

УДК 581.1

Экспрессия гена антимикробного пептида бомбинина повышает устойчивость трансгенных растений табака к фитопатогенам

© 2017 г. Н.С. ЗАХАРЧЕНКО*, С.В. ПИГОЛЕВА, О.В. ФУРС, Т.В. ШЕВЧУК, О.В. ДЬЯЧЕНКО, Я.И. БУРЬЯНОВ

ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Пушчинский филиал, Пушино, Московская обл., 142290

e-mail: znata_2004@rambler.ru*

Поступила 14.10.2016 г.

Принята в печать 26.12.2016 г.

Получены и исследованы трансгенные растения табака (*Nicotiana tabacum* L.) поколения T₁ с искусственным геном антимикробного пептида бомбинина (*bot*). Присутствие данного гена в геноме канамицин-устойчивых растений показано методом ПЦР. Экспрессия гена *bot* подтверждена путем определения антимикробной активности экстрактов листьев трансгенного табака. Полученные растения проявляли морфогенетическую устойчивость к инфекции бактерией *Erwinia carotovora* и грибом *Rhizoctonia solani*. Кроме того, у инфицированных трансгенных растений защитная оксидативная функция при инфекции, а именно активность супероксиддисмутазы и содержание пролина, были на более низком уровне по сравнению с инфицированными нетрансгенными растениями. Использование растений табака, экспрессирующих ген антимикробного пептида бомбинина, перспективно в сельскохозяйственной биотехнологии для защиты растений.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, бомбинин, устойчивость к фитопатогенам.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-4-20-27

Как понятно из названия, антимикробные пептиды проявляют высокую противомикробную активность; они входят в состав врожденной иммунной системы всех эукариотических организмов [1, 2]. Характерными свойствами АМП являются их суммарный положительный заряд и амфифильность. Антимикробные пептиды в концентрации 0,1–5 мкМ вызывают лизис клеток бактерий и грибов, нарушая целостность их мембран и тем самым повышая их проницаемость. В то же время, они безвредны по отношению к клеткам животных и растений [3, 4]. Избирательность действия АМП объясняется различиями биохимического состава и электрофизиологических свойств клеточных мембран микробов и эукариот.

Экспрессия генов гетерологичных АМП в растениях повышает устойчивость последних к фитопатогенам и важна для использования растений в качестве «биофабрик» АМП. Антимикробные пептиды в настоящее время рассматривают как эффективную альтернативу классическим антибиотикам, так как в отличие от антибиотиков бактериального и грибного происхождения к АМП не возникает приобретенной устойчивости у микроорганизмов.

В настоящее время методы генетической инженерии позволяют синтезировать в клетках растений гетерологичные белки, в том числе терапевтического назначения [5]. Как источник фармакологической субстанции растения более

Список сокращений: АМП – антимикробные пептиды; АФК – активные формы кислорода; БСА – бычий сывороточный альбумин; КГА – картофельно-глюкозный агар; МДА – малоновый диальдегид; ПААГ – полиакриламидный гель; пн – пара нуклеотидов; ПОЛ – перекисное окисление липидов; ПЦР – полимеразная цепная реакция; СОД – супероксиддисмутазы; *bot* – ген бомбинина; dNTP – дезоксирибонуклеозидтрифосфат(ы); 35S – промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; SDS – додецилсульфат натрия.

безопасны, чем животные или человек, так как свободны от патогенных вирусов. Кроме того, себестоимость АМП, выделенных из трансгенных растений, в 20–30 раз ниже по сравнению с продуктами твердофазного синтеза или пептидами, выделенными из других источников [6].

Антимикробный пептид бомбинин, выделенный из кожи лягушки *Bombina variegata*, относится к группе линейных α -спиральных пептидов, не содержащих цистеин [7]. Ген бомбинина кодирует 27-членную аминокислотную последовательность и обладает специфической активностью против грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *S. similans*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. gemolyticus*, *S. cohnii*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas ssp.*, *Alcaligenes denitrificans*) бактерий [8].

