

Член-корреспондент НАН Украины Н. Я. Спивак, А. В. Кочетов,
О. Й. Лозова, Л. В. Юзвенко, Т. Ю. Сабирова, А. А. Демченко,
Л. Ф. Диденко

Восприимчивость трансгенных растений картофеля к вирусу ожога гречихи

Визуальная оценка инфицированных вирусом ожога гречихи (ВОГ) трансгенных и нетрансгенных растений картофеля показала, что трансгенные растения, экспрессирующие ген рибонуклеазы цинчи, характеризовались повышенной устойчивостью к ВОГ. В инфицированных и неинфицированных ВОГ трансгенных растениях картофеля отмечался сниженный уровень содержания суммарных РНК по сравнению с соответствующим контролем. Уровень накопления ВОГ в трансгенных растениях на 14 сут после инфицирования был ниже в 1,7 раза по сравнению с таковым в нетрансгенных растениях.

Вирусоустойчивость растений определяется механизмами, включающими как неспецифические, так и патогенспецифические защитные реакции, контролируемые различными комплексами генов [1]. Нуклеазы могут представлять собой один из компонентов системы вирусоустойчивости, поэтому исследование растений с различной нуклеазной активностью, отображающей их неодинаковую восприимчивость к вирусам, представляет значительный интерес. Ранее было показано, что увеличенная экспрессия рибонуклеаз у растений *Nicotiana tabacum* сопровождается повышением устойчивости к некоторым вирусам, в связи с чем было выдвинуто предположение об участии соответствующих генов в одном из механизмов защиты от фитопатогенных вирусов [2, 3].

Целью наших исследований является изучение влияния экспрессии гена гетерологичной РНКазы *Zinnia elegans* на качественные изменения восприимчивости трансгенных растений картофеля к рабдовирусу — вирусу ожога гречихи (ВОГ).

ВОГ передается механическим путем и поражает широкий круг растений из 10 семейств, среди которых важнейшие сельскохозяйственные культуры в Украине из семейств пасленовых, гречишных, бобовых и тыквенных. Интерес использования фиторабдовируса мотивирован тем, что подобные исследования относительно растительных рабдовирусов не проводились, а механизм их репродукции отличается от ранее изученного в этой области вируса табачной мозаики [2].

Трансгенные растения картофеля с модифицированным уровнем активности рибонуклеазы были получены из Института цитологии и генетики СО РАН. Трансгенные и нетрансгенные растения картофеля инокулировали очищенным вирусным препаратом в концентрации 100 мкг/мл. В качестве контроля использовали растения картофеля, инокулированные буферным раствором, не содержащим вирус.

В результате проведенных исследований установлено, что трансгенные растения картофеля, экспрессирующие ген экстраклеточной рибонуклеазы *Z. elegans*, не отличались от контрольных растений по фенотипу и срокам их развития.

Визуальная оценка инфицированных ВОГ контрольных и трансгенных растений картофеля показала, что трансгенные растения характеризовались повышенной устойчиво-

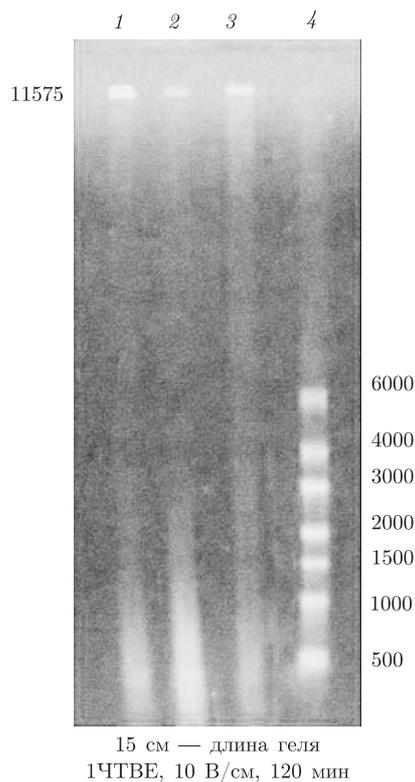


Рис. 1. Электрофореграмма РНК вируса ожога гречихи: 1 — РНК ВОГ, выделенная из растения-накопителя *Nicotiana rustica*; 2 — РНК ВОГ из трансгенного растения картофеля; 3 — РНК ВОГ из нетрансгенного растения картофеля; 4 — маркеры 6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500 нуклеотидов

тью к ВОГ. Симптомы заболевания на трансгенной линии картофеля проявились через 28 сут наблюдения в виде мелких некрозов, что может быть характерной особенностью устойчивости, поскольку за границы некроза вирусная инфекция не распространялась. На мок-инокулированных листьях трансгенных растений аналогичные некрозы не наблюдались. В то же время симптомы заболевания на нетрансгенных растениях проявились в сравнении листьев между собою, что отмечалось нами ранее [4].

