

ПРОБЛЕМЫ ЕСТЕСТВЕННОГО И ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА РАСТЕНИЙ. К РАЗВИТИЮ ИДЕЙ Н.И. ВАВИЛОВА

**В.А. Пухальский, Т.И. Одинцова, Л.И. Извекова, Э.Н. Андреева,
Т.В. Коростылева, Е.А. Истомина, А.А. Славохотова, А.Н. Шиян,
Г.В. Козловская, Л.А. Оболенкова, Е.Д. Бадаева, Е.Н. Билинская**

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия, e-mail: pukhalsk@vigg.ru

В статье представлены итоги работ по изучению естественного и приобретенного иммунитета растений. У растений томатов с генами устойчивости *Tm* в ответ на инфекцию вируса табачной мозаики (ВТМ) обнаружены специфические белки, которые могут быть использованы в качестве маркеров устойчивости в селекционном процессе. Наличие в геноме томатов генов толерантности и устойчивости положительно влияет на транскрипцию хлоропластных генов при вирусной инфекции. Представлены результаты хромосомных замещений при инконгруэнтных скрещиваниях у пшеницы, приводящих к получению форм, устойчивых к бурой ржавчине и мучнистой росе. RAPD-методом выявлен специфичный фрагмент ДНК, ассоциированный с устойчивостью к бурой ржавчине, и на его основе синтезирован SCAR-праймер. Приведены результаты исследования 13 впервые выделенных дефензинов пшеницы, которые проявляют антимикробные и фунгицидные свойства. Приобретенный иммунитет исследовали, изучая ответ растений на их вакцинацию созданными антивирусными вакцинами ВТМ V-69 и ВИРОГ-43 (штамм вируса зеленой крапчатой мозаики огурца – ВЗКМО); приводятся результаты молекулярно-генетических исследований этих вакцин. Описаны исследования по индуцированию повышенного уровня антивирусного иммунитета методами генетической инженерии.

Н.И. Вавилов с гениальной прозорливостью не только обобщил в своих работах достижения мировой науки своего времени в области иммунитета растений, но и обозначил наиболее перспективные с фундаментальных и практических точек зрения направления исследований по этой проблеме (Вавилов, 1913, 1918, 1937). Рассматривая проблемы иммунитета растений к фитопатогенам, он выделил две категории иммунитета: 1 – естественный; 2 – приобретенный (Вавилов, 1935). Наиболее широкое распространение у растений имеет первый тип иммунитета, который по отношению к различным фитопатогенам детерминируется специфическими генами. По заключению Ван дер Планка (1966), эти гены обуславливают два типа устойчивости растений: вертикальную и горизонтальную. И хотя последние данные говорят об определенной условности такого деления (Дьяков, 2003), работы по выявлению новых

генов, детерминирующих каждый из этих типов устойчивости, продолжают с большой интенсивностью. Иначе обстоят дела с приобретенным иммунитетом. Как и во времена Н.И. Вавилова, здесь превалирует определенный скептицизм как у фитопатологов, так и у генетиков. Однако и в этом направлении работы продолжают, и совершенно был прав Н.И. Вавилов, который писал: «исследование в этой области в ближайшие годы должно быть направлено на всемерное изучение новых фактов приобретенного иммунитета, его значения в явлениях паразитизма, специализации паразитов и на практическое применение вакцин ... для исследователя этот раздел представляет совершенно бесспорно исключительные возможности» (Вавилов, 1935, С. 903). Познание природы обоих типов иммунитета предполагает генетическое изучение пары «растение–патоген» (грибы, бактерии, вирусы). В этом направлении проводились и проводят-

ся исследования сотрудниками лаборатории генетики растений Института общей генетики им. Н.И. Вавилова, результаты которых и представлены в настоящей статье.

Естественный иммунитет

В целом формы взаимоотношений растений с фитопатогенами могут быть представлены двумя положениями. Это устойчивость, подразделяемая на специфическую и неспецифическую, и восприимчивость, которая в свою очередь может быть подразделена на толерантность и чувствительность (Дьяков, 2003). Подобная система взаимоотношений детерминирована различными генетическими системами как растения, так и паразита.

Вирусные болезни томатов. Основой исследования естественного иммунитета у томатов послужили работы по изучению генетики устойчивости томатов к вирусу табачной мозаики (ВТМ) (Сухов и др., 1982). ВТМ является возбудителем массового и постоянно повторяющегося заболевания томатов как в тепличной культуре, так и в полевой. В результате поражения ВТМ томатов у последних развивается мозаичность расцветки листьев и их деформация. Изучали эффективность генов *Tm1*, *Tm2* и *Tm2²*, определяющих устойчивость томатов к ВТМ, а также разнообразие и патогенность штаммов, встречающихся на территории бывшего СССР. При этом особое внимание было уделено реакции растений томатов, различающихся по генам устойчивости, на остропатогенные штаммы ВТМ.

Ген толерантности *Tm1* (хромосома 5) был впервые обнаружен в потомстве от скрещивания культурного томата *Lycopersicon esculentum* Mill с диким видом *L. hirsutum* Hamb. Гены *Tm2* и *Tm2²* (хромосома 9), детерминирующие реакцию сверхчувствительности, также происходят от дикого вида *L. peruvianum* L. Все вышеприведенные гены эффективны в доминантном состоянии. Ген *Tm1* способен экспрессироваться и в протопластах в отличие от генов *Tm2* и *Tm2²* (Motoyoshi *et al.*, 1977; Watanabe *et al.*, 1987). Хотя гены устойчивости изучены уже давно, механизм их действия практически не ясен. Известно, что для защиты от патогенов растения синтезируют целый набор белков,

которые обладают антимикробным действием. На основании гомологии аминокислотных последовательностей и/или трехмерной структуры эти антимикробные белки (AMP) подразделяют на 18 семейств. К наиболее изученным семействам антимикробных белков относятся PR-белки: PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5, PR-8, PR-11 и рибосомоинактивирующие белки (RIPs). Белки, связанные с патогенезом (PR-белки), были впервые обнаружены в растениях *Nicotiana tabacum* L. при сверхчувствительной реакции на ВТМ инфекцию. Позднее было обнаружено, что они образуются в растениях при заражении различными индукторами как биогенной, так и абиогенной природы: вирусами, грибами, бактериями, виридами, гормонами, химическими соединениями различной природы, осмотическим шоком. В связи с этим первой целью нашей работы по изучению генов устойчивости к ВТМ у томатов было выявление и изучение свойств PR-белков у растений родов *Nicotiana* L. и *Lycopersicon* L. с разными генами устойчивости при вирусной инфекции, а также их роли в защитных механизмах. Основными задачами были следующие: исследование спектров PR-белков у различных представителей рода *Nicotiana* при сверхчувствительной и системной реакциях на вирусную инфекцию, локализация PR-белков в различных частях растения при сверхчувствительной реакции на заражение, изучение кислоторастворимых белков в растениях томатов с разными генами устойчивости к ВТМ при заражении соответствующими штаммами вируса, изучение изменений в спектре кислоторастворимых белков при перекрестной защите. Методом электрофореза в полиакриламидном геле исследованы PR-белки, которые образуются в растениях табаков и томатов с разными генами устойчивости к инфекции ВТМ. Показано, что у гибридного табака Терновского (*N. glutinosa* L. × *N. tabacum* L.) спектр PR-белков совпадает с таковым *N. tabacum*, причем их образование отмечено не только при сверхчувствительной реакции на ВТМ, но и при системной на ВОМ-1 (вирус огуречной мозаики). Установлено, что экспрессия PR-белков в растениях табака не связана непосредственно с геном сверхчувствительности *N*. В растениях томатов с генами устойчивости *Tm1*, *Tm2* и *Tm2²* в ответ на инфекцию ВТМ

обнаружены специфические белки, которые могут быть использованы в качестве маркеров соответствующих генов в селекционном процессе. У растений томатов различного генотипа при вирусной инфекции обнаружен белок P15, который выделен и охарактеризован по аминокислотному составу. Показана его идентичность белку, выделенному ранее из восприимчивых растений томатов при виroidной инфекции. Установлено, что PR-белки в растениях табака индуцируются как под действием вирусной инфекции, так и при механическом повреждении листа, причем наибольшее количество PR-белков наблюдается вблизи некрозов, по мере удаления от них содержание PR-белков в листьях падает.

Вторым направлением исследований было изучение структурно-функциональных изменений в хлоропластах томатов с разными генами устойчивости к вирусу табачной мозаики при заражении вирусом (Одинцова и др., 1996). Было установлено, что реакция растения томата на заражение вирусом зависит не только от генетики хозяина (наличия или отсутствия генов *Tm*), но и от генотипа вируса. Заражение одного и того же растения томата различными штаммами вируса может вызывать разные симптомы: от резкого хлороза до практически полного отсутствия каких бы то ни было признаков заболевания. На какие молекулярные и клеточные процессы влияет вирусная инфекция, приводящая к развитию хлороза, было неизвестно, так как данные литературных источников крайне противоречивы. Однако был сделан вывод о несомненности факта, что в основе развития мозаичного заболевания лежит нарушение структуры и функций хлоропластов. Для проверки этого вывода растения томатов с генами *Tm1*, *Tm2* и *Tm2²*, а также изогенные линии томатов, отличающиеся по генам устойчивости к ВТМ, заражали желтым штаммом ВТМ Латеро (0, 1, 2, групп) и штаммом N2², который относится к 0 группе ВТМ и способен преодолевать устойчивость гомозиготных по генам *Tm2* и *Tm2²* растений, вызывая системный некроз. Все использовавшиеся штаммы вирусов были выделены в нашей лаборатории. Проведенные исследования показали, что в растениях томатов разного генотипа при явных симптомах мозаичного заболевания наблюдаются сущест-

венные изменения в ультраструктуре пластид и в составе мембранных и растворимых белков, приводящих к нарушению фотосинтеза и транскрипционной активности хлоропластов. В таких растениях обнаруживается белок оболочки вируса как в мембранной, так и в растворимой фракциях хлоропластов. Было показано, что в растениях с симптомами мозаики существенно подавлена активность фотосистемы II транскрипционная активность хлоропластов. Так, в восприимчивых формах томата, зараженных резким штаммом ВТМ, транскрипционная активность хлоропластов составляла лишь 20 % от активности у контрольных незараженных растений. У растений генотипов *Tm1Tm1* и *Tm2Tm2* – 50 % от контроля, а в растениях генотипа *Tm2²Tm2²* – 80 % от контроля. Таким образом, наличие в генотипе генов толерантности и устойчивости положительно влияло на транскрипцию хлоропластных генов при вирусной инфекции.

