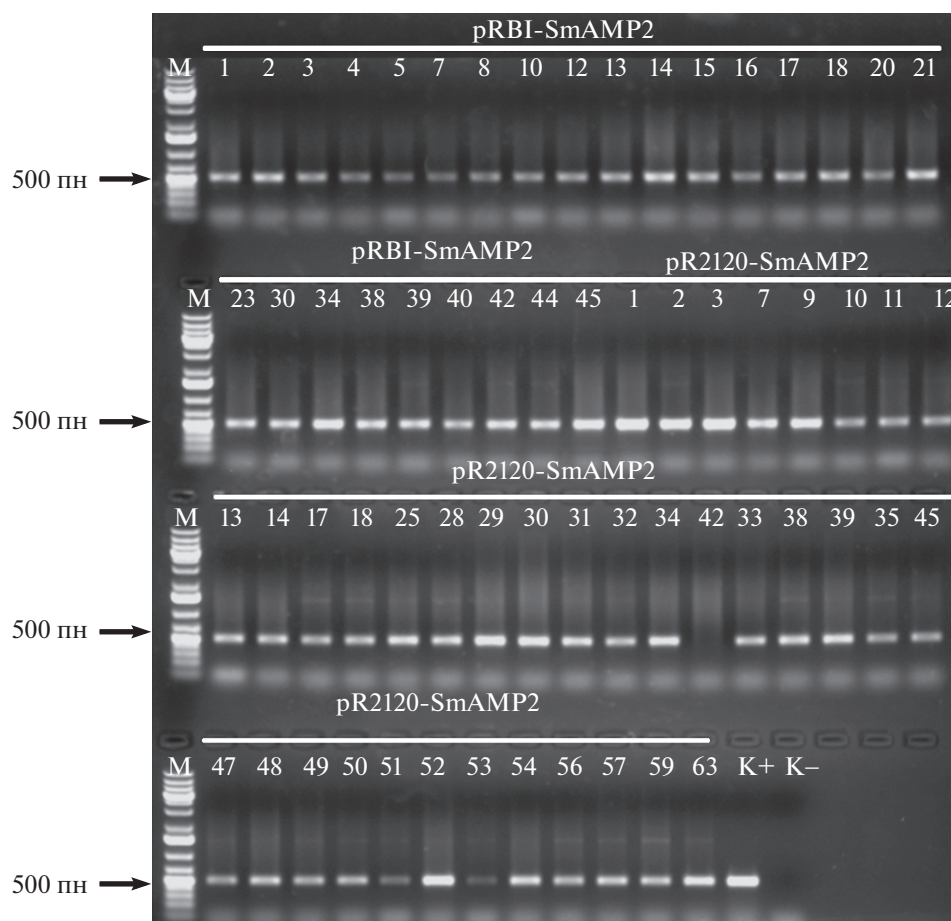


Рис. 2. Анализ ДНК регенерантов pR2120-SmAMP2 и pRBI-SmAMP2 методом ПЦР с праймерами к последовательности гена *pro-SmAMP2*. Здесь и далее цифрами указаны независимые растения, “К–” — отрицательный контроль (вода), “К+” — положительный контроль (pRBI-SmAMP2), М — маркер размера фрагментов ДНК.

ждения ложноположительных результатов все полученные нами 107 образцов ДНК из регенерантов (табл. 2) были предварительно проверены на отсутствие контаминации агробактериями с использованием специфичных праймеров VirE-F и VirE-R (табл. 1). В результате в препаратах тотальной ДНК у пяти растений из группы pR2120-SmAMP2 и у семи из группы pRBI-SmAMP2 была обнаружена последовательность агробактериального гена *virE*. Но если среди pR2120-SmAMP2 со всех 37 независимых эксплантов удалось отобрать не менее одного регенеранта без агробактериальной контаминации, то среди pRBI-SmAMP2 было только 26 независимых побегов свободных от агробактериальной инфекции, которые были отобраны для последующих экспериментов.

С использованием ПЦР и специфических праймеров AMP-F и AMP-R (табл. 1) было установлено, что все регенеранты картофеля, за исключением одного растения pR2120-SmAMP2 № 42, содержат полную нуклеотидную последо-

вательность гена антимикробных пептидов *pro-SmAMP2* (рис. 2).

Из рис. 2 следует, что при амплификации ДНК регенерантов со специфическими праймерами к последовательности гена *pro-SmAMP2* происходит образование ожидаемого по размеру ПЦР-продукта длиной около 500 пн. Растения картофеля, содержащие последовательность целевого гена, были обозначены как pT2120-SmAMP2 и pTBI-SmAMP2 и из асептических условий высажены в почву. Однако шесть трансгенных растений из группы pTBI-SmAMP2 и три из группы pT2120-SmAMP2 были не способны расти в условиях теплицы или имели выраженные аномалии в развитии (задержка в развитии, хлороз) и сильно отличались от растений исходного сорта. Причина этого, вероятно, связана с тем, что они содержали инсерции Т-ДНК в функционально значимых участках генома, повреждение которых не позволяло им полноценно вегетировать в почве.

