

Результаты молекулярно-генетического анализа образцов селекционного материала на наличие в генотипе гена *Vf* устойчивости к парше яблони

Гибридное потомство	Количество образцов в линии	Имеют ген <i>Vf</i> в гетерозиготе		Не имеют гена <i>Vf</i>	
		Число	%	Число	%
№1	94	70	74,5	24	25,5
№2	6	1	16,7	5	83,3
№5	4	4	100	0	0
№9	28	25	89,3	3	10,7
№12	32	21	65,6	11	34,4
№15	1	1	100	0	0
Итого:	168	125	74,4 %	43	25,6 %

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что отбор устойчивых к парше растений, производимый традиционно на искусственном инфекционном фоне, не может гарантировать наследование доминантного аллеля *Vf* всеми, успешно его прошедшими. Существенная часть таких растений является рецессивными гомозиготами по данному гену, а проявленная устойчивость обусловлена иными факторами. Поэтому для повышения эффективности отбора в селекции, направленной на получение несущих ген *Vf* сортов яблони, целесообразно сочетать классический фитопатологический подход с использованием молекулярных маркеров. Это позволит значительно ускорить процесс селекции за счет идентификации ценных генов на первых стадиях роста растений и при этом получить более точные результаты относительно содержания гена *Vf* в генотипе селекционного материала, поскольку анализ будет проводиться непосредственно на уровне ДНК, а не на уровне подверженного влиянию среды фенотипа.

1. З.А. Козловская. Совершенствование сортимента яблони в Беларуси // Минск, 2003. – 168 с.
2. L. Parisi, Y. Lespinasse, J. Guillaumes, J. Kruger. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene // Phytopathology. - 1993. - V. 83. - P. 533-537.
3. B. Vinatzer, A. Patocchi, L. Gianfranceschi, S. Tartarini, H. Zhang, C. Gessler, S. Sansavini. Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with *Vf* apple scab resistance // Molecular Plant-Microbe Interactions. - 2001. -V. 14. - P. 508 - 515.
4. M.R. Afunian, P.H. Goodwin, D.M. Hunter. Linkage of *Vfa4* in *Malus x domestica* and *Malus floribunda* with *Vf* resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* // Plant Pathology. - 2004. - V. 53. - P. 461-467.
5. S. Tartarini, L. Gianfranceschi, S. Sansavini, C. Gessler. Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple // Plant Breeding. - 1999. - V. 118. - P. 183-186.

**НОВЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ
В РАСТЕНИЯХ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ РАСТЕНИЙ
ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ**

**В.С. Фадеев¹, Е.В. Исаенко³, М.М. Бабыкин², Р.А. Комахин¹, Н.А. Картель³,
И.В. Голденкова-Павлова¹**

¹ - Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН (ИОГен РАН), Москва, Россия

² - Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ - ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
irengold@vigg.ru

Проблемы биобезопасности трансгенных растений являются актуальными. Наиболее острым остается вопрос неконтролируемого переноса генетической информации и последующей экспрессии трансгена в дикорастущих растениях, в том числе сорных. В

настоящее время для идентификации трансгенов, в основном, используются различные варианты ПЦР методов, которые позволяют определять наличие гетерологичной последовательности в геномной ДНК растений, а также уровень транскрипции чужеродного гена в растительных клетках. Следует, однако, подчеркнуть, что новые свойства трансгенных растений, в большинстве случаев, определяет именно белковый продукт перенесенного гена. При этом следует отметить, что большинство продуктов клонированных генов либо не имеют ферментативной активности либо их ферментативную активность можно определять, используя сложные методы исследования. В связи с этим разработка новых подходов, позволяющих быстро, точно и с минимальными затратами выявлять белковый продукт трансгена, является актуальной. Несмотря на многочисленные исследования, этот вопрос пока не до конца разработан.

Нами предложен новый подход для конструирования экспериментальных моделей с целью дальнейшего создания трансгенных растений перспективных для биотехнологии. Этот подход основан на конструировании гибридных генов, в которых целевой ген имеет трансляционное слияние с последовательностью репортерного гена, кодирующего термостабильную лихеназу. Репортерная система, выбранная нами и основанная на термостабильности лихеназы, имеет ряд преимуществ. Прежде всего, она обеспечивает использование более простых и чувствительных методов для анализа экспрессии гибридного гена, что позволяет проводить быстрый отбор трансгенных организмов, определять уровень экспрессии гибридных генов и, что самое важное, определять молекулярные массы белковых продуктов гибридных генов с использованием простых и чувствительных методов. Помимо этого, возможно использовать эту репортерную систему для мониторинга трансгенов в агроценозах.

Экспериментальное подтверждение адекватности такой стратегии было получено нами при конструировании и анализе прокариотических и эукариотических трансформантов, экспрессирующих гибридные гены, в которых целевой ген имеет трансляционное слияние с последовательностью репортерного гена. Так, были сконструированы гибридные гены, содержащие репортерный ген термостабильной лихеназы, и следующие модельные гены:

1. гены *sd2* и *sd2mod*, кодирующие защитные пептиды, которые обладают антибактериальной и антигрибной активностью;
2. ген *recA*, продукт которого участвует в процесса рекомбинации.
3. ген *сгу3аМ*, который кодирует дельта-эндотоксин, обеспечивающий устойчивость растений к личинкам колорадского жука.
4. ген *prqA*, который контролирует устойчивость к индукторам окислительного стресса и некоторым токсическим соединениям, включая гербициды.