При системном некрозе у растений с генотипом *Tm2²Tm2²*, хотя ультраструктура пластид нарушена, как и в мозаичных растениях, функционирование хлоропластов подавлено в меньшей степени. В этом случае активность фотосистемы II уменьшилась приблизительно на 10 %, а транскрипционная активность хлоропластов на – 20 %. Одновременно с этим в растворимой фракции хлоропластов обнаружен ряд новых белков с молекулярными массами 34,27 и 16 кДа.

Основными результатами этих исследований является следующее: 1) создание коллекции особо патогенных штаммов ВТМ, собранных в различных регионах бывшего СССР. Эта коллекция представляет собой уникальную основу для исследований естественного иммунитета; 2) изучение взаимодействия генотипов томата с различными генами устойчивости с наиболее патогенными изолятами ВТМ позволило, совместно с сотрудниками НИИОХ, предложить эффективные схемы селекции гибридов томата. Эти схемы основываются на следующих наблюдениях. Наиболее высокая устойчивость к ВТМ свойственна генотипам, включающим гены *Tm2* и *Tm2²* с геном *Tm1* в гомозиготном или гетерозиготном состоянии. Естественно, что селекционеру собрать в одном геноме гибрида все гены устойчивости трудно.

Однако, если учесть, что, по нашим данным, генотипы $Tm2^2Tm2^2Tm1+$, $Tm2^2Tm2^2Tm1Tm1$ и $Tm2^2+Tm1+$ полностью устойчивы ко всем распространенным в России штаммам ВТМ, задача создания ВТМ-устойчивых гибридов представляется реальной; 3) проведенные исследования послужили основой для создания противовирусных вакцин для защиты растений (об этом ниже).

Естественный иммунитет у пшеницы. Исследование естественного иммунитета у пшениц было начато нами с целью интрогрессии генов устойчивости к бурой ржавчине (*Puccinia recondita*) и мучнистой росе (*Erisiphe graminis*) из генома пшениц секции *Timopheevii* A. Filat. et Dorof. в геном мягкой пшеницы. Обоснованием этого направления генетических исследований послужили следующие предпосылки:

1. Успешные опыты мирового сообщества по передаче генов устойчивости к фитопатогенам при отдаленной гибридизации. Удачный пример – это передача *Tm* генов от дикорастущих видов в геном томата (см. выше);

2. Существование видов пшениц секции *Timopheevii* (естественные *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk., *T. militinae* Zhuk. et Migush. и синтетический *T. kiharae* Dorof. et Migusch.), которые несут гены устойчивости ко многим фитопатогенам и, в частности, к таким широко распространенным, как бурая ржавчина и мучнистая роса. Самое удивительное следующее. В скрещиваниях вид *T. timopheevii* вовлекался многократно, но в геном мягкой пшеницы интрогрессировано только два гена: *Lr18* (McIntosh *et al.*, 1995) и *Pm37* (McIntosh *et al.*, 2007). Первый локализован на хромосоме 5BL, а второй – на хромосоме 7AL. Такие исследования открывают возможность исследовать цитогенетическими методами закономерности передачи наследственного материала в инконгруэнтных скрещиваниях рода *Triticum* L. и использовать молекулярно-генетические методы для идентификации интрогрессированного генетического материала и, наконец, позволят выделить линии мягкой пшеницы с хозяйственно ценными признаками в качестве исходного материала для селекции.

В результате нами были осуществлены скрещивания яровой мягкой пшеницы сорта Родина и озимой пшеницы линии 383 (мутант

сорта Мироновская 808) с видами *T. timopheevii* (геном A^1A^1GG , $2n = 28$), *T. militinae* (A^1A^1GG , $2n = 28$) и *T. kiharae* ($A^1A^1GGD^{sq}D^{sq}$, $2n = 42$). Сорт Родина и линия 383 во всех скрещиваниях служили материнской формой. В итоге из различных гибридных комбинаций было отселектировано к F_{10} 38 линий, которые характеризовались высокой фертильностью и устойчивостью к изучавшимся фитопатогенам. По устойчивости они распределялись следующим образом: 6 линий были иммунны к бурой ржавчине и мучнистой росе, 122 были устойчивы к бурой ржавчине и мучнистой росе, а 23 были устойчивы к бурой ржавчине, но поражались мучнистой росой. При этом среди всех этих групп преобладали линии, выделенные в комбинациях с *T. kiharae*, которые составляли в первой группе 66,7 %, во второй – 58,3 %, и в третьей – 86,9 %. В связи с тем, что мы были одними из первых, кто использовал вид *T. kiharae* в инконгруэнтных скрещиваниях, можно утверждать, что полученные данные показывают ценность этого гексаплоидного синтетического вида для интрогрессии генов устойчивости. Описанные выше линии послужили нам материалом для проведения последующих цитогенетических и молекулярно-генетических исследований.

С помощью С-метода дифференциального окрашивания хромосом были изучены кариотипы иммунных и устойчивых линий (Бадаева и др., 2000). Показано, что передача чужеродного материала в геном мягкой пшеницы осуществляется за счет замещения целых хромосом A^1 , G- и D-геномов, хромосомных плеч или их фрагментов. Спектр хромосомных замещений у устойчивых линий отличался от такового в интрогрессивных гибридах, отбор которых проводился по другим признакам. Замещения по хромосомам 6G, $2A^1$, 2G и 5G установлены у 31, 23, 18 и 13 линий соответственно. Не было обнаружено ни у одной линии замещений по хромосомам 4G, $4A^1$ и $6A^1$. У 15 линий идентифицирована 5BS.5BL-5GL транслокация. Высокая частота замещений по хромосомам $2A^1$, 2G, 5G и 6G, наблюдаемая у устойчивых к бурой ржавчине и мучнистой росе линий, может в определенной степени свидетельствовать о том, что в них локализованы гены устойчивости к бурой ржавчине и мучнистой росе. Нельзя исключить наличие подобных же генов в хромосомах $5D^{sq}$

и 2D^{sq}, интрогрессированных в гибриды от *T. kiharae*. Искусственное заражение ряда линий различными патотипами возбудителей бурой ржавчины подтвердило высокую устойчивость этих линий к данному фитопатогену.

Дальнейшее использование полученных линий, как правило, сопряжено с процессами постепенной элиминации чужеродных хромосом или их фрагментов. Часто трудно в дальнейшем определить факт кроссинговера между гомологичными хромосомами для оценки возможности получения кроссоверов с частью материала чужеродных хромосом. Для изучения их происхождения был проведен поиск молекулярных маркеров, тесно сцепленных с интрогрессированными генами устойчивости к фитопатогенам. Для этого был проведен RAPD-анализ ДНК пшениц родительских и гибридных форм, контрастных по устойчивости к бурой ржавчине и мучнистой росе, а именно: *T. kiharae*, *T. timopheevii*, линия 353 (восприимчивая форма), и межвидовые гибриды от скрещивания линии 353 × *T. kiharae* – линия 224/2–9 (иммунная форма) и линия 225/2–96 (восприимчивая форма). Всего было использовано около 60 праймеров.

В результате проведенного анализа среди продуктов амплификации праймера 29 (5'–TGG TCA CAG A-3') был выявлен полиморфный ампликон размером около 550 н.п., который присутствовал у устойчивых форм, но отсутствовал у восприимчивых к фитопатогенам линий (рис. 1). Эти данные позволяют сделать вывод о том, что полиморфный фрагмент ДНК, амплифицированный с праймера 29, может быть ассоциирован с устойчивостью пшеницы к исследованным фитопатогенам.

Праймер 29 был протестирован на 45 интрогрессивных линиях пшеницы, полученных от скрещивания мягкой пшеницы с *T. timopheevii*, *T. militinae* и *T. kiharae*, различающихся по степени устойчивости к возбудителям бурой ржавчины и мучнистой росы. Полученные результаты позволяют предположить, что данный полиморфный ампликон ассоциирован с устойчивостью пшеницы к бурой ржавчине.

Полиморфный фрагмент ДНК, амплифицированный посредством RAPD-метода с праймера 29, был клонирован и секвенирован. На основании результатов секвенирования были синтезированы SCAR (sequence characterized

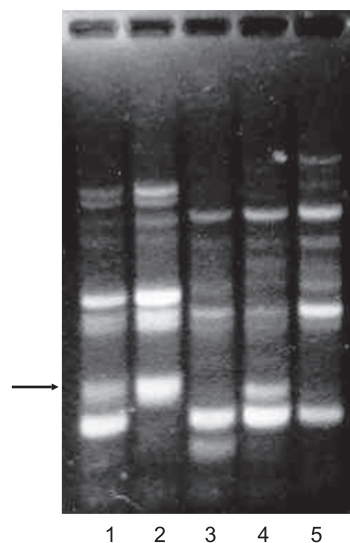


Рис. 1. RAPD-амплификация ДНК пшениц с праймером 29.