Полученные результаты позволили оценить эффективность генетической трансформации

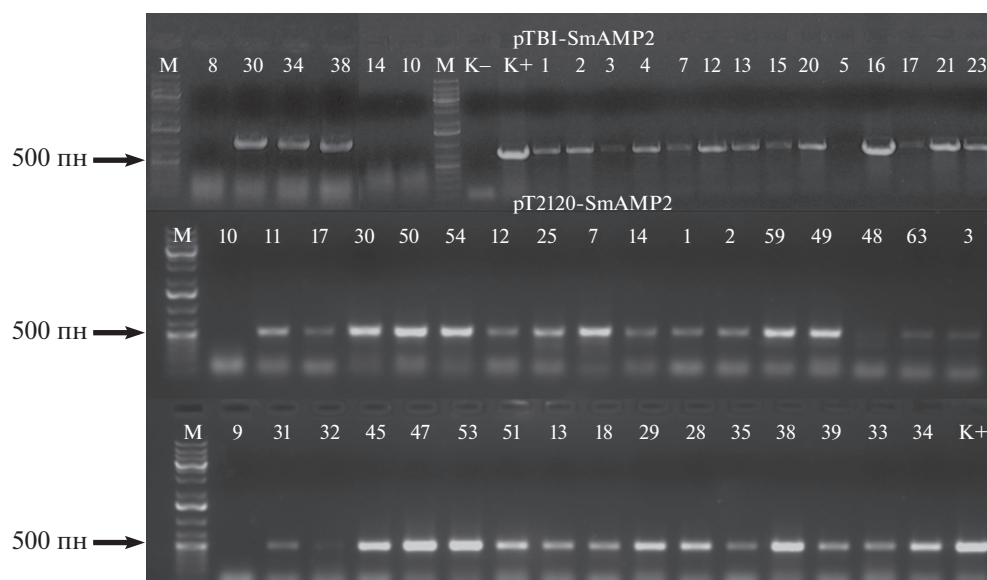


Рис. 3. Анализ кДНК из трансформантов pT2120-SmAMP2 и pTBI-SmAMP2 методом ПЦР с праймерами к последовательности гена *pro-SmAMP2*.

растений картофеля, которую рассчитывали как отношение количества эксплантов, регенерировавших трансгенные побеги, к общему числу эксплантов, взятых для ко-культивации с агробактериями. С учетом того, что часть регенерантов pRBI-SmAMP2 не была изучена молекулярно-биологическими методами из-за контаминации агробактериями, эффективность трансформации обеими конструкциями составила от 16.3 до 22.5%.

Для отбора трансгенных растений картофеля, экспрессирующих ген *pro-SmAMP2*, из растущих в почве образцов была выделена тотальная РНК. С ее использованием методом обратной транскрипции была получена кДНК, которая предварительно была использована для амплификации с праймерами Act-f и Act-r (табл. 1) к референсному гену актина картофеля, который представлен у всех растений. Этот предварительный экспериментальный этап был необходим для исключения в последующих экспериментах ложноотрицательных результатов при определении экспрессии целевого гена *pro-SmAMP2*. Было установлено, что при ПЦР с использованием препаратов кДНК от всех трансформантов происходит образование ожидаемого по размеру продукта около 100 пн (данные не приводятся).

Методом амплификации кДНК с праймерами AMP-F и AMP-R (табл. 1) в обеих группах pT2120-SmAMP2 и pTBI-SmAMP2 были обнаружены трансформанты, экспрессирующие полную последовательность гена *pro-SmAMP2* (рис. 3).

Как следует из рис. 3, только у 16 из 20 трансформантов pTBI-SmAMP2 (№ 1, 2, 3, 4, 7, 12, 13,

15, 16, 17, 20, 21, 23, 30, 34 и 38) при анализе обнаружился ПЦР-продукт гена *pro-SmAMP2* ожидаемого размера — около 500 пн. Одновременно из 33 трансформантов группы pT2120-SmAMP2 у 29 растений (№ 1, 2, 3, 7, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 25, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 38, 39, 45, 47, 49, 50, 51, 53, 54, 59 и 63) был выявлен ПЦР-продукт ожидаемой длины.

Полученные на основе одного сорта и растущие в теплице трансгенные растения картофеля, экспрессирующие ген *pro-SmAMP2*, по фенотипу могли различаться между собой и отличаться от нетрансгенных растений исходного сорта. В частности, трансформанты различались по количеству побегов, размеру листьев, интенсивности их пигментации, срокам цветения. Вероятно, эти различия были обусловлены не только инсерционным Т-ДНК мутагенезом или соматической изменчивостью, но и условиями адаптации растений при переносе из колб в почву, а также разной степенью развития корневой системы и побегов. Для того чтобы исключить влияние последних факторов на устойчивость растений к фитопатогенам и унифицировать возраст растений, было решено получить от трансгенных растений клубни. Однако часть трансформантов из обеих групп растений pTBI-SmAMP2 и pT2120-SmAMP2 была полностью не способна образовывать клубни, другая часть формировала мелкие клубни, которые не сохранились в период покоя. Из некоторых морфологически полноценных клубней массой 30–50 г при последующем прорастании формировались растения с замедленным ростом и развитием. В итоге для количественной оценки уровня экспрессии гена *pro-SmAMP2* и определе-

