

УДК 631.523.11:635.342

**НАСЛЕДОВАНИЕ ГЕНА RS-AP И УСТОЙЧИВОСТЬ
К ЗАБОЛЕВАНИЯМ У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ
БЕЛОКОЧАННОЙ КАПУСТЫ**

П. В. ПОПАДЫН, В. Г. ЛУНИН, Г. Ф. МОНАХОС

(Селекционная станция им. Н. Н. Тимофеева)

У трансгенных растений белокочанной капусты инбредной самонесовместимой родительской линии Б 25 проанализированы наследование и экспрессия гена дефензина редьки *rs-ap* в поколениях T_0 и T_1 . Проведена оценка устойчивости трансгенных растений к настоящей мучнистой росе, альтернариозу и киле крестоцветных. Выявлено посттранскрипционное «замолкание» трансгена, зависящее от его «дозы». Установлена устойчивость трансгенных растений поколения T_1 к киле крестоцветных.

Белокочанная капуста является наиболее широко распространенной овощной культурой в Российской Федерации. В настоящее время ее выращивают на площади 161,7 тыс. га, или 21,6% всех площадей, занятых овощами [1]. Однако многочисленные заболевания, которым подвержена эта культура, приводят к потерям значитель-

ной части урожая и сильно снижают качество продукции. Ситуация осложняется отсутствием разрешенных для применения на продовольственной капусте химических средств защиты. Это ставит на первое место в борьбе с болезнями выведение устойчивых сортов. Тем не менее, редкая встречаемость доноров устойчивости

Работа поддержана грантом РФФИ № 00-04-49089.

Сокращения: ПЦР — полимерная цепная реакция, ПААГ — полиакриламидный гель, ДСН — додецилсульфат натрия, п. о. — пары оснований.

среди видов, скрещивающихся с белокочанной капустой, делает эту задачу трудновыполнимой при помощи традиционных методов селекции — гибридизации, бекроссов и отбора.

Ускорить решение данной проблемы можно при помощи генной инженерии. На данном этапе развития методы генной инженерии позволяют манипулировать нуклеиновыми кислотами, искусственно создавать рекомбинантные молекулы ДНК с любыми заданными последовательностями — генами и необходимыми для их функционирования управляющими элементами — и вводить их в геном любого организма.

Среди генов иммунного ответа растений особое внимание привлекли к себе гены дефензинов, кодирующие короткие цистеинсодержащие пептиды широкого фунгицидного и бактерицидного действия [11]. Дефензины выделены из представителей различных семейств, имеют однотипную организацию и играют протекторную роль, накапливаясь преимущественно в периферийных слоях клеток практически всех органов растения. Показано, что механизм антимикробного действия дефензинов основан на связывании их

с определенными рецепторами на поверхности клеточных мембран микроорганизмов, в результате чего происходят нарушение целостности клеток патогенов и их гибель [22]. Ни один из изученных дефензинов не оказывает токсического действия на культивируемые клетки млекопитающих и человека [11]. В работе Terras и др. [20] были получены трансгенные растения табака (*Nicotian a tabacum*), экспрессирующие дефензин RS-AFP2 из семян редьки (*Raphanus sativus*) на уровне около 12 мкг в 1 г свежей растительной ткани. При заражении возбудителем альтернариоза (*Alternaria longipes*) площадь некрозов у трансгенных растений была в 7 раз меньше, чем в контроле. Впечатляющим оказался успех специалистов фирмы Монсанта (Monsanto Com.), которые получили трансгенный картофель, экспрессирующий дефензин alfAFP из семян люцерны (*Medicago sativa*). Трансгенные растения значительно меньше поражались вертициллезом (*Verticillium dahliae*) по сравнению с контрольными, обработанными фунгицидами [15].

Целью нашей работы являлось изучение наследования и экспрессии гена дефензина редьки rs-ap, а также

оценка устойчивости полученных нами ранее [9] трансгенных растений белокочанной капусты (*Brassica oleracea* var. *capitata*) к возбудителям настоящей мучнистой росы (*Erysiphe communis* f. *brassicae*), альтернариоза (*Alternaria brassicae*) и килы крестоцветных (*Plasmodiophora brassicae*).