Целью данной работы было установление факта и анализ проявлений противомикробной активности трансгенных растений табака, экспрессирующих ген антимикробного пептида бомбинина.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Растительный материал

В работе использовали семена полученных ранее трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.), сорт Самсун, с геном антимикробного пептида бомбинина [9]. Семена стерилизовали 1,5 мин в 70%-ном этаноле («Лабтех», Россия), затем 2 мин – в 2%-ном растворе гипохлорита натрия («Лабтех») и промывали 3 раза по 10 мин в стерильной дистиллированной воде. После этого семена проращивали на безгормональной среде МС [10], содержащей 7 г/л агара, 30 г/л сахарозы (рН 5,8) и стандартный набор солей («Лабтех»). Растения культивировали при температуре 22–24°C, 16-часовом световом дне и освещенности 2 клк.

Бактериальные штаммы, плазмиды, среды

Эксперименты проводили с бактериальным фитопатогенным штаммом *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* B15, полученным из Центра виноградарства (Horticulture Centre, Канада) [11], и грибным фитопатогеном *Rhizoctonia solani*, полученным из Всероссийской коллекции микроорганизмов (Пушино, VKM@ibpm.pushchino.ru). Бактериальный штамм выращивали на питательной среде LB («Лабтех») [12], а грибной – на картофельно-глюкозном агаре, содержащем, г/л: экстракт термостабильных

белков из клубней картофеля – 200, глюкозу – 15 («Лабтех») и агар – 25 (Difco, США) [13].

Выделение ДНК из листьев табака для ПЦР

ДНК для ПЦР-анализа выделяли из 3-недельных трансгенных растений [14]. Листья (около 100 мг) растирали в пробирках емкостью 2 мл, добавляли 0,4 мл буфера для экстракции (0,2 М трис-НCl (Sigma, США), рН 7,5; 0,25 М NaCl («Лабтех»); 25 мМ ЭДТА («Диам», Россия); 0,5% SDS (Sigma)), перемешивали и оставляли на 1 ч при комнатной температуре. Далее экстракты осветляли центрифугированием при 12000 г. ДНК осаждали равным объемом изопропанола и осадок растворяли в 100 мкл буфера TE (1 мМ ЭДТА («Диам»), 10 мМ трис-НCl (Sigma), рН 7,4). Полученную растительную ДНК использовали как матрицу в ПЦР. В реакции участвовали также следующие праймеры для гена *bom*: 5'-CGGGATCCATGGGCATTGGC-3' и 5'-CGAGATTTTAGTTGGCAAATGTTCCGG-3' («Евроген», Россия). Таким образом, реакционная смесь содержала 0,1 мкг плазмидной ДНК РВ1121ΔGUS1::*bom* в качестве матрицы; 10 мМ трис-НCl (Sigma), рН 8,8 при 25°C; 50 мМ KCl («Лабтех»); 0,1% тритон X-100 (USB, США); 1,5 мМ MgCl₂ («Лабтех»); 0,2 мМ смесь dNTP (USB), по 50 пикомолей каждого праймера, и 2,5 ед. ДНК Taq-полимеразы (Promega, США). Реакцию проводили на амплификаторе Gene Amp® PCR System 2400 (Perkin Elmer, США) в объеме 25 мкл согласно следующему режиму: 94°C – 5 мин; 30 циклов: 94°C – 1 мин, 55°C – 30 с, 72°C – 30 с; затем 72°C – 7 мин. Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 6%-ном ПААГ в трис-боратном буфере в камере для вертикального электрофореза VE-10 10×10 см («Хеликон», Россия). В качестве маркеров молекулярной массы ДНК использовали препарат 100 bp PLUS («Лаборатория МЕДИГЕН», Россия).

Анализ антибактериальной активности растительных экстрактов

Листья растений растирали в фарфоровой ступке с жидким азотом, затем добавляли экстракционный буфер (10%-ный глицерин (AppliChem, Германия), 1 мМ ЭДТА («Диам»), 150 мМ NaCl («Лабтех»), 100 мМ NH₄Cl («Лабтех»), 10,0 мМ трис-НCl (Sigma), рН 7,5, 3,0 мг/мл дитиотреитола (Sigma), 0,2 мг/мл лейпептина (Serva, США), 0,2 мг/мл ингибитора трипсина (USB), 4 мМ фенолметилсульфонилфторид (Serva) и 2 мг/мл БСА (Sigma)) [15]. Биотесты на антибактериальную