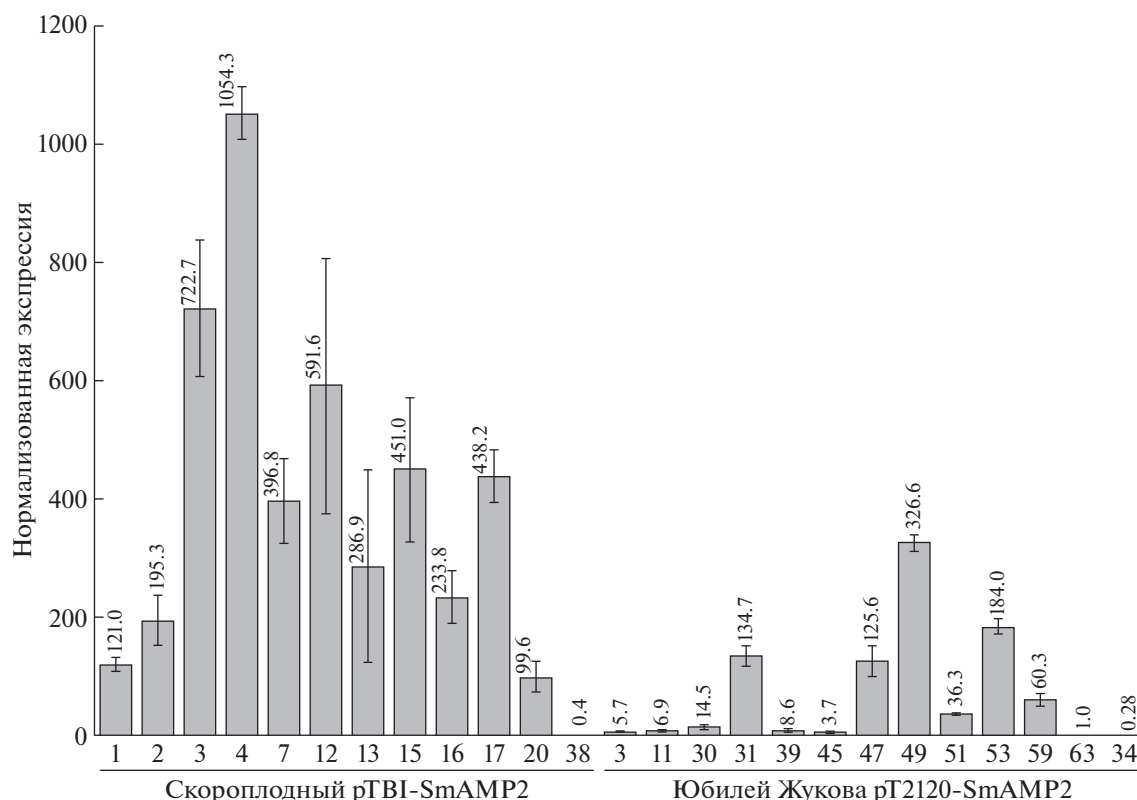


Рис. 4. Экспрессия гена *pro-SmAMP2* в листьях у трансгенных растений картофеля, нормализованная относительно экспрессии гена актина и измеренная методом ПЦР в реальном времени. Для индивидуальных трансгенных растений приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка. Группы трансгенных растений.

ния устойчивости к фитопатогенам было использовано 12 морфологически полноценных независимых трансгенных растений из группы рТВІ-SmAMP2 и 13 из рТ2120-SmAMP2.

Отобранные трансгенные растения картофеля растили в теплице в течение пяти месяцев в условиях длинного дня (16/8 ч). Поскольку сроки прорастания разных трансформантов могли различаться до полутора месяцев, первые измерения уровня экспрессии гена *pro-SmAMP2* в листьях растений проводили не ранее двух месяцев с момента высадки клубней в почву. Из листьев среднего яруса всех трансгенных растений картофеля была выделена тотальная РНК, которая была использована для получения кДНК и количественной оценки. Результаты измерения методом ПЦР в реальном времени экспрессии гена *pro-SmAMP2* относительно референсного гена актина картофеля показаны на рис. 4.

Как следует из рис. 4, уровень мРНК гена *pro-SmAMP2* во всех трансгенных растениях картофеля, за исключением растения № 38 из группы рТВІ-SmAMP2 и растений № 63 и 34 из рТ2120-SmAMP2, был выше, чем уровень мРНК гена “домашнего хозяйства” — актина картофеля. Эти результаты свидетельствуют, что вирусный

промотор CaMV35S и промотор гена *pro-SmAMP2* в растениях картофеля проявили себя как сильные промоторы. Однако в 11 из 12 трансгенных растений сорта Скороплодный, экспрессирующих ген *pro-SmAMP2* под контролем вирусного промотора CaMV35S, это превышение составляло от 99 до 1054 раз. Одновременно в 11 из 13 трансгенных растений сорта Юбилей Жукова, экспрессирующих ген *pro-SmAMP2* под контролем промотора *pro-SmAMP2*, оно было менее значимо и составляло от 3 до 326 раз.

Экспрессия гена pro-SmAMP2 в трансгенных растениях картофеля повышает их устойчивость к комплексу патогенов Alternaria sp. и Fusarium sp.

Оценку иммунного статуса трансгенных растений картофеля проводили с использованием комплекса фитопатогенных грибов *Alternaria sp.* и *Fusarium sp.*, одновременно с первым измерением уровня экспрессии гена *pro-SmAMP2* в листьях (рис. 4). В качестве сравнительного контроля использовали нетрансгенные растения картофеля сорта Юбилей Жукова и Скороплодный. Для каждого листа трансгенного или контрольного растения определяли такие показатели поражения, как размер хлороза, размер некроза, инкуба-