Материалы и методика

Растительный материал.

В работе исследовали трансгенные растения поколения T₀ инбредной самонесовместимой родительской линии Б 25 и их семенное потомство. Исходная родительская линия обладает высокой комбинационной способностью по комплексу хозяйственно ценных признаков, однако она неустойчива в отношении большинства заболеваний. Для устранения данного недостатка путем агробактериальной трансформации вектором pK22gs [8] в нее был интродуцирован ген дефензина редьки *gs-ar* под контролем 35S-промотора гена VI вируса мозаики цветной капусты.

Штаммы фитопатогенов.

Изолят *A. brassicae* был получен на кафедре фитопатологии МСХА им. К. А. Тимирязева. Культура поддерживалась на твердой картофельной среде, содержащей 20 г/л агар и приготовлен-

ной по стандартной методике [7]. Для оценки устойчивости трансгенных растений к настоящей мучнистой росе использовали инфекцию со спонтанно заболевших растений белокочанной капусты. Для оценки устойчивости к киле применяли естественную физиологическую расу килы 16/11/31 (по ЕСД-коду) с инфекционного участка Селекционной станции им. Н. Н. Тимофеева [10].

Анализ наличия гена *gs-ar* в геноме растений с помощью ПЦР. Выделение растительной ДНК производили по методу, предложенному Дороховым и Клоке [3]. Об отсутствии ингибиторов Taq-полимеразы в препаратах кДНК судили по наличию продукта размером около 300 п. о. при проведении полимеразной цепной реакции с использованием праймеров к консервативному участку гена 18S рибосомальной РНК: 18Sf (5-AGCCATGCATGTGTAAGTATGAACG-3) и 18Sr (5-GCCCGGTATTGTTATTTATTGTCACT-3). Смесь была прогрета 3 мин при +94 °С, после чего проводили 25 циклов амплификации: 15 с, +94°С; 30 с, +54°С; 1 мин, +72°С.

Амплификацию трансгена проводили с использованием праймеров Dolg 3 (5-CTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCC-3) и Celo 6 (5-

САAGTGTATCTGTTATTTCC-
СТTGTТААСТСТАGAGCA-
3) к 358-промотору и гену *rs*-
ар. Смесь прогревали 3 мин
при +94°C, после чего про-
водили 30 циклов амплифи-
кации: 15 с, +94°C; 30 с,
+52°C; 1 мин, +72°C.

**Анализ экспрессии транс-
гена реверсной ПЦР.** Выде-
ление РНК производили с
использованием набора реак-
тивов «РИБО-золь-микро»
(АмплиСенс, Центральный
НИИ эпидимиологии МЗ РФ)
по методике изготовителя.
Препараты кДНК получали с
помощью M-MLV ревертазы
(лаборатория генной инже-
нерии животных ВНИИСБ)
стандартным методом [14].
Для определения отсутствия
ингибиторов Taq-полимеразы
проводили предварительную
реакцию с праймерами к гену
18S рибосомальной РНК, как
описано выше. Для опреде-
ления наличия транскрипции
введенного целевого гена
производили амплификацию
кДНК с использованием
праймеров pk22rsf (5-GAG-
СТCGGTACCCCGAATT-3)
и Celso 6 к гену *rs*-ар. Реак-
ционную смесь прогревали
3 мин при +94°C и проводи-
ли 30 циклов амплификации:
15 с, +94°C; 1 мин, +66°C;
1 мин, +72°C.

**Иммунологический ана-
лиз экспрессии трансгена
(Вестерн-блоттинг).** Белко-
вые экстракты из растений

получали по методике Врое-
саерт и др. [11]. Концентрацию
белка измеряли по Бредфор-
ду [4]. Фракционирование бел-
ков осуществляли электрофо-
резом в ПААГ в трис-трици-
новой системе с присутствием
ДСН [21]. Для проведения ана-
лиза применяли методику
Towbin и др. [23]. В анализе
использовали антитела, полу-
ченные к рекомбинантному
слитому RS-тиоредоксин бел-
ку. Вторые антитела были ко-
ньюгированы с пероксидазой
хрена. Хемилюминесценцию
индуцировали и фиксировали
с помощью набора реактивов
ECL (Amersham Pharmacia
Biotech).