активность проводили методом диффузии в агар [16], определяя ингибирующее влияние белковых экстрактов на рост клеток бактерий *E. carotovora*. Чашки Петри диаметром 9 см содержали 25 мл 1,5%-ного агара с бактериальной суспензией (10^8 кл/мл); в агаре делали лунки диаметром 5 мм и добавляли в них белковые экстракты из трансгенных и нетрансгенных листьев, предварительно измерив в экстрактах концентрацию общего белка [17]. Чашки Петри инкубировали 8 ч при 4°C для диффузии пептидов в агар, а затем при 25°C. Радиус чистой зоны вокруг лунки служил показателем ингибирования роста бактерий.

Устойчивость к патогенам у изолированных листьев растений

Для проверки устойчивости трансгенных растений к фитопатогенам молодые листья инфицировали суспензией бактерий *E. carotovora* и мицелием гриба *R. solani*. В качестве контроля служили листья нетрансформированных растений. Фитопатогенными бактериями (суспензия 10^6 кл/мл) и мицелием гриба (фрагмент агара с мицелием $0,5 \times 0,5$ см) инокулировали черешки листьев, которые помещали на питательную агаризованную среду МС в чашки Петри, и выдерживали их в закрытом состоянии при 24°C и 16-часовом фотопериоде. Через 1–14 сут (в зависимости от вида патогена) оценивали степень повреждения листьев. В каждом варианте опыта заражали по 4 листа.

Устойчивость растений к окислительному стрессу

Листья трансгенных и контрольных растений инокулировали суспензией бактерии *E. carotovora* с плотностью 10^3 – 10^4 кл/мл. В качестве контроля необработанные патогеном листья растений обеих групп (трансгенных и нетрансгенных) погружали в дистиллированную воду, излишки воды стряхивали и листья помещали в чашку Петри на увлажненную фильтровальную бумагу. Через сутки измеряли показатели, характеризующие окислительный стресс.

Для определения активности СОД растительный материал (100 мг) гомогенизировали в 1 мл 100 мМ фосфатного буфера, рН 6,8. Активность фермента определяли, используя тетразолий нитросиний (Fluka, Индия) [18]. За единицу активности СОД принимали содержание фермента, вызывающее 50%-ное ингибирование фотохимического восстановления красителя.

Уровень ПОЛ оценивали спектрофотометрически по тесту с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-тест), основанному на взаимодействии ТБК с конечными продуктами окисления липидов, основную долю которых составляет малоновый диальдегид (МДА) [19].

Для определения содержания пролина использовали модифицированный метод Bates et al. [20]. Цветную реакцию проводили смешиванием 500 мкл экстракта растительной ткани с 500 мкл реактива (1,25 г нингидрина, 30 мл ледяной уксусной кислоты («Лабтех»), 20 мл 6 М ортофосфорной кислоты (Panreac, США) и 500 мкл ледяной уксусной кислоты («Лабтех»). Оптическую абсорбцию измеряли на спектрофотометре при длине волны 520 нм.

Концентрацию свободного пролина определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием растворов аминокислоты различной концентрации. Расчет проводили в мг пролина на 1 г сырой массы материала.

Статистический анализ

Для статистической обработки данных использовали программы Statistica 6.0 и MS Excel 2007. Измерения проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях. Достоверность отличий оценивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использовали трансгенные растения табака, несущие ген антимикробного пептида бомбина, поколения T_0 [9]. Эти растения были получены ранее методом трансформации листовых дисков [15] бактериями *Agrobacterium tumefaciens* СВЕ21 [21], содержащими генетическую конструкцию pBI121ΔGUS::*bot* [9] (рис. 1).