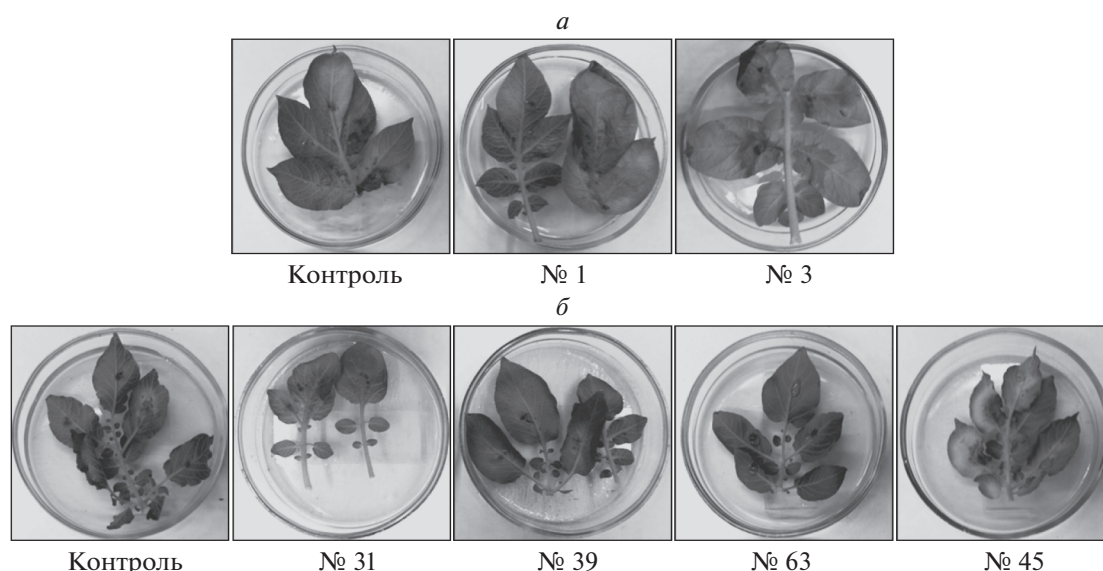


Рис. 5. Листья контрольных и некоторых трансгенных растений картофеля, экспрессирующих ген *pro-SmAMP2*, на 10-е сутки после инокуляции *Alternaria* sp. и *Fusarium* sp. *a* – группа Скороплодный pTBI-SmAMP2; *б* – группа Юбилей Жукова pT2120-SmAMP2. Контроль – нетрансгенные растения соответствующего сорта.

ционный период до появления первых признаков хлороза, инкубационный период до появления некроза, интенсивность спороношения, латентный период появления спороношения. На основе комплекса показателей поражения был рассчитан итоговый индекс агрессивности (ИИА) патогенов (см. Материалы и методы) для каждого индивидуального листа. На основании значений ИИА индивидуальных листьев рассчитывали средние значения для каждого трансгенного и контрольного растения. В целом меньшее значение ИИА свидетельствует о более высоком иммунном статусе у растений к фитопатогенам.

Первый учет ИИА проводили на 7-е сутки при проявлении симптомов поражения листьев всех контрольных растений, затем повторно на 10-е сутки. Две последовательные оценки ИИА позволяли измерить динамику нарастания поражения листьев растений. Для этого рассчитывали отношение значений ИИА на 10-е сутки к значениям ИИА на 7-е сутки для каждого индивидуального листа. На основании полученных отношений индивидуальных листьев определяли средние значения для каждого трансгенного и контрольного растения. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Из табл. 3 следует, что у контрольных растений сорта Юбилей Жукова ИИА на 7-е и 10-е сутки составляют соответственно 0.09 ± 0.03 и 0.15 ± 0.04 , что существенно ниже ($p = 0.05$), чем у контрольных растений сорта Скороплодный — 0.88 ± 0.23 и 1.48 ± 0.47 . Однако по динамике развития симптомов на листьях (Скороплодный 2.4 ± 0.9 и Юбилей Жукова 1.8 ± 0.2) эти два сорта

не отличаются, поскольку в обоих случаях с 7-е по 10-е сутки ИИА увеличился в среднем вдвое.

На 7-е сутки у отдельных трансгенных растений картофеля ИИА был ниже (Скороплодный № 16 и Юбилей Жукова № 31) или выше (Скороплодный № 3 и Юбилей Жукова № 3, 11, 34, 45, 47, 53 и 59), чем у соответствующих контрольных растений, но эти различия не были существенными (табл. 3).

На 10-е сутки не было отмечено трансгенных растений картофеля на основе сорта Скороплодный, у которых ИИА был бы ниже, чем у соответствующих контрольных растений (табл. 3, рис. 5, *a*). Одновременно среди этих растений образец № 3 имел ИИА выше, чем в контроле, но различия не были статистически значимы.

У трансгенных растений картофеля № 31, 39 и 63 на основе сорта Юбилей Жукова ИИА был ниже, чем у контроля, но только у образца № 31 эти различия были статистически существенными (табл. 3, рис. 5, *б*). Образцы из этой группы № 3, 34, 45, 47, 53 и 59 показали более высокий ИИА, чем у контрольных растений сорта Юбилей Жукова, однако только один из них (№ 45) по устойчивости был существенно хуже контроля (рис. 5, *б*).