**Оценка устойчивости
трансгенных растений поко-
ления T₀ к настоящей муч-
нистой росе.** Трансгенные
растения яровизировали в
фазе 10 настоящих листьев в
зимней теплице. После про-
хождения периода яровизации
к верхней стороне листьев за-
ражаемых растений прикла-
дывали листья с больных ра-
стений, обладающих ясно
выраженными симптомами
заболевания (обильный белый
мучнистый налет), и слегка
потирали их друг об друга.
Таким образом, одним боль-
ным листом заражали 5 ниж-
них листьев трансгенного ра-
стения. Степень поражения
оценивали визуально в фазе
созревания семян по унифи-
цированной шкале ВИР [6].

Оценка устойчивости трансгенных растений поколения T₀ к альтернариозу.

Из листьев яровизированных растений капусты с помощью пробкового сверла вырезали диски диаметром 15 мм. Центр диска повреждали прикосновением раскаленной препарировальной иглы [2]. Диски (по 10 шт.) раскладывали в стеклянные чашки Петри диаметром 90 мм на фильтровальную бумагу, увлажненную раствором кинетина в концентрации 10 мг/л [7]. На место повреждения в центре диска наносили 2 мкл суспензии конидий *A. brassicola* с концентрацией 10⁶ спор/мл (подсчитывались микроскопированием в камере Горяева). Чашки закрывали полимерной пищевой пленкой и выдерживали в климатической камере при температуре +25°C и 16-часовом световом дне. Поражение учитывали на 7-е сутки путем измерения диаметра некротических зон.

Оценка устойчивости к киле семенного потомства трансгенных растений поколения T₀. Семена, полученные путем принудительного гейтеногамного самоопыления трансгенных растений поколения T₀, в середине июля высевали в кассеты со стороной ячейки 4 см на глубину 0,5 см. При посеве производили заражение внесе-

нием под каждое семя 2 мл суспензии спор килы с концентрацией 10⁷ спор/мл [25]. В фазе одного-двух настоящих листьев производили повторное заражение рассады суспензией спор той же концентрации [17] и высаживали растения на инфекционный фон килы. Поражаемость учитывали через 6 нед после высадки рассады на инфекционный фон [5] визуальной оценкой корневой системы по 4-балльной шкале, предложенной Buckzacki и ДР-[12].

Данные, полученные в экспериментах, обрабатывали методом дисперсионного анализа однофакторного вегетационного опыта, а также оценивали по критерию %².

Результаты

Анализ растений поколения T, на наличие трансгена rs-ap. Тринадцать независимых канамицинустойчивых регенерантов, полученных нами ранее [9], были размножены клонированием *in vitro* и проанализированы на наличие трансгена с помощью ПЦР. При амплификации с праймерами к 358-промотору и гену rs-ap у клонов всех независимых регенерантов был получен продукт реакции длиной около 600 п. о., соответствующий положительному контролю (плазмида pK22rs). В от-

рицательном контроле (ДНК [^]трансформированного растения) специфических ампликонов не было получено.

Анализ растений поколения T₀ на содержание транскриптов трансгена rs-ар. Трансгенные растения были подвергнуты анализу методом реверсной ПЦР. При проведении реакции с праймерами к гену rs-ар у растений 9 независимых трансгенных линий (№ 1-7, 9 и 12) были получены фрагменты размером около 270 п. о., соответствующие его транскрипту. Очевидно, что у 4 оставшихся линий (№ 8, 10, 11 и 13) транскрипты трансгена не накапливались. В отрицательном контроле (ДНК нетрансформированного растения) характерный продукт реакции отсутствовал. У плазмиды pK22rs был амплифицирован фрагмент длиной около 360 п. о., являющийся геном rs-ар с входящим в его состав интроном.