Для получения растений поколения T_1 трансформированные растения поколения T_0 (15 линий) были высажены в теплицу, доведены до цветения и конца вегетации. Они имели нормальный фенотип и сохраняли способность образовывать при самоопылении жизнеспособные семена. Все растения были предварительно проверены на присутствие гена *bot* (рис. 2, а). Расщепление трансгенных признаков проверяли по маркерному гену неомидинфосфотрансферазы II (*nptII*). С этой целью семена, полученные из самоопыленных трансгенных растений поколения T_0 , экспрессирующих ген *bot*, были высажены на среду МС с канамицином (50 мг/л) («Биохимик», Россия). Через месяц



Рис. 1. Схема плазмиды pBI121ΔGUS::bom: 35S-Pro – промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; nos-ter – сигнал полиаденилирования гена нопалинсинтазы агробактерий; nptII – ген неомисцинофосфотрансферазы II; nos-Pro – промотор гена нопалинсинтазы агробактерий

Fig. 1. Scheme of pBI121ΔGUS::bom plasmid structure: 35S-Pro, promoter of 35S RNA of cauliflower mosaic virus; nos-ter, polyadenylation signal of agrobacterial nopaline synthase gene; nptII, neomycin phosphotransferase II gene; nos-Pro, promoter of agrobacterial nopaline synthase gene

часть выросших из семян нетрансформированных молодых растений проявили чувствительность к канамицину, выражающуюся в обесцвечивании листьев. Отношение количества устойчивых к количеству чувствительных к антибиотику растений показало, что расщепление по этому признаку среди 15 линий поколения T₁ в отношении 3:1 произошло у четырех линий (3-8, 7, 1-1 и 1-2), что свидетельствует об интеграции одной копии трансгена в ядерный геном. Расщепление признака, связанного с присутствием гена *bom*, в поколении T₁ у этих четырех линий было также равно 3:1. Для статистической обработки данных использовали метод Пирсона χ^2 . У потомства трансгенных растений других линий были полу-

чены значения, превышающие менделевское расщепление 3:1, что свидетельствует о множественности вставки трансгена. Эти растения в дальнейшей работе не использовали из-за вероятности эффекта «замолкания» трансгена в результате РНК-интерференции, индуцируемой дублированными копиями трансгенов.

Таким образом, наличие гена *bom* в трансгенных растениях табака поколения T₁ было подтверждено методом ПЦР (см. рис. 2, b). Размер образующихся в результате амплификации фрагментов ДНК (100 пн), соответствовал размеру кодирующей части гена *bom* с дополнительными последовательностями для клонирования.

Антибактериальную активность тестируемых экстрактов табака оценивали методом радиальной диффузии в агаровых блоках. Экстракты трансформированных растений вызывали образование заметных зон лизиса на газоне бактерий *E. carotovora* (рис. 3). Экстракты контрольных растений заметной антибактериальной активностью не обладали. Радиус чистой зоны вокруг лунок (от центра лунки до границы ингибирования роста клеток) с экстрактами трансгенных растений составлял около 10 мм (см. рис. 3).

Трансгенные растения с геном антимикробного пептида *bom* проявляли повышенную устойчивость к бактериальным и грибным фитопатогенным микроорганизмам *E. carotovora* и *R. solani*. Уже через несколько часов после заражения