1 – *T. kiharae*, 2 – *T. timopheevii*, 3 – линия 353 (восприимчивая форма), 4 – линия 224/4-96 (устойчивая форма), 5 – линия 225/2-96 (восприимчивая форма). Стрелкой показан полиморфный ампликон.

amplified region) праймеры – прямой (DIR primer) и обратный (REV primer), включающие в свой состав последовательность RAPD-праймера и прилегающие к нему внутренние области клонированного фрагмента. Была проведена реакция амплификации со вновь синтезированными SCAR-праймерами. В устойчивых к бурой ржавчине линиях с данного праймера амплифицировался один фрагмент ДНК, в восприимчивых к бурой ржавчине линиях сигнал отсутствовал. В настоящее время продолжается работа по тестированию вновь синтезированных SCAR-праймеров и подбору условий надежной амплификации.

Параллельно с изучением отдаленных гибридов для выявления генетических особенностей естественного иммунитета была начата работа по исследованию дефензинов у устойчивых и восприимчивых к фитопатогенам видов пшениц. Применительно к пшенице подобные исследования ранее не проводились. Дефензины являются важнейшими белками, обеспечивающими растениям устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам. Для выяснения механизмов врожденного иммунитета растений изучение белков, обуславливающих устойчивость к патогенам и стрессовым фак-

торам среды, представляется не менее перспективным, чем исследование генов устойчивости. При этом существует возможность получить представление не только о генах, непосредственно защищающих растения от патогенов, но и выяснить связь иммунитета определенных видов растений с условиями среды. Н.И. Вавилов писал: «Та или иная реакция сортов, иммунитет или, наоборот, восприимчивость определяется, по существу, тремя категориями факторов: с одной стороны, наследственными особенностями сорта, с другой – избирательной способностью, или специализацией видов паразитов или их отдельных рас и с третьей стороны – также условиями среды» (Вавилов, 1935, С. 918).

Дефензины являются цистеин-богатыми антимикробными пептидами, обнаруженными как в животном, так и в растительном царстве. Они обладают антифунгальной, антибактериальной и инсектицидной активностями, что было продемонстрировано в экспериментах *in vitro* и при исследовании трансгенных растений. Поиск новых высокоактивных дефензинов представляет большой интерес для создания трансгенных растений, устойчивых к патогенным микроорганизмам, а также для разработки новых лекарственных препаратов в качестве альтернативы традиционно используемым антибиотикам.

Известно, что дефензины обладают видовой специфичностью, т. е. отличаются по аминокислотной последовательности у разных видов растений. Сравнение аминокислотных последовательностей разных представителей семейства дефензинов показало, что гомология первичной структуры в различных группах растений крайне низка и ограничивается лишь консервативным расположением 8 остатков цистеина. Вариабельность первичной структуры, видимо, определяет разнообразие биологических активностей дефензинов. Несмотря на низкий консерватизм аминокислотных последовательностей, пространственная структура растительных дефензинов в целом одинакова и включает 3 тяжа бета-структуры и одну параллельно расположенную альфа-спираль, удерживаемые в компактной структуре 4 внутрицепочечными дисульфидными связями. Интересно отметить, что пространственная организация дефензинов во многом напоминает

структуру нейротоксинов, блокаторов ионных каналов. Несмотря на то, что роль дефензинов во врожденном иммунитете растений можно считать установленной, многое еще, в частности механизм и специфичность действия дефензинов, остаются малоизученными. Одним из подходов к выяснению их функций может быть сравнительное изучение дефензинов устойчивых и восприимчивых к патогенам сортов.

Целью наших исследований был сравнительный анализ дефензинов семян высокоустойчивого к фитопатогенам вида пшеницы *T. kiharae* и восприимчивых к патогенам сортов мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.) Хакасская и Родина. Кроме того, был исследован состав дефензинов у дикорастущих предполагаемых доноров геномов полиплоидных пшениц: *T. monococcum* L. (А геном), *Aegilops speltoides* Tausch (В геном) и *Ae. squarrosa* L. (D геном). Для выделения дефензинов был разработан оригинальный метод, включающий кислотную экстракцию семян и различные типы высокоэффективной жидкостной хроматографии (аффинную, гель-проникающую и обращенно-фазовую) в сочетании с масс-спектрометрией. Выделенные пептиды секвенировали путем автоматической дегградации по Эдману на секвенаторе Procise модели 492 (Applied Biosystems). Молекулярные массы пептидов определяли путем MALDI-TOF масс-спектрометрии на масс-спектрометре M@LDI-LR (Micromass, Великобритания).

В результате из семян пшеницы *T. kiharae* было впервые выделено и секвенировано 13 дефензинов, которые по гомологии N-концевых последовательностей были подразделены на 3 группы (табл. 1). Группа I включала 8 новых дефензинов, названных D-дефензинами. Группа II состояла из 3 пептидов, два из которых были ранее обнаружены в зерновках твердой пшеницы. В группе III оказались 2 новых пептида, гомологичные омега-гордотионинам (дефензинам) ячменя. Размер D-дефензинов варьировал от 45 до 49 аминокислотных остатков. По заряду они также различались. Как и большинство антимикробных пептидов, D-дефензины положительно заряжены, кроме D1.1. Сравнение аминокислотных последовательностей пептидов этой группы показало, что помимо 8 остатков цистеина, положение которых идентично у всех изученных дефензинов, у исследованных

Таблица 1

Аминокислотные последовательности дефензинов семян *T. kiharae* и *T. monococcum*

Пептид	Аминокислотная последовательность	Мол. масса (Da)*, изм./выч.
Группа I, D-дефензины		
Tk-AMP-D1	RTCQSQSHKFKGACFSDTNCDSVCRTEFPRGQCNQHHVERKCYCERDC ⁴⁹	5735/5736
Tm-AMP-D1.2	RTCQSQSHKFKGACFSDTNCASVCRTEFPRGQCNQHHVERKCYCERDC ⁴⁹	5693/5692
Tk-AMP-D2	RTCESQSHKFKGPCFSDSNCAVCRTEFPRGQCNQHHVERKCYCERSC ⁴⁹	5691/5691
Tk-AMP-D1.1	RDCESDSHKFKHGACFSDTNCANVCQTEGFTAGKCVGVQRHCHCTKDC ⁴⁷	5130/5130
Tk-AMP-D5	RECRSESKKFFVGLCVSDTNCASVCLTERFPGGKCDGYRRCFCTKDC ⁴⁶	5151/5152
Tk-AMP-D6	RDCRSQSKTFVGLCVSDTNCASVCLTEHFPGGKCDGYRRCFCTKDC ⁴⁶	5089/5091
Tk-AMP-D6.1	RECRSQSKQFVGLCVSDTNCASVCLTEHFPGGKCDGYRRCFCTKDC ⁴⁶	5130/5132
Tk-AMP-D3	RDCKSDSHKFKHGACFSDTNCANVCQTEGFTRGKCDGIHCHCIKDC ⁴⁵	4970/4971
Tk-AMP-D4	RDCTSQSHKFFVGLCLSDRNCASVCLTEYFTGGKCDHRRCVCTKGC ⁴⁵	4980/4982
Группа II, γ-дефензины		
Tk-AMP-γ1	KICRRRSAGFK ¹⁰	5250
Tk-AMP-γ2	KVCRQRSAGFK ¹⁰	5141
Tk-AMP-γ3	KICRQRSGFK ¹⁰	5265
Группа III, ω-дефензины		
Tk-AMP-ω1	RICTGKSQHN ¹⁰	5346
Tk-AMP-ω2	RVCTGKSQHN ¹⁰	5342

* Измеренные (изм.) и вычисленные (выч.) молекулярные массы приведены для невозстановленных пептидов; рассчитанные массы приведены только для полностью секвенированных D-дефензинов.

D-дефензинов 12 других аминокислотных остатков также совпадают, что свидетельствует о высокой гомологии структуры и, вероятно, о происхождении от общего предка. Более вариabельными как по длине, так и по аминокислотной последовательности, оказались C-концевые фрагменты молекул, в частности петля, соединяющая бета2 и бета3 тяжи вторичной структуры. Интересно, что имеющиеся к настоящему времени литературные данные свидетельствуют о том, что этому участку молекулы принадлежит решающая роль в определении биологической активности дефензинов. Выявленные нами различия в аминокислотных последовательностях этого участка молекулы, по всей видимости, свидетельствуют о различных функциях D-дефензинов. Сравнение аминокислотных последовательностей D-дефензинов с дефензинами других злаков по программе CLUSTAL W показало наибольшую гомологию с TAD1-

дефензином, индуцированным в пшенице при холодной адаптации, что свидетельствует о том, что обнаруженные нами D-дефензины также могут принимать участие в ответе растения на стрессовые факторы окружающей среды. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей также выявил определенную гомологию с дефензинами *Sorghum bicolor* (L.) Moench и *Zea mays* L. В то же время сходства с дефензинами других семейств значительно меньше. Представляло интерес изучить компонентный состав дефензинов у предполагаемых доноров элементарных геномов полиплоидных пшениц, что позволило бы локализовать соответствующие гены в геномах полиплоидов, а также пролить свет на филогению представителей рода *Triticum*. Дефензины выделяли по той же методике, которая была разработана для *T. kiharae*, и идентифицировали на основе трех критериев: времени элюции при обращенно-фа-

зовой хроматографии, по молекулярной массе, определенной путем масс-спектрометрии, и N-концевых аминокислотных последовательностей. Оказалось, что D-дефензины присутствуют во всех исследованных диплоидных видах, однако набор их видоспецифичен (табл. 2).