Только у двух (№ 1 и 3) из 12 трансгенных образцов, полученных на основе сорта Скороплодный, итоговые индексы агрессивности с 7-е по 10-е сутки практически не изменились, и их соотношение составило, соответственно, 1.2 ± 0.2 и 1.1 ± 0.2 , что было несущественно ниже, чем у контрольных растений (табл. 3). Одновременно в этой группе у образца № 16 аналогичный показа-

Таблица 3. Значения итогового индекса агрессивности (ИИА) комплекса патогенов *Alternaria* sp. и *Fusarium* sp. в отношении растений картофеля

Образец			Число листьев	ИИА, балл		ИИА (10-е сутки): ИИА (7-е сутки)
сорт	группа			на 7-е сутки	на 10-е сутки	
Скороплодный	—	Контроль	7	0.88 ± 0.23	1.48 ± 0.47	2.4 ± 0.9
	pTbI-SmAMP2	1	6	1.31 ± 0.38	1.45 ± 0.61	1.2 ± 0.2
		2	4	1.41 ± 0.31	2.44 ± 0.55	1.8 ± 0.2
		3	3	3.08 ± 0.79	3.33 ± 0.88	1.1 ± 0.2
		4	3	0.79 ± 0.18	1.25 ± 1.0	1.5 ± 0.1
		7	3	1.90 ± 1.06	1.98 ± 1.0	2.1 ± 1.1
		12	6	1.12 ± 0.55	1.83 ± 0.65	2.0 ± 0.2
		13	5	0.94 ± 0.40	1.32 ± 0.34	1.8 ± 0.3
		15	4	1.09 ± 0.27	1.72 ± 0.13	1.7 ± 0.2
		16	6	0.19 ± 0.08	0.85 ± 0.22	7.0 ± 1.8
		17	4	0.82 ± 0.23	1.05 ± 0.25	1.4 ± 0.2
		20	6	0.83 ± 0.30	1.32 ± 0.36	2.5 ± 0.7
		38	6	1.08 ± 0.46	2.04 ± 0.60	3.7 ± 1.2
Юбилей Жукова	—	Контроль	9	0.09 ± 0.03	0.15 ± 0.04	1.8 ± 0.2
	pT2120-SmAMP2	3	3	0.30 ± 0.06	0.40 ± 0.12	1.3 ± 0.1
		11	6	0.33 ± 0.24	0.36 ± 0.21	2.1 ± 0.7
		30	4	0.15 ± 0.06	0.16 ± 0.09	1.0 ± 0.2
		31	5	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01*	1.0*
		34	3	0.30 ± 0.15	0.34 ± 0.14	1.3 ± 0.1
		39	5	0.05 ± 0.03	0.05 ± 0.03	1.0*
		45	4	1.41 ± 0.47	3.40 ± 0.88*	2.7 ± 0.6
		47	3	0.85 ± 0.54	1.78 ± 0.96	2.4 ± 1.3
		49	3	0.08 ± 0.04	0.10 ± 0.04	1.7 ± 0.3
		51	3	0.45 ± 0.44	0.57 ± 0.55	2.1 ± 1.0
		53	6	0.49 ± 0.29	0.82 ± 0.53	2.7 ± 1.5
		59	3	0.58 ± 0.34	0.61 ± 0.24	2.4 ± 1.2
		63	3	0.10	0.10	1.0*

Примечание. Представлены средние значения $\pm$ стандартные ошибки.

* Значения, существенно отличающиеся от соответствующего контроля (при $p = 0.05$).

тель составил 7.0 ± 1.8 и был выше, чем у контроля, но также статистически незначимо.

В другой группе растений соотношение ИИА на 10-е и 7-е сутки было иным. В частности, из 13 образцов у шести (№ 3, 30, 31, 34, 39 и 63) итоговые индексы агрессивности на 10-й и 7-й день практически не отличались, и их соотношение было от 1.0 до 1.3, что ниже, чем у контрольных растений сорта Юбилей Жукова (табл. 3). Однако только у трех из них (№ 31, 39 и 63) различия но-

сили существенный характер и свидетельствовали о задержке в развитии фитопатогенов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как отмечалось, гевеин-подобные пептиды SmAMP1.1a и SmAMP2.2a, кодируемые геном *pro-SmAMP2*, обладали *in vitro* антимикробной активностью по отношению к *A. solani*, *A. consortiale*, *B. cinerea*, *B. sorokiniana*, *R. solani*, *F. culmorum*, *F. oxysporum* и *T. basicola*. В дополнение к этому

экспрессия гена *pro-SmAMP2* повышала устойчивость трансгенных растений арабидопсиса экотипа Columbia к *B. sorokiniana*, трансгенных растений табака сорта Samsun NN к *T. basicola* [20]. Эти результаты позволяли предполагать, что экспрессия гена *pro-SmAMP2* в растениях культурного картофеля также позволит повысить их неспецифическую устойчивость к некоторым приведенным выше фитопатогенам. Для проверки этого предположения были использованы два различающихся по устойчивости к альтернариозу сорта: Юбилей Жукова (устойчивый) и Скороплодный (восприимчивый) [29]. Этот экспериментальный подход позволяет оценить эффект влияния “исходного” уровня устойчивости сорта к фитопатогенам на защитные свойства картофеля в связи с экспрессией в нем гена антимикробных пептидов *pro-SmAMP2*. Кроме этого, для экспрессии гена *pro-SmAMP2* в растениях картофеля были использованы разные промоторы: вирусный CaMV35S и промотор гена *pro-SmAMP2*. Предполагается, что в будущем это позволит комбинировать (пирамидировать) в одном генотипе картофеля путем повторной генетической трансформации или скрещиванием несколько разных антимикробных генов и каждый под контролем собственного промотора для исключения подавления их экспрессии.