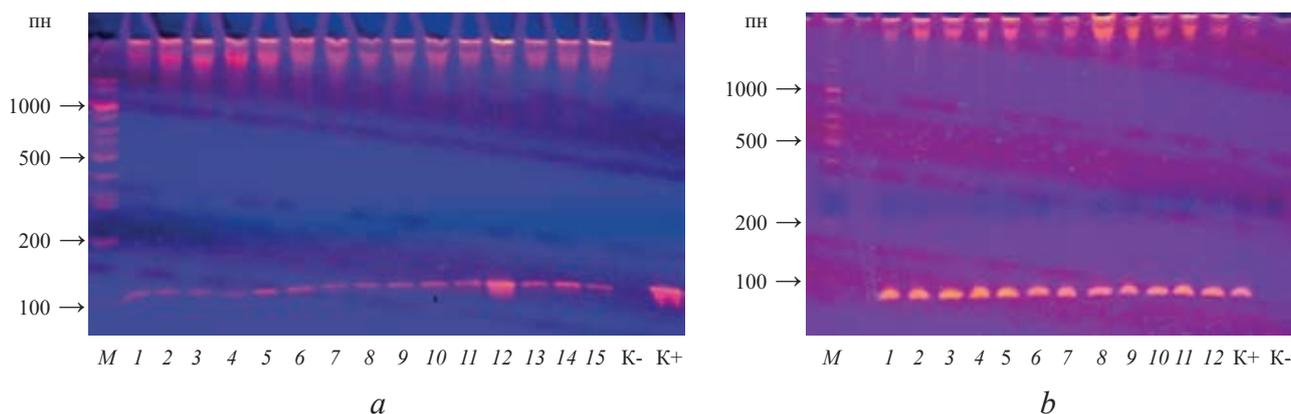


Рис. 2. ПЦР-анализ ДНК трансгенных растений табака, содержащих ген *bom*, с праймерами для этого гена: a – ДНК-продукты независимых трансгенных линий поколения T₀ (дорожки 1–15 линии 1–15); b – ДНК-продукты независимых трансгенных линий поколения T₁ (дорожки 1–3 – линия 1-1; дорожки 4–6 – линия 2-1; дорожки 7–9 – линия 3-8; дорожки 10–12 – линия 7). K- – нетрансгенное растение (контроль); K+ – плаزمид, содержащая ген *bom*; M – маркер ММ ДНК (100 пн PLUS («Лаборатория МЕДИГЕН»))

Fig. 2. PCR analysis of tobacco transgenic plants containing the *bom* gene with primers to this gene: a: lanes 1–15, DNA products of independent transgenic lines of T₀ generation (lines 1–15). b: lanes 1–12, DNA products of independent transgenic lines of T₁ generation (lanes 1–3, line 1; lanes 4–6, line 2; lanes 7–9, line 3-8; and lanes 10–12, line 7). K-, nontransgenic plant (control); K+, plasmid containing the *bom* gene; M, MM markers (100 bp PLUS (Laboratory MEDIGEN, Russia))

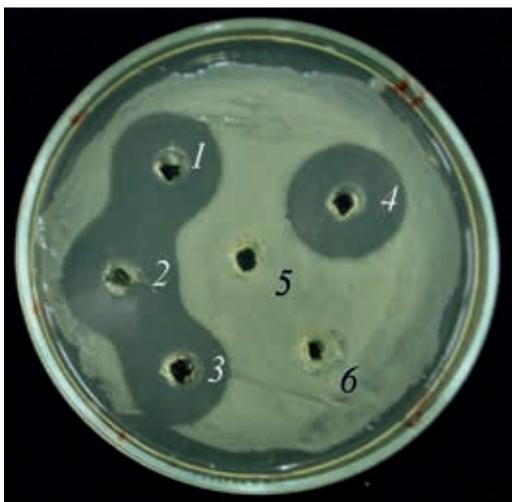


Рис. 3. Действие экстрактов трансгенных растений табака на рост бактериального патогена *E. carotovora*. Лунки 1–4 – экстракты из листьев трансгенных растений (линии 1-1, 2-1, 3-8 и 7, соответственно); лунка 5 – экстракт из листьев нетрансгенных растений; лунка 6 – экстракционный буфер

Fig. 3. Effect of extracts of tobacco transgenic plants on growth of bacterial pathogen of *E. carotovora*. Wells 1–4, extracts of transgenic plant leaves (lines 1-1, 2-1, 3-8 and 7, respectively); well 5, extract of nontransgenic plant leaves; well 6, buffer for extraction

бактерией *E. carotovora* на контрольных растениях были заметны следы повреждения – начинающееся от места заражения отмирание ткани. На 2-е сутки происходило дальнейшее распространение симптомов болезни, и через семь суток наблюдалась полная гибель растений (рис. 4, *a*). Аналогичные результаты были получены при заражении трансформированных растений грибным патогеном *R. solani*. Степень повреждения растений оценивали спустя 10–20 сут после заражения. К концу второй недели на контрольных растениях были заметны некроз ткани и отмирание, в то время как у трансгенного табака признаков повреждения не наблюдалось (см. рис. 4, *b*).