Особо следует отметить высокий консерватизм структуры D-дефензинов, которая сохранилась неизменной в течение более 10 тыс. лет, прошедших с момента доместикации полиплоидных форм пшеницы. Гексаплоидная пшеница, содержащая 3 родственных генома: A, B и D, произошла от диплоидных видов путем гибридизации с последующей амфилоидизацией и приобрела от них соответствующие D-дефензины. В результате анализа дефензинов диплоидных видов родов *Triticum* и *Aegilops* L. нам удалось локализовать большинство генов, кодирующих D-дефензины, в геномах полиплоидной пшеницы. D1, D4 и D5 кодируются A геномом, D3 и D6 – D геномом, а D6.1 и D3.1 – B геномом. Анализ дефензинов восприимчивых сортов Хакасская и Родина показал, что по составу дефензинов они не отличаются от *T. kiharae*, несмотря на различия геномного состава (ABD у *T. aestivum* и AGD у *T. kiharae*). Эти результаты свидетельствуют, во-первых, о сходстве B и G геномов, а во-вторых, об отсутствии прямой связи между составом дефензинов, по крайней мере D-дефензинов, и устойчивостью при так называемой совместимой комбинации растение–патоген. Можно предположить, что различный уровень устойчивости сравниваемых видов связан с различным уровнем экспрессии генов, кодирующих дефензины, в ответ на действие патогенов.

В своих исследованиях мы исходим из положения, что поиск новых высокоактивных антимикробных пептидов представляет интерес как для создания трансгенных растений с повышенной устойчивостью к патогенам, так и для разработки лекарственных препаратов (антибиотиков и антимикотиков) нового поколения. С использованием новейших методов физико-химической биологии из семян *T. kiharae* выделено 2 новых антимикробных пептида, названных Tk-AMP-X1 и Tk-AMP-X2. С помощью масс-спектрометрии установлены их молекулярные массы: 3517 и 3857 Da соответственно. Показано, что эти пептиды содержат по 4 остатка цистеина, образующих 2 дисульфидных связи, причем остатки цистеина Cys1 и Cys2 так же, как и Cys3 и Cys4, разделены тремя аминокислотными остатками. Путем автоматической деградации по Эдману были установлены полные аминокислотные последовательности выделенных пептидов:

Tk-AMP-X1 ¹TDDRCERMCQHYHDRREKK QCMKGCYRGESD³¹

Tk-AMP-X2 ¹ADDRCERMCQRYHDRREKK QCMWRCRY²⁷.

Сравнение аминокислотных последовательностей пептидов Tk-AMP-X1 и Tk-AMP может свидетельствовать о том, что оба пептида произошли от общего предкового гена. Помимо единичных точечных замен, Tk-AMP-X1 и Tk-AMP-X2 различаются между собой по длине C-концевой области молекулы. Показано, что дисульфидные связи в молекулах исследованных пептидов образованы остатками цистеина Cys1 и Cys4, а также Cys2 и Cys3. Методом КД-спектроскопии изучена вторичная структура

Таблица 2

Состав дефензинов семян *T. kiharae* и родственных видов

Вид	Геномный состав	Дефензины									
		D1	D1.1	D1.2	D2	D3	D3.1	D4	D5	D6	D6.1
<i>T. monococcum</i>	A ^b A ^b	–	+	+	–	–	–	+	+	–	–
<i>Ae. speltoides</i>	SS(BB)	–	–	–	+	–	+	–	–	–	+
<i>Ae. squarrosa</i>	DD	–	–	–	+	+	–	–	–	+	–
<i>T. aestivum</i> cv. Родина	A ^u A ^u BBDD	+	+	–	+	+	–	+	+	+	+
<i>T. aestivum</i> cv. Хакасская	A ^u A ^u BBDD	+	+	–	+	+	–	+	+	+	+
<i>T. kiharae</i>	A ^b A ^b GGDD	+	+	–	+	+	–	+	+	+	+

Тк-АМР-Х1 и Тк-АМР-Х2. Показано, что оба пептида являются альфа-спиральными и не содержат элементов бета-структуры. Предложена модель пространственной упаковки полипептидной цепи в исследованных пептидах, согласно которой два участка альфа-спирали расположены параллельно друг другу, причем структура стабилизируется двумя дисульфидными связями, «скрепляющими» между собой альфа-спиральные участки. Одновременно исследовали способность выделенных АМП ингибировать прорастание спор некоторых фитопатогенных грибов (*Fusarium graminearum*, *Fusarium gramineicola*, *Colletotrichum gramineicola* и *Diplodia maydis*) *in vitro*. Установлено, что IC50 для обоих видов *Fusarium* составляет 7–12 мкг/мл, а для *Diplodia maydis* – 20–30 мкг/мл. Таким образом, наши данные показали, что активность выделенных антимикробных пептидов не уступает, а в ряде случаев и превосходит активность антимикробных пептидов других видов растений. Сравнение активностей пептидов Тк-АМР-Х1 и Тк-АМР-Х2 показало, что триптофан-содержащий и более короткий пептид Тк-АМР-Х2 обладает несколько большей ингибирующей активностью по отношению к исследованным грибам, чем Тк-АМР-Х1. Для выяснения молекулярных основ этих различий, а также механизма действия пептидов необходимо было исследование их пространственной структуры. Для этого был осуществлен химический синтез пептида Тк-АМР-Х2 и его рефолдинг. Полученные результаты свидетельствуют о том, что выделенные из семян *T. kiharae* пептиды Тк-АМР-Х1 и Тк-АМР-Х2 способны ингибировать рост ряда фитопатогенных грибов и, следовательно, являются перспективными для трансформации растений с целью повышения их устойчивости к патогенным грибам. Помимо пептидов Тк-АМР-Х1 и Тк-АМР-Х2 из семян пшеницы *T. kiharae* был выделен новый антимикробный пептид Тк-АМР-Н1 с уникальным 10-цистеиновым мотивом и была установлена аминокислотная последовательность этого пептида. Для получения этого пептида в количестве, необходимом для биологических испытаний, на основе данных по аминокислотной последовательности были подобраны праймеры и синтезирован синтетический ген для экспрессии его в *E. coli*. Ген Тк-АМР-Н1 был встроен в коммерческий вектор

pET-32b, который позволяет получать большое количество целевого пептида, слитого с нативным белком *E. coli* тиоредоксином, и проведена экспрессия этого гена в клетках *E. coli*. Путем аффинной хроматографии пептид Тк-АМР-Н1 был очищен от белков бактерии. Идентичность структуры полученного пептида нативному Тк-АМР-Н1 была подтверждена хроматографическими методами. Полученный пептид будет протестирован на способность подавлять рост фитопатогенных бактерий и грибов.

Полученные результаты показали высокий внутривидовой полиморфизм дефензинов пшеницы, что, по всей видимости, обусловлено необходимостью противостоять широкому кругу фитопатогенов, а также высокий консерватизм их аминокислотных последовательностей в эволюции, что свидетельствует о жизненно важных функциях этой группы антимикробных пептидов.

Приобретенный иммунитет

Противовирусные вакцины растений.

Наряду с изучением естественного иммунитета в нашей лаборатории ведутся работы по изучению проблемы приобретенного иммунитета. В своих работах мы руководствуемся выводом Н.И. Вавилова, который писал: «Отрицать теоретически возможность и наличие приобретенного иммунитета, однако, не приходится» (Вавилов, 1935, С. 896). Следует признать, что многое в этой проблеме до сих пор не ясно и требуется изучение как генетической реакции растения, так и генетики паразита (в нашем случае вирусов). Решение ряда вопросов стало возможным после создания противовирусных вакцин (Сухов и др., 1979, 1982; Извекова и др., 1990). В лаборатории под руководством профессора К.С. Сухова на основе аттенуированных штаммов вирусов было создано несколько вакцин. В настоящее время проводится работа с двумя вакцинными штаммами: ВТМ V-69 и ВИРОГ-43 (штамм вируса зеленой крапчатой мозаики огурца – ВЗКМО). При создании вакцины работа включала:

- выделение биологически чистого вакцинного штамма, обладающего высокой генетической стабильностью, длительным вакцинирующим эффектом, бессимптомностью;
- разработку технологии получения препарата в оптимальных количествах;

– разработку способов сохранения и использования вакцины.

Штамм ВТМ V-69 является естественным штаммом ВТМ, который был отселектирован из популяции томатных штаммов ВТМ на производственных посадках (140 000 растений) тепличного комбината совхоза «Московский». Штамм показал высокую генетическую стабильность (0,3 % ревертантов) и был рекомендован для использования на производственных посевах в условиях закрытого грунта. Вакцинация растений томата штаммом V-69 является надежной перекрестной защитой от патогенных штаммов ВТМ, а также от других групп вирусов, так как отсутствует синергизм.

Представляло интерес решение вопроса о генетике возникновения аттенуированных штаммов ВТМ и обратных мутациях, приводящих к появлению патогенных ревертантов.

Решение этого вопроса обеспечивает базу для создания (скорее конструирования на молекулярном уровне) новых вакцин, генетической стабилизации старых вакцин и наконец для создания новых векторных систем.