Анализ растений поколения T₀ на содержание пептида RS-AP. Растения независимых трансгенных линий, у которых было установлено наличие транскрипции трансгена, были проанализированы на содержание дефензина RS-AP. Положительный сигнал был получен только у позитивного контроля, которым являлся белковый экстракт из семян редьки.

Оценка устойчивости трансгенных растений поколения T₀ к настоящей мучнистой росе. Эксперимент состоял из двух наблюдений по одному растению каждой трансгенной линии. В результате опыта не удалось выявить отличия по устойчивости к данному заболеванию трансгенных растений по сравнению с контролем, которым служили нетрансгенные растения инбредной линии Б 25. Все без исключения растения имели высокую (4 балла) степень поражения.

Оценка устойчивости трансгенных растений поколения T₀ к альтернариозу. Эксперимент состоял из трех наблюдений по 10 листовым дискам в каждом. Методом дисперсионного анализа установлено, что существенных различий по устойчивости к альтернариозу между трансгенными растениями и контролем, в качестве которого использовали нетрансгенные растения линии Б 25, не было ($F_{\phi} = 1,3 < F_{05} = 2,2$).

Оценка устойчивости потомства трансгенных растений поколения T_n к киле крестоцветных. Из семян зацветших трансгенных растений было получено потомство, которое оценивали на устойчивость к киле. Всего было высеяно по 50 семян трансгенных линий, № 1, 3-5 и 7-10. Морфоло-

гические отличия от нетрансгенных растений линии Б 25, как и у поколения T_0 , отсутствовали. К сожалению, из-за высокой температуры в теплице всходы оказались сильно изреженными и на инфекционный фон удалось высадить небольшую часть растений. По устойчивости к болезни потомство расщепилось на: а) растения с сильным поражением главного и боковых корней (3 балла); б) со слабым поражением боковых корней (2 балла); в) с отсутствием симптомов поражения (0 баллов). Результаты эксперимента приведены в табл. 1.

Изучение наследования гена *gs-ar* в семенном потомстве трансгенных растений поколения T_n . С целью установления связи с наблюдаемой устойчивостью к киле был проведен анализ семен-

ного потомства трансгенной линии № 1 методом ПЦР. При проведении реакции с праймерами к 358-промотору и гену *gs-ar* у 25 из 27 растений были получены фрагменты длиной около 600 п. о., соответствующие положительному контролю (плазмида рK22rs). В отрицательном контроле (ДНК нетрансформированного растения) специфического продукта реакции получено не было. Таким образом, по наличию трансгена потомство линии № 1 расщепилось в отношении 25 трансгенных : 2 нетрансгенных.

Анализ на содержание транскриптов гена *gs-ar* в семенном потомстве растений поколения T_0 . Для установления наличия экспрессии трансгена методом реверсной ПЦР был проведен анализ семенного потомства транс-

Т а б л и ц а 1

Устойчивость трансгенных растений поколения T_n к киле крестоцветных

Трансгенная линия, №	Кол-во высаженных растений, шт.	Балл поражения			
		0	1	2	3
1	27	5	1	—	21
3	22	1	1	—	20
4	8	—	1	—	7
5	2	1	—	—	1
7	22	1	—	—	21
8	3	2	—	—	1
9	17	2	—	—	16
10	13	1	—	—	12
Контроль	15	—	—	—	15

генной линии № 1. У всех растений, давших положительный сигнал по наличию гена *gs-ar* в геноме, были получены ампликоны размером около 270 п. н., являющиеся его транскриптами. У плазмиды *rK22rs* получен ампликон длиной около 360 п. н., соответствующий гену *gs-ar* с интроном. В отрицательном контроле (ДНК не-трансформированного растения) характерного продукта реакции получено не было.

Обсуждение результатов

В практике генноинженерных работ довольно часто встречается явление «замолкания» трансгена, выражающееся в прекращении его экспрессии по мере развития растения или в его семенном потомстве. Притом инактивация генного продукта может происходить как на уровне транскрипции, так и на более поздних этапах передачи информации от РНК белку [18]. В данной работе мы, вероятно, столкнулись как раз с этим феноменом.