Известно, что одной из первых защитных реакций клетки в ответ на микробную инфекцию является быстрое накопление активных форм кислорода (АФК), таких как супероксид-анион, пероксид водорода и гидроксильный радикал [22], которые снижают жизнеспособность фитопатогенов и приводят к окислительному повреждению их белков, нуклеиновых кислот и липидов [23, 24]. С другой стороны, стрессовые воздействия активируют у растений многокомпонентную антиокислительную систему, которая, снижая избыток АФК, поддерживает содержание образовавшихся активных форм кислорода на уровне, оптимальном для жизнедеятельности клеток,



a



b

Рис. 4. Устойчивость отдельных листьев трансгенных растений табака к фитопатогенным микроорганизмам *E. carotovora* (*a*) и *R. solani* (*b*) через неделю после инфицирования: 1 – лист контрольного растения – обесцвечивание и гибель ткани; 2 – лист трансгенного растения – полное сохранение первоначальных плотности и цвета

Fig. 4. Resistance of separate leaves of tobacco transgenic plants to phytopathogenic microorganisms of *E. carotovora* (*a*) and *R. solani* (*b*) a week after contamination: (1), leaf of control plant (discoloration and tissue destruction); and (2), leaf of transgenic plant (full preservation of density and color)

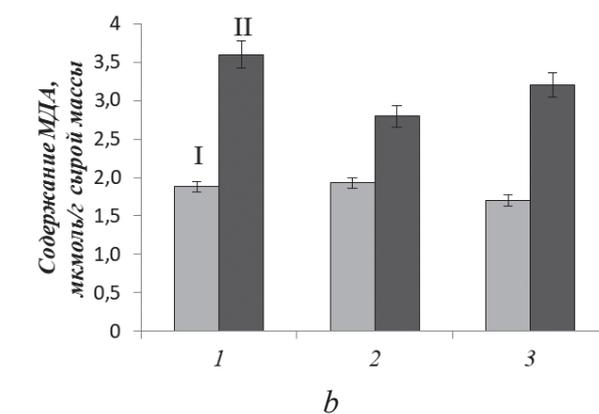
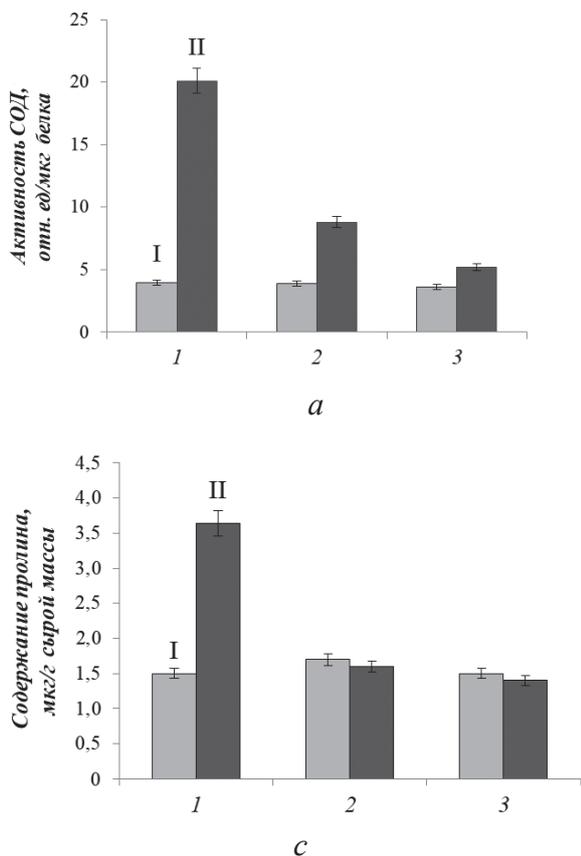


Рис. 5. Влияние биотического стресса (2-й день после контаминации), вызванного бактериями *E. carotovora*, на активность СОД (а), уровень ПОЛ (b) и содержание пролина (с) в листьях контрольных растений; 2 и 3 (линии 3-8 и 7, соответственно) – листья трансгенных растений табака. I – незараженные листья; II – зараженные листья

Fig. 5. Effect of biotic stress induced by *E. carotovora* bacteria infection on SOD activity (a), LPO level (b), and proline content (c) in leaves of control (I) and transgenic (2 and 3, lines 3-8 and 7, respectively) tobacco plants on the 2nd day after contamination: I, uninfected leaves; II, infected leaves

с использованием ферментативных и неферментативных компонентов. Основную роль в этих процессах играет СОД, которая уменьшает концентрацию супероксид-иона. При стрессе происходят также увеличение активности и других ферментов защитной системы (пероксидазы, каталазы) и накопление низкомолекулярных стрессовых метаболитов (фенолов, пролина) [25–27].