Экспрессия гена секреторных нуклеаз в трансгенных растениях не исключает деградацию вирусоспецифических РНК, что определяет вирусоустойчивость трансгенных растений. Поэтому представляло интерес исследовать геномную РНК ВОГ в генномодифицированных растениях картофеля, экспрессирующих ген рибонуклеазы *Z. elegans*. С этой целью был получен вирусный препарат из генномодифицированных растений картофеля [5], затем из вирусного препарата была выделена геномная РНК [6] и исследована методом электрофореза в агарозе [7]. В результате проведенных исследований установлено, что трансгенные растения содержали геномную РНК ВОГ, которая по своим размерам и спектрофотометрическим характеристикам не отличалась от геномной РНК ВОГ, изолированной из нетрансгенных растений (рис. 1).

Кроме того, была выделена суммарная РНК из трансгенных и контрольных растений картофеля [8]. При исследовании суммарного состава РНК в трансгенных растениях картофеля через 2 недели после их инфицирования вирусом была обнаружена высокомолекулярная РНК, которая также присутствовала, но в гораздо большем количестве, в составе

суммарных РНК из инфицированных вирусом нетрансгенных растений. В то же время в неинфицированных вирусом трансгенных и нетрансгенных растениях картофеля высокомолекулярную РНК не выявили (рис. 2). Обращает на себя внимание тот факт, что высокомолекулярные РНК (10379–10415 нуклеотидов), обнаруженные лишь в инфицированных растениях, отличаются меньшими размерами от геномной РНК, изолированной из очищенного вирусного препарата (11575 нуклеотидов). Мы не исключаем, что на это обстоятельство повлияли клеточные факторы, присутствующие при выделении суммарной РНК.