Так, все независимые канимицин-устойчивые регенеранты содержали в своем геноме трансген *gs-ar*, однако его транскрипцию удалось детектировать не во всех трансформантах. Например, в растениях независимых трансгенных линий № 1-7,

9 и 12 процесс транскрипции трансгена происходит, в то время как в № 8, 10, 11 и 13 — нет. Это, возможно, связано с «эффектом положения», либо с встраиванием его в растительную ДНК в виде инвертированных повторов, так как известно, что такой тип инсерции особенно способствует «замолчанию» на уровне транскрипции [19].

Наличие продукта гена *gs-ar* в транскрибирующих его растениях детектировать не удалось. Отсутствовали также отличия трансгенных растений по сравнению с контрольными по устойчивости к настоящей мучнистой росе и альтернариозу, хотя известно, что дефензины крестоцветных подавляют возбудителей данных заболеваний в низких (< 2 мкг/мл) концентрациях [11, 24]. Вероятной причиной отрицательных результатов является недостаточный уровень накопления пептида RS-AP. Метод Вестерн-блоттинга позволяет детектировать до 50 нг антигена [4], что в нашем случае соответствует содержанию дефензина около 13 мкг в 1 г свежей растительной ткани, и, следовательно, при меньших уровнях его накопления анализ дает отрицательный результат. С другой стороны, нельзя исключить и отсутствие, либо слабую

его активность в отношении возбудителей рассматриваемых болезней, так как известно, что дефензины даже одного вида могут подавлять развитие различных патогенов. Например, дефензин из семян редьки RS-AFP1 активен в отношении 4 фитопатогенных грибов, в то время как RS-AFP2 — в отношении 11 [11].

По наличию трансгена семенное потомство независимой трансгенной линии № 1 расщепилось как 25:2 (трансгенные : нетрансгенные). Для интерпретации полученного результата была использована двухлокусная элементарная генетическая модель, предусматривающая расщепление 15:1. Оценка соответствия между наблюдаемыми и ожидаемыми распределениями по критерию χ^2 ука-

зывает на то, что она верна (табл. 2).

Анализ транскрипции гена *rs-ar* в семенном потомстве линии № 1 показал, что она происходит во всех трансгенных растениях. Таким образом, наличие двух копий трансгена не вызывало его транскрипционного «замолкания».

В [16] сообщалось, что трансгенные растения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*), экспрессирующие вискотоксин-антимикробный пептид омелы белой (*Viscum album*), относящийся к классу тионинов, обладали повышенной устойчивостью к киле крестоцветных. Так как дефензины являются классом белков, родственных тионинам, мы предположили, что трансгенные растения белокочанной капусты, экс-

Т а б л и ц а 2

Вычисление теоретических частот и критерия соответствия (χ^2) для расщепления семенного потомства линии № 1 по наличию трансгена *rs-ar*

Показатель	Растения		Сумма
	ПЦР+	ПЦР-	
Ожидаемое расщепление (H_0)	15	1	16
Наблюдаемые частоты (f)	25	2	27
Ожидаемые частоты (F)	25,313	1,688	27
Разность (f-F)	-0,312	0,312	—
Квадрат разности (f-F) ²	0,097	0,097	—
Отношение (f-F) ² /F	0,004	0,057	0,061 = χ^2
Вывод	$\chi^2_{ф} = 0,06 < \chi^2_{05} = 3,84$; H_0 не отвергается		

прессурующие дефензин RS-AP, также могут оказаться устойчивыми к этому заболеванию. Выщепление в семенном потомстве устойчивых экземпляров подтвердило наше предположение (см. табл. 1).