В результате экспериментальных процедур было получено 25 независимых трансгенных растений картофеля, экспрессирующих ген *pro-SmAMP2* под контролем разных промоторов (рис. 4) и также сходных с соответствующими растениями исходных сортов по морфологии (размер листьев, интенсивность их пигментации, наличие и размер клубней) и по развитию (времени прорастания клубней и зацветания растений). Следует отметить, что некоторая часть трансформантов картофеля, экспрессирующих ген *pro-SmAMP2*, была неспособна формировать полноценные клубни или имела другие аномалии в росте и развитии, поэтому в исследованиях по определению устойчивости к фитопатогенам не участвовала. Вероятно, нарушение фенотипа этих растений было вызвано инсерцией Т-ДНК в функционально значимые участки их генома.

У большинства трансгенных растений вирусный промотор CaMV35S и промотор *pro-SmAMP2* обеспечивали экспрессию гена *pro-SmAMP2* на высоком уровне, превышающем экспрессию гена “домашнего хозяйства” — актина картофеля. Однако в целом экспрессия гена *pro-SmAMP2* была примерно в 5 раз выше при использовании вирусного промотора CaMV35S, чем при применении промотора гена *pro-SmAMP2* (рис. 4). Эти результаты оказались неожиданными, поскольку ранее в трансгенных растениях табака сорта Samsun NN промотор гена *pro-SmAMP2* был по эффективности сопоставим или превосходил вирусный промотор CaMV35S [23]. Возможно, на активность

промоторов CaMV35S и *pro-SmAMP2* могли оказать влияние специфические сортовые свойства растений картофеля. В частности, ранее отмечалось, что активность вирусного промотора CaMV35S может различаться от 3 до 11 раз в трансгенных растениях табака в зависимости от их сорта [30–32].

Комплекс грибов *Alternaria* и *Fusarium* представляет реальную опасность для картофеля в разных регионах России [27]. Оценка на листьях картофеля их иммунного статуса к комплексу фитопатогенных грибов *Alternaria* sp. и *Fusarium* sp. позволила дифференцировать растения в соответствии с их сортовой принадлежностью, а также выделить некоторые образцы с повышенным уровнем устойчивости к данному фитопатогенному комплексу. В частности, все растения на основе сорта Скороплодный, независимо от уровня экспрессии гена *pro-SmAMP2*, поражались фитопатогенами наравне с исходным сортом и существенно не различались как по ИИА, так и по скорости распространения симптомов заболевания (табл. 3, рис. 5). Контрольные растения сорта Юбилей Жукова были по значениям ИИА существенно более устойчивы к *Alternaria* sp. и *Fusarium* sp., но скорость распространения на них симптомов поражения была такая же, как у сорта Скороплодный (табл. 3, рис. 5). Одновременно один трансгенный образец № 31 из группы Юбилей Жукова по нарастанию симптомов заболевания и ИИА был существенно лучше контроля (табл. 3, рис. 5). Еще два образца № 39 и 63 из этой группы поражались на уровне контроля, но скорость распространения симптомов поражения на них была существенно ниже, чем в контроле. Вероятно, сорт Юбилей Жукова, в отличие от сорта Скороплодный, имеет дополнительный механизм неспецифической защиты, который задерживает проникновение фитопатогенов в лист, однако в дальнейшем не способен существенно препятствовать их распространению. В то же время усиление этого защитного механизма посредством экспрессии гена *pro-SmAMP2* позволит некоторым трансгенным растениям картофеля сорта Юбилей Жукова успешно противостоять *Alternaria* sp. и *Fusarium* sp. Следовательно, белковые продукты гена *pro-SmAMP2* являются дополнительным препятствием для инфекции при заражении.

Кроме того, сопоставимая скорость распространения симптомов поражения у контрольных растений сорта Юбилей Жукова и всех растений на основе сорта Скороплодный могла быть обусловлена активностью другого фитопатогена, который присутствовал в смеси — *Fusarium* sp. и к которому “исходная” устойчивость обоих сортов была не известна. Повышенная устойчивость образцов № 31, 39 и 63 из группы Юбилей Жукова предполагает, что “исходная” устойчивость этого

сорта может быть расширена экспрессией гена *pro-SmAMP2*.

Неспецифическая устойчивость растений обеспечивается работой многих генов с аддитивным эффектом, каждый из которых в отдельности, по-видимому, не способен на высоком уровне противостоять возбудителям болезней. При генетической трансформации растений некоторые из этих генов могут изменять характер своей экспрессии в результате инсерций Т-ДНК или соматической изменчивости, что может приводить к снижению “исходного” уровня устойчивости. Например, среди группы трансгенных растений на основе сорта Юбилей Жукова был образец № 45, который по степени поражения проигрывает контрольным растениям и сопоставим со всеми растениями картофеля сорта Скороплодный (табл. 3, рис. 5). Отрицательно направленные действие от инсерционного мутагена значимых для устойчивости участков генома может быть причиной отсутствия выраженной зависимости между уровнем экспрессии гена *pro-SmAMP2* и устойчивостью первичных трансформантов картофеля к фитопатогенам (табл. 3 и рис. 4). Этим же обстоятельством, вероятно, обусловлено отсутствие положительного эффекта в повышении устойчивости среди растений из группы Юбилей Жукова с высоким уровнем экспрессии гена *pro-SmAMP2*, которые, вероятно, имеют несколько инсерций Т-ДНК.

Ранее также было описано отсутствие связи между уровнем биосинтеза белка дефензина из васоби у трансгенных растений картофеля сорта Waseshiro и степенью их устойчивости к серой гнили *B. cinerea* [10]. В частности, только одно трансгенное растение из трех одновременно имело относительно высокий уровень наработки дефензина васоби и было более устойчиво к патогену, чем контроль. Два других трансгенных растения, несмотря на высокий уровень биосинтеза дефензина из васоби, повышенной устойчивости к патогену не проявили.