Молекулярно-генетическое исследование штамма V-69 и его ревертантов. Показано, что геном ВТМ V-69 содержит 38 нуклеотидных замен относительно патогенного томатного штамма L, выделенного в Японии. Шесть нуклеотидных замен вызывают изменения аминокислот в кодируемых вирусом белках. Две аминокислотные замены в геликазном домене репликазы (Gln→Glu⁹⁷⁹ и His→Tyr⁹⁸⁴) отвечают за способность вирусов размножаться в томатах с геном устойчивости *Tm-1* (рис. 2а, б). Другие три аминокислотные замены, находящиеся также в белках репликазы, характерны только для штамма ВТМ V-69, локализованы вне функциональных доменов и не связаны с нарушением каталитических функций. Две консервативные замены His → Arg⁵²⁸ и Glu → Asp⁶⁷² находятся в варибельном участке, разделяющем митилтрансферазный и геликазный домены 126/183К-белков, и одна замена Lys → Glu¹⁵⁴⁶, влияющая на заряд, – в полимеразном домене 183К-белка. Замена аминокислоты Ala на Ser⁸⁶ в гене белка оболочки не является, строго говоря, мутацией, так как в данном положении обе эти аминокислоты являются типичными для разных видов тобамовирусов.

Для того чтобы определить, какая именно аминокислотная замена является решающей в ослаблении патогенности, нужно было проверить влияние всех шести аминокислотных замен и их комбинаций на патогенность вируса. Однако в нашем распоряжении имелась серия спонтанных патогенных ревертантов V-69, которые на восприимчивых растениях (как на табаках, так и на томатах) вызывают зеленую мозаику и деформацию листьев. Ревертанты как ближайшие потомки аттенуированного штамма должны иметь с ним минимальные различия, локализованные в области мутаций, определяющих аттенуацию. Поэтому нам представлялось более простым просеквенировать ревертанты и сравнить их с родительским штаммом ВТМ V-69.

В результате полного секвенирования 4 геномов патогенных ревертантов (R1, R2, R2-76, R3) аттенуированного штамма V-69 было подтверждено наличие всего набора мутаций, характерных для штамма V-69, кроме единственной нуклеотидной замены в позиции 1654, где произошла замена G на A (см. рис. 2б). Эта замена приводит к реверсии Arg⁵²⁸ на His⁵²⁸, характерной для патогенного штамма ВТМ L. В двух ревертантах (R1 и R3) не было обнаружено никаких дополнительных мутаций, а в двух других (R2 и R2-76) были обнаружены три молчащие мутации, которые не затрагивают известных регуляторных участков генома вируса.

Введенная в полноразмерную кДНК-копию аттенуированного штамма ВТМ V-69 единственная обнаруженная реверсия, как и следовало ожидать, приводит к появлению патогенности транскриптов, получаемых с кДНК аналогов ревертантов. Таким образом, можно утверждать, что основной вклад в механизм аттенуации ВТМ V-69 вносит соответствующая мутация в позиции 1654 вирусного генома.

Обнаруженная во всех ревертантах высокая воспроизводимость структуры генома ВТМ V-69 является неожиданной, так как считается, что репликазы, не имеющие корректирующих систем ДНК-полимераз, не точны при репликации генетического материала. При этом обращают на себя внимание значительные различия нуклеотидных последовательностей между штаммами V-69 и L и наблюдавшийся полиморфизм в нуклеотидной последовательности самого штамма ВТМ V-69. По-видимо-

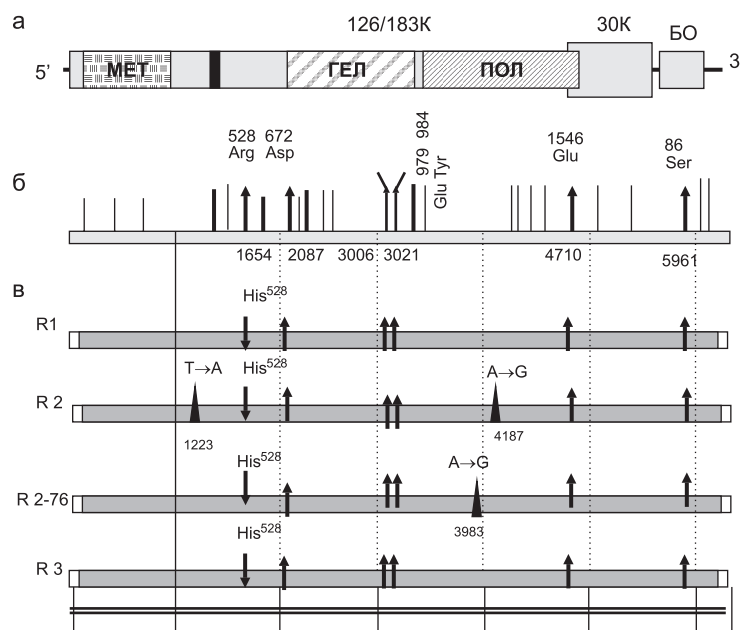


Рис. 2. Схемы: а – структура генома томатного штамма ВТМ; б – карта расположения в геноме ВТМ V-69 мутаций относительно штамма L; в – карта отличий геномов ревертантов от ВТМ V-69.

а – 126/183К – гены белков репликазы, 30К – ген транспортного белка, БО – ген белка оболочки. Белок репликазы содержит функциональные домены: МЕТ – метилтрансферазный, ГЕЛ – геликазный и ПОЛ – полимеразный; зачерненная область соответствует консервативному участку, характерному для многих фитовирусов. Незачерненные прямоугольники – несеквенированная область; б – | – молчание мутации, ↑ – аминокислотные замены, над стрелкой указаны название АК и их положение; в – ▲ – молчание мутации относительно штамма V-69, ↓ – реверсия к дикому типу.

му, существуют дополнительные механизмы (растения–хозяина или вируса), поддерживающие точное воспроизведение исходной РНК и сильно ограниченное количество допускаемых конфигураций вирусных белков.

Для ВТМ V-69 показано снижение, приблизительно в 3 раза, уровня накопления вирусных частиц в растениях относительно его патогенных ревертантов, что, возможно, свидетельствует о некотором дефекте репликации вируса. Было показано (Снегирева и др., 2005), что феномен аттенуации тобамовирусов связан с белками репликазы, а именно с неконсервативной областью между метилтрансферазным и геликазным доменами. Известно, что эта область состоит из двух субдоменов, разделенных консервативной областью с неизвестной функцией, но гомологичной у многих фитовирусов. Аттенуирующие мутации могут находиться в обоих субдоменах. Эта спейсерная область между МЕТ- и ГЕЛ-доменами вместе с геликазным доменом играет важную регуляторную роль. Показано, что участок белка репликазы ВТМ, включающий аминокислотные

остатки 388–781, ответственен за локализацию вирусных белков на мембранах эндоплазматического ретикулума, места, где осуществляется репликация вируса. Также было показано, что часть неконсервативной области (314–423 а.о.) ответственна за прикрепление вирусной репликазы к 3'-концевой нетранслируемой области вирусной РНК. В этой же неконсервативной области находятся структуры, которые вместе с ТБ ответственны за ближний транспорт, хотя точная локализация аминокислот, отвечающих за эту функцию, не установлена. Очевидно, что неконсервативная область хотя и не несет каталитических функций, участвует в регуляции активности репликации, возможно, за счет организации репликативного аппарата или за счет регуляции супрессорной активности к посттранскрипционному молчанию генов, вызывающему усиленную деградацию вирусной РНК. Остается открытым вопрос, связан ли уровень накопления вирусных частиц со степенью проявления мозаичных и других симптомов. Не исключено, что белки репликазы, взаимодействуя через неконсервативный домен с белками

растения–хозяина, индуцируют нарушение метаболизма и развитие болезненных симптомов. В этом случае уровень синтеза репликазы и, как следствие, уровень накопления вируса могут лишь косвенно влиять на проявление симптомов. Остается неясным вопрос, как влияют различные механизмы аттенуации на защитные свойства вакцинных штаммов.

Штамм ВИРОГ-43 вируса зеленой крапчатой мозаики огурца (ВЗКМО) был получен воздействием азотной кислотой на препарат патогенного штамма ВЗКМО и дальнейшей селекцией слабопатогенных и бессимптомных изолятов вируса на растениях огурца. В последние годы генетическая стабильность этого штамма превышала показатель 98 % при высоком вакцинирующем эффекте и способности к интерференции с патогенными штаммами ВЗКМО. Штамм получил название ВИРОГ-43М.

Было проведено молекулярно-генетическое исследование этого штамма. С помощью прай-

мер-опосредованной прогулки по геному были определены первичные структуры штамма ВИРОГ-43М и двух резкопатогенных штаммов ВЗКМО, МС-1 и МС-2 (из коллекции лаборатории генетики растений ИОГен РАН).

По организации генома изоляты являлись типичными представителями тобамовирусов и содержали четыре открытые рамки считывания. Первые две кодировали белки репликазы: 129 и 186 кДа соответственно, третья – транспортный белок (ТБ – 29 кДа), а четвертая – белок оболочки (БО – 17,3 кДа).