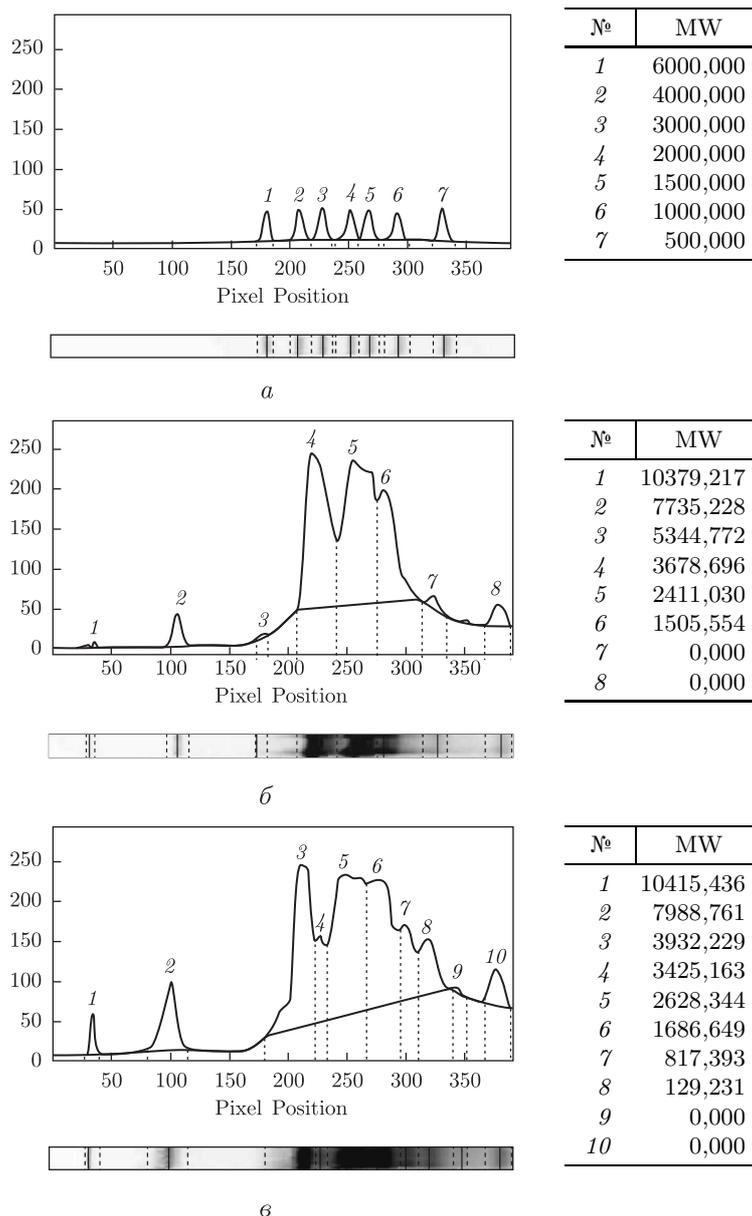


Рис. 2. Денситограмма РНК: а — маркеры; б — из трансгенных растений картофеля, инфицированных ВОГ; в — из нетрансгенных растений картофеля, инфицированных ВОГ; г — из контрольных трансгенных растений; д — из контрольных нетрансгенных растений

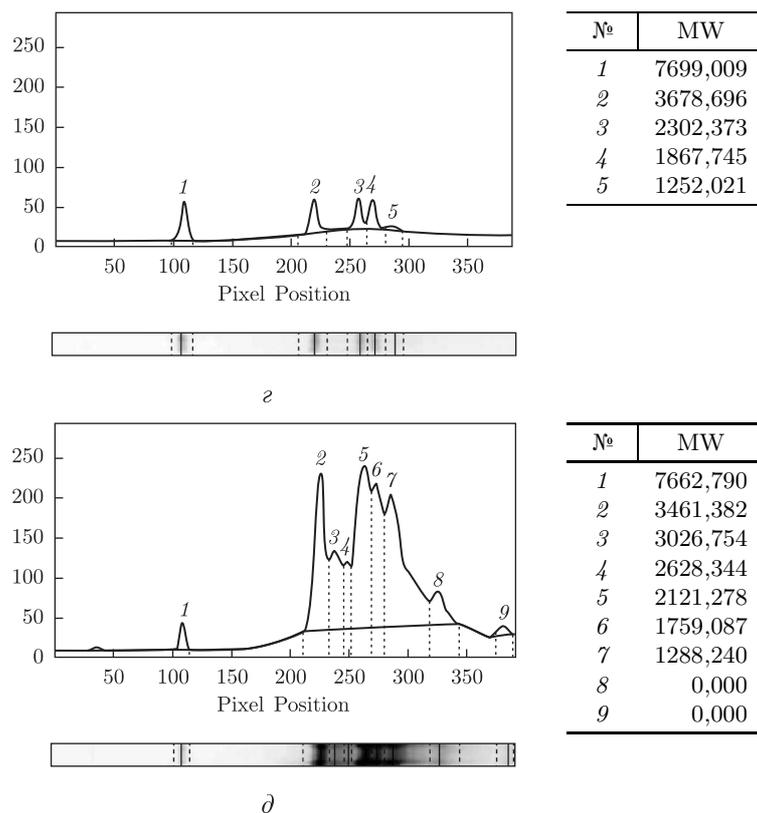


Рис. 2. Продолжение

Следует отметить, что количественный уровень содержания РНК как в инфицированных ВОГ, так и в контрольных трансгенных растениях ниже по сравнению с ее суммарным количеством в нетрансгенных растениях. Это, возможно, свидетельствует о том, что при повышенном уровне РНКаз в трансгенных растениях снижается содержание РНК.

Как выяснилось, уровень накопления вируса в трансгенных растениях картофеля, экспрессирующих ген рибонуклеазы циннии, ниже в 1,7 раза на 14 сут, в 1,4 раза на 21 сут после заражения по сравнению с таковым в нетрансгенных растениях картофеля.