В настоящей работе в качестве маркеров инфекционного стресса исследованы активность супероксиддисмутазы, уровень перекисного окисления липидов и содержание пролина в клетках трансгенных и нетрансгенных растений. Указанные виды активности анализировали у двух случайно выбранных линий трансгенных растений 3-8 и 7, поскольку все исследованные линии характеризовались примерно одинаковыми антимикробными свойствами. Активность СОД в стрессовых условиях заражения патогеном *E. carotovora* повышалась как у трансгенных, так и у нетрансгенных (контрольных) растений. Однако в листьях контрольных зараженных растений активность фермента возрастала в 5 раз, а у трансгенных зараженных растений лишь в 1,3–2,2 раза (рис. 5, а). Отмечено незначительное различие в повышении уровня ПОЛ между контрольными и трансгенными растениями (см. рис. 5, b).

При заражении *E. carotovora* в листьях контрольных растений табака обнаружено значительное повышение уровня пролина – в 2 раза по сравнению с состоянием до инфекции. Однако в листьях трансгенных растений содержание пролина не выходило за пределы дострессового уровня (рис. 5, с). Аналогичные результаты были получены при заражении растений грибным патогеном *R. solani* (данные не приведены).

Как видно из полученных данных, экспрессия трансгена *bom* в растениях придавала им повышенную устойчивость к фитопатогенам *Erwinia carotovora* и *Rhizoctonia solani*. Защитным действием бомбинина, инактивирующим патогены, можно также объяснить относительно небольшое повышение активности СОД и содержания пролина при инфекции трансгенных растений по сравнению с зараженными нетрансгенными растениями.