Выведенную из нуклеотидной аминокислотную последовательность 129К, 186К, ТБ и БО исследуемых штаммов сравнивали с другими представителями тобамовирусов с помощью программы ClustalW, матрицы РАМ250 (табл. 3). Филогенетическое дерево, построенное на основе выравнивания 129К, 186К, ТБ и БО, представлено на рис. 3. В табл. 3 и на рис. 3 приведено сравнение лишь со штаммом МС-1, однако

Таблица 3

Сравнение аминокислотного состава 129К, 186К, ТБ и БО штаммов МС-1 с последовательностью аналогичных аминокислот других представителей тобамовирусов

Тобамовирус*	Регистрационный номер последовательности**	Страна	Растение–хозяин	Идентичные аминокислоты с МС-1, %			
				129К	186К	ТБ	БО
CGMMV	D12505	Япония	сетчатая дыня	99,2	99,1	98,5	99
CFMV	AF321057	Израиль	огурец	71,6	74,9	75,2	64,8
KGMMV	AJ295948	Япония	огурец	72,1	75,9	72,7	64,6
ZMMV	NS003878	Южная Корея	кабачок	71,9	75,7	72,8	63,4
SHMV	NS003878	Япония	кролярия	52,9	56,4	40,9	60,1
YoMV	U30944	Китай	арабидопсис	53,1	57,9	42,5	55,3
TMV	V01408	Англия	табак	53,1	57,9	42,9	54,7
TVCV	U03387	США	табак	52,9	57,9	41	54
ORV	S83257	Корея	орхидея	52,7	57,5	42,2	53,4
PMMoV	AB000709	Испания	перец	54,1	59,2	45,7	51,6
ToMV	AJ132845	Казахстан	томат	53,8	58,2	44,8	50,9
TMGMV	M34077	Испания	табак	54	58,1	49,1	49,7
PaMMV	NC004106	Япония	перец	53,6	58,5	44,2	48,5

* CGMMV – SH штамм ВЗКМО; CFMMV – вирус зеленой мозаики плодов огурца; KGMMV – С1 штамм кьюри вируса зеленой крапчатой мозаики огурца; ZGMMV – К штамм вируса зеленой крапчатой мозаики цуккини; SHMV – вирус мозаики кролярии; YoMV – вирус китайской мозаики рапса; TMV – U1 штамм вируса табачной мозаики; TVCV – OSU штамм вируса посветления жилок турнепса; ORV – CY1 штамм кольцевой пятнистости орхидеи; PMMoV – японский штамм вируса слабой крапчатой мозаики перца; ToMV – S1 штамм вируса томатной мозаики; TMGMV – U2 штамм вируса зеленой мягкой мозаики табака; PaMV – японский штамм вируса мозаики перца.

** База данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

результаты справедливы и для штаммов MC-2, ВИРОГ-43М, так как их аминокислотная последовательность практически идентична MC-1.

Было установлено, что ближайшим к нашим штаммам оказался представитель ВЗКМО CGMMV-SH, поражающий дыню (98,5–99,2 % гомологии). С другими тобамовирусами гомология была значительно меньше: 40,9–75,9 %, в том числе с вирусами (CFMV, KGMV, ZMMV), поражающими огурец и другие растения семейства Cucurbitaceae, т. е. наши штаммы являются типичными представителями ВЗКМО.

По результатам филогенетического анализа всех белков тобамовирусов все представители данного семейства разделились на 2 большие

группы: первая – поражающая растения семейства тыквенные, а вторая – заражающие растения семейств астровые, орхидные, пасленовые и другие. Причем вирусы KGMV и CFMMV, паразитирующие, как и ВЗКМО, на огурце, выделились в отдельную от ВЗКМО подгруппу. SHMV, паразитирующий на кротолярии из семейства бобовых, попал в первую группу при филогенетическом анализе БО, но в случае других белков – во вторую группу. Гомология представителей первой группы со штаммами MC-1 варьировала от 63,4 до 99,2 % (не учитывая SHMV). Во вторую группу входили вирусы растений, не относящихся к семейству тыквенные; ее члены, вероятно, имеют

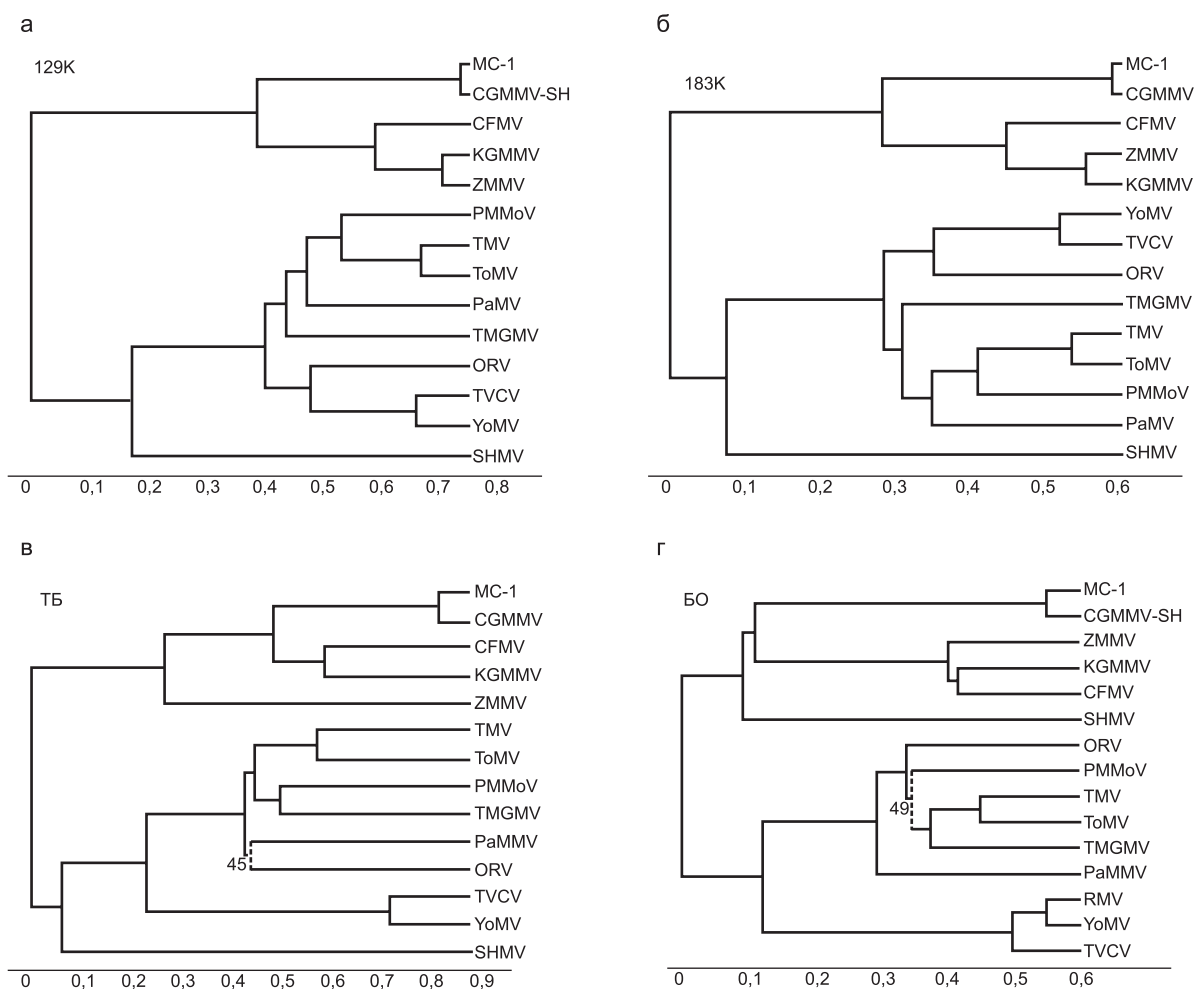


Рис. 3. Филогенетические деревья, составленные по результатам анализа аминокислотных последовательностей 129К, 186К, ТБ и БО белков MC-1 штамма и различных представителей тобамовирусов методом CLUSTAL W.

Цифры на дендрограммах показывают индексы статистической надежности узлов дерева. Обозначения штаммов приведены в примечаниях к табл. 3.

отличного от первой группы предка. Гомология ее представителей со штаммами МС-1 и ВИРОГ-43М была ниже 60 %.

В настоящее время в мире исследованы различные штаммы ВЗКМО, причем в базе данных GenBank есть сведения о БО у 15 штаммов ВЗКМО, о ТБ – у 10 штаммов и обо всем геноме – только у 5 штаммов. Поскольку БО является наиболее изученным, то представлялось интересным проанализировать степень дивергенции белков известных штаммов внутри группы ВЗКМО именно по этому белку. Для этого с помощью метода CLUSTAL W, матрица BLOSSUM 85, проводили сравнительный анализ аминокислотных последовательностей путем парного (табл. 4) и множественного выравнивания (рис. 4).

По белку оболочки гомология аминокислотных последовательностей внутри группы ВЗКМО была очень высокой, свыше 94,9 % (гомология определялась программой AliBee – <http://www.genebee.msu.su/services/malign-full.html>). Максимальные различия составляют две аминокислоты на 161. Полностью идентичным оказался аминокислотный состав белка

оболочки у наших огуречных и двух греческих штаммов GR-3, GR-5, выделенных из арбуза. Однако в нуклеотидных последовательностях этого гена у наших штаммов было найдено 13 замен относительно греческих штаммов, т. е. эти изоляты не являются идентичными.

Для наших и двух греческих штаммов GR-3, GR-5 характерна единственная аминокислотная замена – Asp-65 → Ser-65 относительно консенсусной аминокислотной последовательности белка оболочки ВЗКМО (см. рис. 4). Необходимо отметить, что такая же замена обнаружена у белка оболочки изолята № 3 ВЗКМО, вызывающего симптомы резкого пожелтения у огурца (Одинцова и др., 2000). При сравнении аминокислотных последовательностей белков оболочки МС-1 и ВИРОГ-43М с другими тобамовирусами было выяснено, что в этой позиции встречаются остатки аланина, глутаминовой кислоты, глицина.