Учитывая данные, полученные из анализа расщепления семенного поколения трансгенной линии № 1 по наличию трансгена, его транскрипции, а также по устойчивости к киле, можно предположить, что с наибольшей интенсивностью дефензин RS-AP экспрессируется при содержании в геноме растения кодирующего его гена в гемизиготном состоянии в одном локусе встраивания. В данном случае, при условии инсерции в разные хромосомы наличие одного локуса встраивания трансгена приведет к расщеплению семенного потомства по устойчивости к киле в соотношении 1:1 (устойчивые : восприимчивые), при двух — 1:3, трех — 3:29. Анализ этой гипотезы по критерию соответствия χ^2 , проведенный в отношении трансгенных линий № 1, 3 и 7, указывает на ее справедливость (табл. 3).

Кроме того, подобный эффект «дозы» трансгена описан в литературе. Так, в трансгенных растениях арабидопсиса, содержащих одну

копию гена фрагмента Fab-антитела в гомозиготном состоянии, наблюдали его метилирование. Наличие продукта гена в них не детектировалось. В противоположность этому в линиях, содержащих одну копию трансгена в гемизиготном состоянии, он был деметилирован и накапливались высокие уровни кодируемого им продукта. Кроме того, в линиях, содержащих в гемизиготном состоянии две копии трансгена, полученных от скрещивания гомозиготных линий, содержащих трансген в неаллельных позициях, снова наблюдалось его посттранскрипционное «замолкание» [13]. Можно предположить, что в данном случае мы сталкиваемся с защитной реакцией растения в ответ на внедрение чужеродной генетической информации, которая, вероятно, связана с использованием в конструкции вирусным промотором.

Таким образом, полученные в данной работе результаты указывают на неэффективность использования вектора pK22rs для создания устойчивых к болезням сортов белокочанной капусты, так как эффект «дозы» трансгена существенно осложняет селекционный процесс. Тем не менее, наблюдаемая устойчивость к киле у части трансгенных растений свиде-

Таблица 3
Вычисление теоретических частот и критерия соответствия (χ^2) для распределения семенного потомства трансгенных линий № 1, 3 и 7 по устойчивости к киле

Показатель	Трансгенная линия									
	№ 1			№ 3			№ 7			
	Растения		Сумма	Растения		Сумма	Растения		Сумма	
	уст.	неуст.		уст.	неуст.		уст.	неуст.	уст.	неуст.
Ожидаемое расщепление (H_0)	1	3	4	3	3	29	32	3	29	32
Наблюдаемые частоты (f)	6	21	27	2	2	20	22	1	21	22
Ожидаемые частоты (F)	6,7500	20,2500	27	2,0625	19,9375	22	2,0625	19,9375	22	22
Разность (f-F)	-0,7500	0,7500	—	-0,0625	0,0625	—	-1,0625	1,0625	—	—
Квадрат разности (f-F) ²	0,5625	0,5625	—	0,0039	0,0039	—	1,1289	1,1289	—	—
Отношение (f-F) ² /F	0,0833	0,0288	0,1121	0,0019	0,0002	0,0021	0,5473	0,0566	0,6039	0,6039
Вывод	$\chi^2_{\Phi} = 0,112 < \chi^2_{0,05} = 3,840$ H_0 не отвергается			$\chi^2_{\Phi} = 0,002 < \chi^2_{0,05} = 3,840$ H_0 не отвергается			$\chi^2_{\Phi} = 0,604 < \chi^2_{0,05} = 3,840$ H_0 не отвергается			

тельствует о перспективности генетической трансформации геном *rs-ар* для этой цели. Однако, вероятно, он должен находиться под контролем другого промотора.

Выводы

1. При агробактериальной трансформации трансген часто встраивается в геном растения в количестве нескольких копий.

2. Транскрипция трансгена происходит не во всех растениях поколения T_0 .

3. При гомозиготном состоянии трансгена или при наличии нескольких копий наблюдается его посттранскрипционное «замолкание».

4. Трансформация белокочанной капусты вектором *pK22rs* неэффективна для получения устойчивых к болезням генотипов.