Таким образом, экспрессия трансгена *bom* в растениях может значительно увеличить их антимикробную активность. Трансгенные растения, экспрессирующие ген антимикробного пептида бомбинина, перспективны для использования в сельскохозяйственной биотехнологии с целью защиты растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 15-08-02050 и № 16-04-00623.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boman H. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 1995, 13, 61–92. doi:10.1146/annurev.iy.13.040195.000425
2. Motesinos E. Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiol Lett.*, 2007, 270, 1–11. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00683.x
3. Hylltmark D., Enqstrom A., Bennich H., et al. Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia pupae*. *Eur. J. Biochem.*, 1982, 127, 207–217. doi:10.1111/j.1432-1033.1982.tb06857.x
4. Mills D., Hammerschlag F.A. Effect of cecropin B on peach pathogen, protoplasts, and cells. *Plant Sci.*, 1993, 93, 143–150. doi:10.1016/0168-9452(93)90043-Y
5. Рукавцова Е.Б., Бурьянов Я.И., Шульга Н.Я., Быков В.А. Трансгенные растения для фармакологии. *Вопр. биол., мед. фарм. химии*, 2006, (2), 3–12.
6. Russel C., Clarke L. Recombinant proteins for genetic disease, *Clinical Genet.* 1999. V. 55. P. 389–394.
7. Martemyanov K.A., Spirin A.S., and Gudkov A.T. Synthesis, cloning and expression of genes for antibacterial peptides: cecropin, magainin, and bombinin. *Biotechnology Lett.*, 1996, 18, 1357–1362. doi: 10.1007/BF00129335
8. Simmaco M., Barra D., Chiarini F., et al. A family of bombinin-related peptides from the skin of *Bombina variegata*. *Eur. J. Biochem.*, 1991, 199, 217–222. doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16112.x
9. Захарченко Н.С., Локтюшов Е.В., Рукавцова Е.Б. и др. Получение трансгенных растений, экспрессирующих ген антимикробного пептида бомбинина. *Изв. Тульского гос. ун-та. Естеств. науки*, 2013, (3), 287–297.
10. Murashige T., and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, 15(3), 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
11. Dye D.M. A taxonomic study of the genus *Erwinia* the «Carotovora» group. *New Zealand J. Sci.*, 1969, 12, 81–97.
12. Sambrook J., Fritsch E.E., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. N.Y.: CSHL Press, 1989, 4–1626.
13. Наумов Н.А. Методы микологических и фитопатологических исследований. Л.: Сельхозиздат, 1937, 2–272.
14. Edwards K., Johnstone C., and Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl. Acids Res.*, 1991, 19, 1349. doi: 10.1093/nar/19.6.1349
15. Draper J., Scott R., Hamil J. Transformation of dicotyledonous plant cells using the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the Ri plasmid of *A. rhizogenes*. *Plant Genetic Transformation and Gene Expression. A Laboratory Manual*. [Eds Draper J., Scott R., Armitage P., Walden R.] Oxford: Blackwell Sci. Publ., 1988, 69–160.
16. Ohshima M., Mitruhara I., Okamoto M., et al. Enhanced resistance to bacterial diseases of transgenic tobacco plants overexpressing sarcotoxin IA, a bactericidal peptide of insect. *J. Biochem.*, 1999, 125, 431–435. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022304
17. Bradford M.M. A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
18. Beauchamp C.O., and Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 1971, 44, 276–287. doi:10.1016/0003-2697(71)90370-8
19. Uchiyama M., and Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.*, 1978, 86, 287–297. doi:10.1016/0003-2697(78)90342-1
20. Bates L.S., Waldren R.P., and Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil.*, 1977, 39, (1), 205–207. doi: 10.1007/BF00018060
21. Revenkova E.V., Kraev A.S., and Skryabin K.G. Construction of disarmed derivative of the supervirulent Ti plasmid oTiBo542. *Plant Biotechnology and Molecular Biology* [Ed. Skryabin K.G]. M: Pushchino Research Center, 1993, 67–76.
22. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 2002, 7, 405–410. doi:10.1016/S1360-1385(02)02312-9
23. Mandal S., Mitra A., Mallick N. Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 2008, 72, 56–61. doi: 10.1016/j.pmp.2008.04.002
24. Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., and Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Botany*, 2012, 4, 1–26. doi:10.1155/2012/217037
25. Viljevac M., Dugalic K., Stolfi I., et al. Biochemical basis of apple leaf resistance to *Erwinia amylovora* infection. *Food Technol. Biotechnol.*, 2009, 47, (3), 281–287. oai:hrcak.srce.hr:39845
26. Kim M.S., Kim H.S., Kim K.H., et al. Expression of lily chloroplastic Cu, Zn superoxide dismutase enhances resistance to *Erwinia carotovora* in potatoes. *J. Plant Pathol.*, 2007, 23(4), 300–307. doi:10.5423/PPJ.2007.23.4.300
27. Кузнецов В.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция. *Физиология растений*, 1999, 46, (2), 321–336.

Gene Expression of Antimicrobial Peptide Bombinin Increases Resistance of Tobacco Transgenic Plants to Phytopathogens

N.S. ZAKHARCHENKO*, S.V. PIGOLEVA, O.V. FURS, T.V. SHEVCHUK, O.V. DYACHENKO, and Ya.I. BURYANOV

Shemyakin-and-Ovchinnikov Institute for Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch, 142290, Pushchino, Moskovskaya oblast Russia

*e-mail: znata_2004@rambler.ru**

Received October 14, 2016

Accepted December 26, 2016

Abstract—Transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants with an artificial gene of an antimicrobial peptide bombinin (*bom*) have been obtained and investigated. The presence of the *bom* gene in the genome of kanamycin-resistant plants was shown by PCR. The *bom* gene expression was confirmed by the antimicrobial activity measurements in leaf extracts. The obtained plants were morphogenetically resistant to the *Erwinia carotovora* bacteria and *Rhizoctonia solani* fungi phytopathogens. In addition, in the transgenic plants, the protective oxidative reaction to the infection, namely the SOD activity and proline content, were lower than in the infected nontransgenic plants. The plants with the expression of the antimicrobial bombinin peptide gene are promising for the use in agricultural biotechnology as plant protectors.

Key words: antimicrobial peptides, bombinin, resistance to phytopathogens.

Acknowledgements—The work was financially supported by the Russian Fund for Basic Investigations, Grants 15-08-02050 and 16-04-00623.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-4-20-27