Схожий эффект наблюдался нами ранее у первичных трансформантов табака, экспрессирующих ген *pro-SmAMP2* и не имеющих четкой зависимости между уровнем транскрипта *pro-SmAMP2* и устойчивостью растений к патогену *T. basicola* [20]. Однако в потомстве T₁ этих растений табака и особенно в поколении T₃ трансгенных растений арабидопсиса с моногенным наследованием Т-ДНК была отмечена тесная положительная связь между уровнем транскрипта гена *pro-SmAMP2* и устойчивостью растений к фитопатогенам. Вероятнее всего, проявление этой корреляционной зависимости стало возможно в результате двух причин: во-первых, получения гомозигот по локусу с геном *pro-SmAMP2* и, во-вторых, за счет элиминации негативно действующих

на устойчивость Т-ДНК-инсерционных мутаций генов неспецифической устойчивости.

Из данных табл. 3 следует, что трансгенный образец № 31 из группы Юбилей Жукова с повышенной устойчивостью к фитопатогенам имеет достаточно высокий уровень экспрессии гена *pro-SmAMP2* относительно большинства других растений этой группы (рис. 4). Следовательно, в будущем при получении трансгенных растений картофеля целесообразно создавать более многочисленную группу независимых трансформантов для повышения вероятности выявления растений, сочетающих высокую экспрессию целевого гена с высокой устойчивостью к фитопатогенам. Кроме этого, при пирамидировании генов устойчивости путем гибридизации целесообразно отбирать в потомстве гибридов, полученных на основе различных трансформантов картофеля, растения с моногенным наследованием каждого целевого гена.

Таким образом, экспрессия гена антимикробных пептидов *pro-SmAMP2* из мокрицы под контролем промотора *pro-SmAMP2* способна повышать устойчивость растений картофеля к изученным фитопатогенам. В то же время повышать и расширять неспецифическую защиту от фитопатогенов с помощью экспрессии гена *pro-SmAMP2* целесообразно на сортах картофеля, уже имеющих к ним определенный уровень устойчивости. В дальнейших исследованиях по повышению устойчивости растений картофеля к фитопатогенам путем комбинирования в одном генотипе разных генов устойчивости целесообразно использовать трансгенные растения картофеля № 31, 39 и 63 из группы Юбилей Жукова.

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки России № 14.604.21.0028 (№ RFMEFI60414X0028) и выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Биотехнология” ФГБНУ ВНИИСБ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. James W.C., Teng P.S., Nutter W.F. Estimated losses of crops from plant pathogens // CRC Handbook of Pest Management 1 / Ed. Pimentel D. USA, FL: CRC Press, Boca Raton, 1990. P. 5–50.
2. Malcolmson J.F. Races of *Phytophthora infestans* occurring in Great Britain // Trans. Br. Mycol. Soc. 1969. № 53. С. 417–423.
3. Wastie R.L. Breeding for resistance // Adv. Plant Pathol. 1991. № 7. P. 193–224.
4. Jansky S.H. Identification of *Verticillium* wilt resistance in U.S. potato breeding programs // Am. J. Potato Res. 2009. № 86. P. 504–512.
5. Zhu S., Li Y., Vossen J.H. et al. Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato // Transgenic Res. 2012. V. 21. № 1. P. 89–99.