5. Использование гена деффензина *RS-AP* в сочетании с другими промоторами перспективно для создания устойчивых к киле сортов капусты.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абрамов В. К* овощному сезону 1999 г. — Семена, 1999, № 1, с. 26. — 2. *Джалилов Ф. С., Монахос Г. Ф., Семенов П. А.* Оценка устойчивости гибридов капусты к болезням при хранении. —

Изв. ТСХА, 1999, вып. 2, с. 107-113. — 3. *Дорохов Д. Б., Клоке Э.* Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов. — Молекулярная генетика, 1997, т. 33, № 4, с. 443-450. — 4. *Дрейнер Дж., Скотт Р. и др.* Генная инженерия растений. / Пер. под ред. А. М. Колчинского. М.: Мир, 1991. — 5. *Квасников Б. В.* Методика оценки сортов капусты на устойчивость к киле. М.: ВАСХНИЛ, 1970. — 6. Методические указания по селекции капусты. / Под ред. Ю. Бобровой. М.: ВАСХНИЛ, 1989. — 7. Методы экспериментальной микологии. / Под ред. В. И. Билай. Киев. Наукова думка, 1982. 8. *Народицкий Б. С., Лунин В. Г. и др.* Ген *rs-ар* из *Raphanus sativus*, вектор для трансформации растений и способ получения трансгенного растения. RU 2176669 C1, 2000. — 9. *Понадъин П. В., Лаврова Н. В. и др.* Зависимость эффективности генетической трансформации белокочанной капусты (*Brassica oleracea var. capitata*) от используемого штамма *Agrobacterium ssp.* — Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология. Тез. докл. Междунар. симп. М.: Полиграф-Сервис, 2001, с. 270-271. — 10. *Ушанов А. А.* Наследование основных хозяйственных признаков и

- комбинационная способность самонесовместимых линий кормовой капусты. Канд. дис. М., МСХА, 2001. — **11.** Broecaert W. F., Cammue B. P. et al. W O 93/05153, 1993. — **12.** Buczacki S. T., Toxopeus H. et al. — Trans. Br. mycol. Soc., 1975, vol. 65, p. 295-303. — **13.** De Wilde C., Podevin N. et al. — Mol. Genet. Genomics, 2001, vol. 265, № 4, p. 647-653. — **14.** Efstradias A., Kafatos F. C. et al. - Cell, 1976, vol. 7, p. 279. — **15.** Gao A.-G., Hakimi S. M. et al. — Nature biotechnology, 2000, vol. 18, p. 1307—1370. — **16.** Holtorf S., Ludwig-Muller J. et al. — Plant Mol. Biol., 1998. — V. 36. № 5. P. 673-680. — **17.** Mattusch P. — Gemuse, 1994, vol. 6, p. 357-359. — **18.** Sijen T., Vijn I. et al. — Curr. Biol., 2001, vol. 11, № 6, p. 436-440. — **19.** Stam M., De Bruin R. et al. — Plant J., 1997, vol. 12, p. 63-82. — **20.** Terras F. R. G., Eggermont K. et al. — Plant Cell, 1995, vol. 7, p. 573-588. — **21.** Shagger H. and von Jagow G. — Anal. Biochem., 1987, vol. 166, p. 368-375. — **22.** Thevissen K., Osborn R. W. et al. — Mol. Plant. Microbe Interact., 2000, vol. 13, № 1, p. 54-61. — **23.** Towbin H., Staehelin T., Gordon J. — Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1979, vol. 76, p. 435018. — **24.** Vogel J., Somerville S. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, № 4, p. 1897-1902. — **25.** Voorrips R. E. and Visser D. L. — Neth. J. PI. Pathol., 1993, vol. 99, p. 269-276.

Статья поступила
29 декабря 2001 г.

SUMMARY

Inheritance and expression of defensine gene in radish rs-ap in T₀ and T₁ generations were analyzed in transgenic cabbage plants of self-noncompatible parent line B-25. Resistance of transgenic plants to true mildew, alternaria blight and clubroot of cracifers was estimated. Posttranscriptive «falling silent» of transgene depending on its «dose» was revealed. Resistance of transgenic plants of TV generation to clubroot of cracifers has been fixed.