Стоит отметить, что идентичными являются последовательности изолятов, расположенных географически относительно недалеко друг от друга. Так, 100%-я гомология по аминокислотной последовательности БО объединяет, с одной стороны, наши штаммы МС-1, ВИРОГ-43М и

Таблица 4

Сравнение аминокислотного состава белков оболочки МС-1 с другими штаммами ВЗКМО

Штамм ВЗКМО*	Регистрационный номер последовательности**	Страна	Растение-хозяин	Идентичные аминокислоты с МС-1 и ВИРОГ-43М, %
GR-3	AJ459421	Греция	арбуз	100
GR-5	AJ459422	Греция	арбуз	100
GX-G	DQ647384	Китай	огурец	99,4
№3	нет	Россия	огурец	99,4
BG	DQ767636	Индия	бутылочная тыква	99,4
КОМ	AF417243	Корея	восточная дыня	99,4
SH	D12505	Япония	сетчатая дыня	99,4
AL-1	AJ748352	Индия	лагенария	99,4
W	AB015146	Япония	арбуз	99,4
KW	AF417242	Корея	арбуз	99,4
NS	AJ243831	Корея	нет данных	99,4
ПАК	AB127937	Пакистан	лагенария	98,8
GR-7	AJ459423	Греция	арбуз	98,8
Y	AJ245440	Южная Корея	нет данных	98,1

* № 3 – штамм № 3 ВЗКМО-О [0]; BG – bottle gourd. ** База данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

два греческих штамма из арбуза (GR-3, GR-5) и, с другой стороны, также 100 %-я гомология объединяет большинство дальневосточных штаммов. Все дальневосточные изоляты имеют 100 %-е соответствие консенсусной последовательности. Они наиболее многочисленны и отличаются от европейских по одной аминокислоте. Аминокислотные замены, нетипичные для этих двух подгрупп, найдены у южнокорейского и пакистанского изолятов и у одного изолята из Греции. У греческого штамма GR-7 найдена замена Arg → Val в положении 13. Южно-корейский штамм CGMMV-Y имеет одну неконсервативную замену Ala-2 → Thr-2 и одну консервативную – Ala-124 → Val-124. У пакистанского штамма CGMMV-PAK есть аминокислотная замена в положении 108 (Ser-108 → Thr-108), которая является консервативной. Очевидно, каждая группа имеет своего предка.

Было также проведено множественное выравнивание по аминокислотному составу транспортного белка наших штаммов с известными представителями ВЗКМО. Оказалось, что наиболее близкими были также штаммы из Греции: CGR, WGR (99 % гомологии), выделенные из арбуза. Были определены мутации, характерные для наших изолятов: Gly-229 → Val-229, Leu-243 → Ser-243, Thr-264 → Ala-264. Причем мутации в положении 229 и 243

присутствуют и у греческих штаммов, т. е. на основании данных этого анализа можно также отнести наши штаммы к группе европейских ВЗКМО. Мутация в положении 264 является специфичной для нашего штамма.

Поскольку были определены первичные нуклеотидные последовательности и вакцинного, и патогенного штаммов, можно было установить характерные мутации и предположить, какие из них являются основными при аттенуации. Было выяснено, что все мутации, приводящие к заменам аминокислот, находятся в белке репликазы (рис. 5). Для патогенного штамма МС-1 по сравнению с вакцинным характерны 4 замены, одна из которых расположена в метилтрансферазном домене белка репликазы (Gly-86 → Ser-86), две – в неконсервативной области (НКО) между метилтрансферазным и геликазным доменами (Ser-534 → Phe-534; Pro-698 → Leu-698), а последняя (Pro-1362 → Leu-1362) – в полимеразном домене. При сравнении второго патогенного штамма МС-2 с вакцинным выяснилось, что присутствуют все те же замены, кроме Pro-698 → Leu-698.

В настоящее время среди группы тобамовирусов выявлено несколько вакцинных штаммов (Nishigushi *et al.*, 1985; Holt *et al.*, 1990; Lewandowski *et al.*, 1993; Hagiwara *et al.*, 2002). При сравнении первичной структуры геномов патогенных и апатогенных штаммов то-

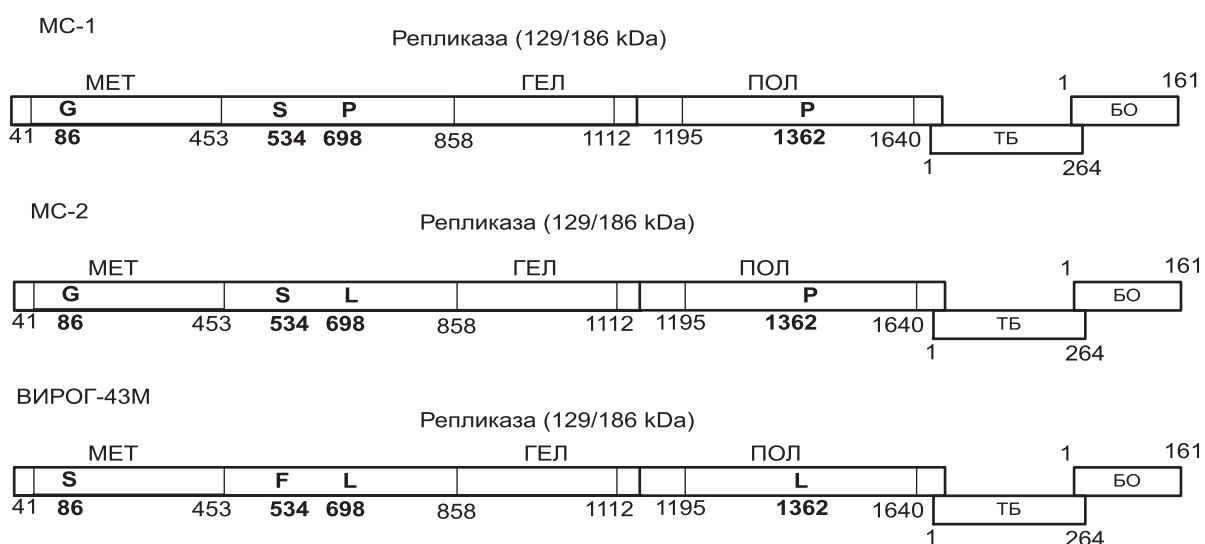


Рис. 5. Схема расположения аминокислотных замен в геноме патогенных штаммов МС-1, МС-2 по сравнению с вакцинным ВИРОГ-43М.

На рисунке указаны границы кодирующих областей и доменов. ТБ – транспортный белок, БО – белок оболочки; МЕТ – метилтрансферазный домен, ГЕЛ – геликазный, ПОЛ – полимеразный.

бамовирусов выявлена общая закономерность: аттенуацию обуславливают аминокислотные замены в белке репликазы. Хотя все они, в зависимости от изолята, находятся в разных положениях, но основной вклад вносят именно те замены, которые локализованы в НКО белка репликазы. Поэтому можно предположить, что за ослабление штамма ВИРОГ-43М отвечают также замены в НКО, причем критической в аттенуации является Ser-534 → Phe-534, а мутация Pro-698 → Leu-698 не важна, так как оба штамма обладают одинаковой степенью патогенности, но присутствует она только у штамма МС-1.

Было показано, что именно мутации в НКО обуславливают снижение супрессорной активности вируса по отношению к механизму интерференции РНК, отвечающей за устойчивость растений к РНК-содержащим вирусам, посттранскрипционному замолчанию генов и созреванию миРНК. Очевидно, что дальнейшее исследование данной области позволит получать вакцинные штаммы не только с помощью селекции, но и путем сайт-направленного мутагенеза, что даст возможность создавать улучшенные вакцины на основе любых представителей тобамовирусов.

Генетическая инженерия и индуцированный иммунитет. Н.И. Вавилов, отмечая в своей работе неидентичность приобретенного противовирусного иммунитета у растений и животных, не исключал возможности существования у них каких-либо общих элементов в процессах, приводящих к формированию индуцированного иммунитета (Вавилов, 1935). И в настоящее время, несмотря на установленные принципиальные различия систем иммунитета у растений и животных, исследователи пытаются использовать ряд генов – компонентов неспецифической иммунной системы животных для получения вирусоустойчивых растений. Довольно длительное время у растений велись поиски аналогов интерферон-индуцируемой системы защиты. Интерферон (белок семейства цитокинов высших позвоночных) индуцирует в клетке животных ряд антивирусных процессов. Основываясь на данных о способности интерферона человека подавлять репродукцию фитовирусов (тобамо-, потекс- и карлавирусов) на 70–90 % при экзогенной обработке

растений (Огарков и др., 1987), нами была предпринята попытка использовать собственно интерферон для создания генноинженерной вирусоустойчивости. Были созданы трансгенные растения табака с рекомбинантным геном α -интерферона человека (Смирнов и др., 1990, 1993), показавшие уменьшение числа и размера некрозов при заражении их вирусом табачной мозаики. Позднее и в других лабораториях также были получены растения табака, картофеля, клевера с генами α - и β -интерферонов (Крашенинникова и др., 1997; Леонова, 1997), с разной степенью повышения устойчивости. О полной вирусоустойчивости не сообщалось ни в одном случае, и механизм воздействия интерферона на патогенный процесс в растении остается пока неизвестным.