Далее, была изучена экспрессия этих генов в клетках модельных организмов про- и эукариот.

Показано, что белки SD2 и SDmod в составе гибридных белков SD2-LicBM2 и SD2mod-LicBM2 оказывают такое же ингибирующее действие на рост гифов *Fusarium culmorum*, как нативный и модифицированный белки (рисунок), а лихеназа сохраняет свои свойства – активность и термостабильность.

Показано, что гибридный белок RecA-LicBM2 сохраняет свойство RecA-белка связываться с оцДНК и предохранять ее от действия нуклеазы S1. Известно, что белок RecA *E.coli* стимулирует гомологичную рекомбинацию у растений. Это позволяет полагать, что экспрессия в растениях гибридного гена *recA-licBM2* также может изменить уровень и спектр рекомбинации у растений, обеспечивая при этом использование более простых и чувствительных методов для анализа экспрессии гибридного гена.

Сконструированы экспериментальные модели первичных трансформантов картофеля, экспрессирующие гибридный ген *cry3aM-licBM2*. Молекулярно-биологический анализ и биотесты экспериментальных моделей позволяют предложить новую систему экспрессии *cry* генов в растениях. Эта система основана на экспрессии гибридных генов, в состав которых входит последовательность репортерного гена лихеназы, и использовании в качестве регуляторного элемента светоиндуцибельного промотора, который обеспечивает преимущественную экспрессию контролируемых генов только в зеленых тканях растения (листьях) – органах-мишенях для насекомых-вредителей. Показано, что Cry3aM белок в составе гибридного Cry3a-LicBM2 белка сохраняет свою биологическую активность – инсектицидное действие на личинки колорадского жука.

Показано, что экспрессия гибридного гена *prqA-licBM3* в клетки *Synechocystis* обуславливала у них значимое повышение устойчивости к метилвиологену.

Использование термостабильной лихеназы как трансляционного репортера позволяет получать данные, которые трудно или невозможно получить с применением традиционных методов анализа экспрессии генов, что является важным при проведении фундаментальных и прикладных исследований. Основываясь на свойствах репортерного белка лихеназы, входящего в состав гибридных белков, представляется возможным использовать эту репортерную систему для мониторинга трансгенов в агроценозах, поскольку эта система является достаточно простой и точной, и не требует больших материальных и временных затрат.

Таким образом, показано, что использование современных методов генной инженерии и геномики позволяет разработать системы экспрессии с различными регуляторными элементами, создать оптимальные экспериментальные модели трансгенных растений, перспективные для биотехнологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант №08-04-90410_укр.

КУЛЬТУРА ТКАНИ *IN VITRO* ЛЮПИНА УЗКОЛИСТНОГО (*LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* L.)

Т.И. Фоменко, М.К. Малюш

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Беларусь

fomenko_ti@mail.ru

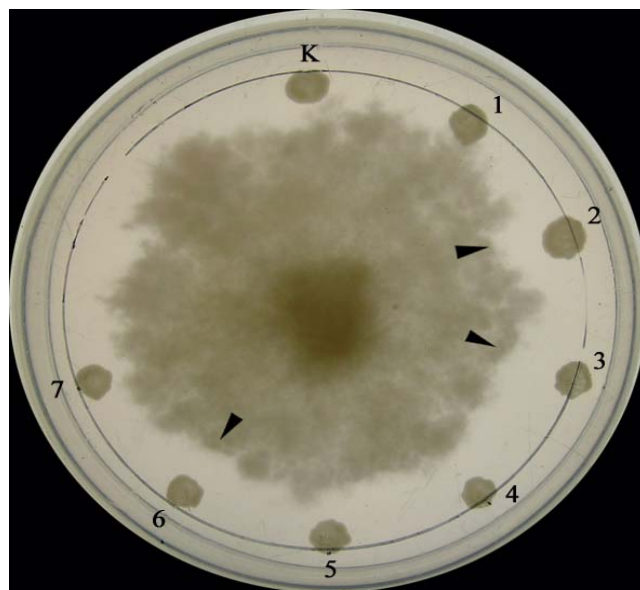


Рис. Чашечный тест на антимикробную активность против гриба *Fusarium culmorum*. Ингибирование роста гиф гриба *Fusarium culmorum* (на третий день). Дрожжевые трансформанты: К – pGal-pre, 1 – pGal-pre-licBM2, 2 – pGal-pre-*sd2*, 3 – pGal-pre-*sd2-licBM2*, 4 – pGal-pre-licBM2-*sd2*, 5 – pGal-pre-*sdmod*, 6 – pGal-pre-*sdmod-licBM2*, 7 – pGal-pre-licBM2-*sdmod*. Стрелками показаны места ингибирования роста колонии гриба *Fusarium culmorum*.