6. Osusky Milan, Lubica Osuska, Robert E. Hancock et al. Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot // Transgenic Research. 2004. V. 13. P. 181–190.
7. Vutto N.L., Gapeeva T.A., Pundik A.N. et al. Transgenic Belarussian bred potato plants expressing the genes for antimicrobial peptides of the cecropin–melittin type // Rus. J. Genetics. 2010. V. 46. № 12. P. 1433–1439.
8. Rivero Mercedes, Nicolás Furman, Nicolás Mencacci et al. Stacking of antimicrobial genes in potato transgenic plants confers increased resistance to bacterial and fungal pathogens // J. Biotechnology. 2012. V. 157. P. 334–343.
9. Yong-bo Hong, Shui-ping Liu, Yan-ping Zhu et al. Expression of the MSI-99m gene in transgenic potato plants confers resistance to *Phytophthora infestans* and *Ralstonia solanacearum* // Plant. Mol. Biol. Rep. 2013. V. 31. P. 418–424.
10. Khan R.S., Nishihara M., Yamamura S. et al. Transgenic potatoes expressing wasabi defensin peptide confer partial resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*) // Plant Biotechnology. 2006. № 23. P. 179–183.
11. Juan Yan, Su-su Yuan, Luan-luan Jiang et al. Plant antifungal proteins and their applications in agriculture // Appl. Microbiol. Biotechnol. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2015.
12. Liu D., Raghothama K.G., Hasegawa P.M., Bressan R.A. Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 5. P. 1888–1892.
13. Gao A.G., Ai-Guo Gao, Hakimi S.M. et al. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide // Nat. Biotechnol. 2000. V. 18. P. 1307–1310.
14. Almasia N.I., Bazzini A.A., Hopp H.E., Vazquez-Rovere C. Overexpression of snak-in-1 gene enhances resistance to *Rhizoctonia solani* and *Erwinia carotovora* in transgenic potato plants // Mol. Plant Pathol. 2008. V. 9. № 3. P. 329–338.
15. Porto M.S., Pinheiro M.P., Batista V.G. et al. Plant promoters: an approach of structure and function // Mol. Biotechnol. 2014. V. 56. № 1. P. 38–49.
16. Al-Kaff N.S., Kreike M.M., Covey S.N. et al. Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter-regulated transgene // Nat. Biotechnol. 2000. V. 18. № 9. P. 995–999.
17. Stam M., Mol J.N.M., Kooter J.M. Review Article: The Silence of Genes in Transgenic Plants // Annals Botany. 1997. V. 79. № 1. P. 3–12.
18. Jakowitsch J., Papp I., Moscone E.A. et al. Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in trans // The Plant J. 1999. V. 17. № 2. P. 131–140.
19. Mohan S., Meiyalaghan S., Latimer J.M. GSL2 overexpression confers resistance to *Pectobacterium atrosepticum* in potato // Theor. Appl. Genet. 2014. V. 127. № 3. P. 677–689.
20. Shukurov R.R., Voblikova V.D., Nikonorova A.K. et al. Transformation of tobacco and *Arabidopsis* plants with *Stellaria media* genes encoding novel hevein-like peptides increases their resistance to fungal pathogens // Transgenic Res. 2012. V. 21. № 2. P. 313–325.
21. Халилуев М.Р., Харченко П.Н., Долгов С.В. Генетическая трансформация томата (*Solanum lycopersicum* L.) генами защитных хитинсвязывающих белков и антимикробных пептидов // Изв. ТСХА. 2010. № 6. С. 75–83.
22. Стрельникова С.Р., Вобликова В.Д., Шукуров Р.Р. и др. Изучение нового растительного промотора гена *proSmAMP2* из *Stellaria media* методом агробактериальной инфильтрации растений // Биотехнология. 2014. № 3. С. 8–17.
23. Komakhin R.A., Vysotskii D.A., Shukurov R.R. et al. Novel strong promoter of antimicrobial peptides gene *pro-SmAMP2* from chickweed (*Stellaria media*) // BMC Biotechnology. 2015. in press
24. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473–497.
25. Muller P.Y., Janovjak H., Miserez A.R., Dobbie Z. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR // Biotechniques. 2002. № 32. P. 1372–1374, 1376, 1378–1379.
26. Bustin S. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays // J. Mol. Endocrinol. 2000. V. 25. № 2. P. 169–193.
27. Смирнов А.Н., Бирик Т.С., Приходько Е.С. и др. Листостебельный комплекс фитопатогенных и сопутствующих грибов в агроценозах картофеля и томата различных регионов России // Изв. ТСХА. 2015. Вып. 3. С. 36–46.
28. Ван дер Планк Я. Устойчивость растений к болезням. М.: Колос, 1972. 254 с.
29. Анисимов Б.В., Еланский С.Н., Зейрук В.Н. и др. Сорта картофеля, возделываемые в России: 2013. Справочное издание. М.: Агроспас, 2013. 144 с.
30. Schnurr J.A., Guerra D.J. The CaMV-35S promoter is sensitive to shortened photoperiod in transgenic tobacco // Plant Cell Reports. 2000. V. 19. № 3. P. 279–282.
31. Cazzonelli C.I., McCallum E.J., Lee R., Botella J.R. Characterization of a strong, constitutive mung bean (*Vigna radiata* L.) promoter with a complex mode of regulation in planta // Transgenic Res. 2005. V. 14. № 6. P. 941–967.
32. Kumar D., Patro S., Ranjan R. et al. Development of useful recombinant promoter and its expression analysis in different plant cells using confocal laser scanning microscopy // PLoS One. 2011. V. 6. № 9. e24627.

ЭКСПРЕССИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ГЕНА АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ *pro-SmAMP2* ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ К ВОЗБУДИТЕЛЯМ АЛЬТЕРНАРИОЗА И ФУЗАРИОЗА

Е. М. Ветчинкина¹, В. В. Комахина¹, Д. А. Высоцкий¹, Д. В. Зайцев²,
А. Н. Смирнов², А. В. Бабаков¹, and Р. А. Комахин¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва 127550
e-mail: recombination@iab.ac.ru, e-mail: anny.shirly@gmail.com

²Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева,
кафедра защиты растений, Москва 127550

Поступила в редакцию 23.11.2015 г.

Ген *pro-SmAMP2* из растения мокрицы (*Stellaria media* L.) кодирует гевеин-подобные пептиды, обладающие *in vitro* антимикробной активностью по отношению к некоторым вредоносным микроорганизмам. Эти пептиды играют важную роль в защите растений мокрицы от инфекции, а кодирующий их ген ранее был использован для защиты трансгенных растений арабидопсиса и табака от фитопатогенов. В данной работе ген *pro-SmAMP2* под контролем вирусного промотора CaMV35S или под контролем собственного промотора *pro-SmAMP2* был трансформирован в растения культурного картофеля двух сортов, различающихся по устойчивости к альтернариозу: Юбилей Жукова (устойчивый) и Скороплодный (восприимчивый). Количественным методом ПЦР в реальном времени было показано, что трансгенные растения картофеля экспрессировали ген *pro-SmAMP2* под контролем обоих промоторов на уровне сопоставимом или превышающем уровень экспрессии гена актина картофеля. Методом оценки иммунного статуса трансформантов было показано, что экспрессия гена антимикробных пептидов *pro-SmAMP2* способна повышать устойчивость к комплексу фитопатогенов *Alternaria* sp. и *Fusarium* sp. только растений картофеля сорта Юбилей Жукова. В работе обсуждается возможная роль продуктов гена *pro-SmAMP2* в защите картофеля от *Alternaria* sp. и *Fusarium* sp.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, *Stellaria media*, трансгенные растения, картофель.