Поиск источников генов-индукторов универсальной устойчивости привел нас к идее использования генов, кодирующих неспецифическую для растений РНК с протяженным двуцепочечным участком. В 1980-х гг. прошлого века в поле научного интереса исследователей иммунитета растений попала двунитевая РНК. Было показано, что двунитевая РНК, в том числе и синтетическая (поли-1), может участвовать в формировании устойчивости растений к вирусам. Нам представлялось интересным исследовать влияние эндогенно синтезируемой в растении протяженной двунитевой РНК, не имеющей гомологии с геномом растения и геномом вируса, на устойчивость растений к вирусам. В качестве трансгенной кодирующей последовательности, экспрессирующей днРНК, был использован фрагмент гена устойчивости к тетрациклину бактериального происхождения. В лаборатории были получены трансгенные растения табака и пшеницы, экспрессирующие двунитевую РНК размером в 350 п.н., у трансгенного табака было выявлено повышение уровня устойчивости к ВТМ (Смирнов и др., 1993; Пухальский и др., 1996; Коростылева и др., 2004). Следует отметить, что в момент создания этих растений еще не было известно о ключевой роли двунитевой РНК в процессах РНК-интерференции (PTGS), одного из важнейших механизмов защиты растений от вирусной инфекции. Предполагается, что наблюдавшееся у данных растений повышение устойчивости, несмотря на отсутствие гомологии экспресси-

руемой днРНК с геномом вируса, может быть обусловлено частичной активацией факторов РНК-интерференции экспрессируемой РНК конститутивно, до контакта растения с вирусом.

Таким образом, проведенные и проводящиеся нами исследования естественного и индуцированного иммунитета полностью подтвердили правильность и перспективность исследований по проблеме генетики иммунитета, о которых с гениальным предвидением писал Н.И. Вавилов.

Литература

- Бадаева Е.Д., Прокофьева З.Д., Билинская Е.Н. и др. Цитогенетический анализ устойчивости к бурой ржавчине и мучнистой росе гибридов, полученных от скрещивания мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L., AABBGG) с пшеницами группы *Timopheevi* (A'A'GG) // Генетика. 2000. Т. 36. № 12. С. 1663–1673.
- Вавилов Н.И. Очерк современного состояния учения об иммунитете хлебных злаков к грибным заболеваниям // Тр. селекц. станции при МСХИ. 1913. Вып. 1. С. 113–158.
- Вавилов Н.И. Иммуитет растений к инфекционным заболеваниям // Изв. Петровской с.-х. академии. 1918. Вып. 1/4. 240 с.
- Вавилов Н.И. Учение об иммунитете растений к инфекционным заболеваниям // Теоретические основы селекции: В 3 т. / Под ред. Н.И. Вавилова. М.; Л.: ГИЗ с.-х. совх. и колх. лит.-ры, 1935. Т. 1. Общая селекция растений. С. 893–990.
- Вавилов Н.И. Иммуитет растений к вирусным заболеваниям // Тр. Всесоюз. совещания по изучению ультрамикробов и фильтрующихся вирусов (14–18 декабря 1935 г.). М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1937. С. 139–156.
- Ван дер Планк Я.Е. Болезни растений. М.: Колос, 1966. 353 с.
- Дьяков Ю.Т. Типы устойчивости растений и их практическое использование // Типы устойчивости к болезням (Матер. науч. семинара). СПб., 2003. С. 5–9.
- Извекова Л.И., Андреева Э.Н., Вострова Н.Г. и др. Штаммы вирусов для вакцинации растений // Фундаментальные науки – народному хозяйству. М.: Наука, 1990. С. 288–290.
- Коростылева Т.В., Одинцова Т.И., Козловская Г.В., Пухальский В.А. Исследование белков листьев трансгенных растений табака, экспрессирующих двунигетивную РНК, при вирусной инфекции // Генетика. 2004. Т. 40. № 4. С. 531–537.
- Крашенинникова Л.В., Бабоша А.В., Хромова Л.М., Мусин С.М. Исследование вирусостойкости трансгенных растений картофеля *in vitro*, несущих ген человеческого интерферона или последовательность, кодирующую двунигетивную РНК // Тез. докл. VII междунар. конф. «Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда». Москва, 1997. С. 274–275.
- Леонова Н.С. Изучение резистентности к вирусной инфекции растений картофеля, несущих ген бета-интерферона человека // Тез. докл. VII междунар. конф. «Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда». Москва, 1997. С. 278–279.
- Огарков В.И., Атабеков И.Г., Каплан И.Б. и др. Влияние интерферона человека на репродукцию фито- и микровирусов // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1987. № 3. С. 341–345.
- Одинцова Т.И., Андреева Э.Н., Пухальский В.А. и др. Структурный анализ белка оболочки вируса зеленой крапчатой мозаики огурца // Биохимия. 2000. Т. 65 (5). С. 672–679.
- Одинцова Т.И., Туришева М.П., Андреева Э.Н., Пухальский В.А. Структурно-функциональные изменения в хлоропластах томатов с разными генами устойчивости к вирусу табачной мозаики при заражении вирусом // Генетика. 1996. Т. 32. № 11. С. 1545–1552.
- Пухальский В.А., Смирнов С.П., Коростылева Т.В. и др. Генетическая трансформация *Triticum aestivum* L. с использованием *Agrobacterium tumefaciens* // Генетика. 1996. Т. 32. № 11. С. 1696–1500.
- Смирнов С.П., Крашенинникова Л.В., Пухальский В.А. Эффект синтеза молекул двунигетивной РНК в трансгенных растениях табака на устойчивость к вирусу табачной мозаики // Докл. РАН. 1993. Т. 331. № 2. С. 241–245.
- Смирнов С.П., Теверовская Э.Х., Крашенинникова Л.В., Пухальский В.А. Создание экспрессионного интегративного вектора и его использование для введения в растения гена рекомбинантного альфа-интерферона человека // Генетика. 1990. Т. 26. № 12. С. 2111–2121.
- Снегирева П.Б., Истомина Е.А., Шиян А.Н. Единственная реверсия в гене белков репликазы аттенуированного томатного штамма V-69 вируса табачной мозаики вызывает усиление патогенности вируса // Генетика. 2005. Т. 41. № 1. С. 40–47.
- Сухов К.С., Подъяпольская Т.С., Извекова Л.И. Иммунизация растений против патогенного действия вирусов. М.: Наука, 1979.
- Сухов К.С., Подъяпольская Т.С., Извекова Л.И. и др. Вакцинный штамм вируса табачной мозаики V-69: получение, свойства и практическое применение // Докл. АН СССР. 1982. № 1. С. 113–125.
- Hagiwara K., Ichiki T.U., Ogawa Y. *et al.* A single

- amino acid substitution in 126kDa protein of Pepper mild mottle mosaic virus associates with symptom attenuation in pepper; the complete nucleotide sequence of an attenuated strain, C1421 // Arch. Virol. 2002. V. 147. № 4. P. 833–840.
- Holt C.A., Hodgson R.A., Coker F.A. *et al.* Characterization of the masked strain of tobacco mosaic virus: identification of the region responsible for symptom attenuation by analysis of an infectious cDNA clone // Mol. Plant Microbe Interact. 1990. V. 3(6). P. 417–23.
- Lewandowski D.J., Dawson W.O. A single amino acid in tobacco mosaic virus replicase prevents symptom production // Mol. Plant Microbe Interact. 1993. V. 6. P. 157–160.
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat rusts: An atlas of Resistance Genes. CSIRO. Australia. 1995. 200 p.
- McIntosh R.A., Devos K.M., Dubcovsky J.V. *et al.* Catalogue of gene symbols for wheat: 2007 Supplement // Annu. Wheat Newslet. 2007. V. 53. P. 159–180.
- Motoyoshi F., Oshima N. Expression of genetically controlled resistance to tobacco mosaic virus infection in isolated tomato leaf mesophyll protoplasts // J. Gen. Virol. 1977. V. 34. P. 499–506.
- Nishigushi M., Kikuchi S., Kiho Y. *et al.* Molecular basis of plant viral virulence; the complete nucleotide sequence of an attenuated strain of tobacco mosaic virus // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13 (5). P. 5585–5590.
- Watanabe Y., Kishibayashi N., Motoyoshi F., Okada Y. Characterization of Tml gene action on replication of common isolates and a resistance-breaking isolate of TMV // Virology. 1987. V. 161. P. 527–532.

THE PROBLEMS OF NATURAL AND INDUCED IMMUNITY IN PLANTS

**V.A. Pukhalskij, T.I. Odintsova, L.I. Izvekova, E.N. Andreeva, T.I. Korostyleva,
E.A. Istomina, A.A. Slavokhotova, A.N. Shiyan, G.V. Kozlovskaya, L.A. Obolenkova,
E.D. Badaeva, E.N. Bilinskaya**

Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, e-mail: pukhalsk@vigg.ru

Summary

The review focuses on the results of our studies on natural and induced immunity in plants. In tomato plants carrying the *Tm* genes, specific proteins induced upon TMV infection were identified, which may be used as resistance markers during breeding. The presence of the tolerance and resistance genes in tomato plants positively affects the transcription of chloroplast genes during viral infection. The data on chromosome substitutions during incongruent hybridization in wheat resulting in the production of plants resistant to brown rust and powdery mildew are presented. By RAPD analysis a polymorphic DNA fragment associated with brown rust resistance, was revealed and used for the synthesis of the SCAR-primer. The data on amino acid sequences of 13 novel defensins from *T. kiharae* seeds and their antimicrobial properties are presented. The induced immunity in plants was studied by analyzing plant response to immunization with antiviral vaccines developed in the laboratory: TMV V-69 and VIROG-43 (CGMMV strain). Molecular-genetic characterization of these vaccines was performed. The research on the use of genetic engineering for the enhancement of antiviral immunity in plants is also described.