Ранее мы отмечали, что трансгенные растения табака, экспрессирующие ген экстраклеточной РНКазы из циннии, менее устойчивы к ВОГ по сравнению с трансгенными растениями табака, экспрессирующими ген панкреатической рибонуклеазы быка, и было показано трехкратное снижение репродукции вируса по сравнению с контрольными растениями [3]. И в нашем случае, согласно полученным данным, отмечается повышенный уровень устойчивости к ВОГ трансгенных растений картофеля, экспрессирующих ген рибонуклеазы циннии, что представляет значительный интерес для дальнейших исследований молекулярных механизмов устойчивости растений.

1. Трифонова Е. А., Кочетов А. В., Шумный В. К. Молекулярные механизмы системной устойчивости растений к вирусным инфекциям и способы повышения вирусостойчивости путем трансгеноза // Успехи соврем. биологии. – 2007. – **127**, № 1. – С. 13–24.
2. Trifonova E. A., Sapotcky V. K., Komarova M. L., Sherban A. B., Shumny V. K., Polyakova A. M., Lapshina L. A., Kochetov A. V., Malinovsky B. I. Protection of transgenic tobacco plants expressing bovine pancreatic ribonuclease against tobacco mosaic virus // Plant Cell Rep. – 2007. – No 7. – P. 1121–1126.

3. Spivak N. Ya., Kochetov A. V., Lozova O. I., Levenko B. A., Yuzvenko L. V., Nikolaychuk M. V., Levchuk O. B., Didenko L. F., Trifonova E. A., Sangaev S. S. Sensibility to phytorhabdoviruses of transgenic tobacco plants // *Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. Біологія.* – 2010. – Вип. 27. – С. 37–39.
4. Шевчук В. К., Довгань С. В., Діденко Л. Ф., Демченко О. А., Юзвенко Л. В., Серденко О. Б., Співак М. Я. Вірусний опік гречки в Україні // *Карантин і захист рослин.* – 2008. – № 11. – С. 13–15.
5. Діденко Л. Ф., Пархоменко Н. И., Максименко Л. А. и др. Некоторые свойства структурных компонентов фиторабдовируса курчавой карликовости картофеля // *Биополимеры и клетка.* – 2001. – № 4. – С. 308–313.
6. Steele K. P., Frist R. H. Characterization of the 3' Termini of the RNAs of Cowpea Mosaic Virus // *J. Virol.* – 1978. – **26**, No 2. – P. 243–248.
7. Duncan R. S. Agarose Gel Electrophoresis // *Basic DNA and RNA Protocols* / Ed. A. J. Harwood. – New York: Humana, 1996. – Vol. 58. – P. 17–21.
8. Bugos R. C., Chiang V. L., Zhang X. H. et al. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine // *BioTechniques.* – 1995. – **19**. – P. 734–737.

*Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев
Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия*

Поступило в редакцию 12.03.2012

**Член-кореспондент НАН України М. Я. Співак, О. В. Кочетов, О. Й. Лозова,
Л. В. Юзвенко, Т. Ю. Сабірова, О. А. Демченко, Л. Ф. Діденко**

Сприйнятливість трансгенних рослин картоплі до вірусу опіку гречки

Візуальна оцінка інфікованих вірусом опіку гречки (ВОГ) трансгенних і нетрансгенних рослин картоплі показала, що трансгенні рослини, які експресують ген рибонуклеази цинії, характеризувалися підвищеною стійкістю до ВОГ. В інфікованих і неінфікованих ВОГ трансгенних рослинах картоплі відзначався знижений рівень вмісту сумарних РНК порівняно з відповідним контролем. Рівень накопичення вірусу в трансгенних рослинах на 14 добу після інфікування був нижче в 1,7 раза порівняно з таким у нетрансгенних рослинах.

**Corresponding Member of the NAS of Ukraine N. Ya. Spivak, A. V. Kochetov,
I. O. Lozova, L. V. Yuzvenko, T. Yu. Sabirova, A. A. Demchenko, L. F. Didenko**

The sensibility of transgenic plants of potato to buckwheat burn virus

*Visual assessment of BBV-infected transgenic and non-transgenic potato plants has shown that the transgenic potato plants that express a gene of ribonuclease of *Zinnia elegans* are characterized by increased resistance to BBV. Infected and uninfected virus transgenic potato plants are characterized by reduced levels of total RNA as compared with control. The level of accumulation of the virus content in transgenic potato plants in 14 days after infection was lower by 1.7 times as compared with its content in non-transgenic potato plants.*