

УДК 581.1

Получение и анализ безмаркерных масличных растений *Camelina sativa* (L.), экспрессирующих ген антимикробного пептида цекропина P1

© 2019 Н.С. ЗАХАРЧЕНКО^{1,*}, О.В. ФУРС¹, С.В. ПИГОЛЕВА¹, О.В. ДЬЯЧЕНКО¹, А.В. АРИПОВСКИЙ², Я.И. БУРЬЯНОВ¹, Т.В. ШЕВЧУК¹

¹ФГБУН «Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», Российская академия наук, Пуцино, Московская обл., 142290

²ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Московская обл., 142279

*e-mail: znata_2008@mail.ru

Поступила в редакцию 25.09.2018 г.

После доработки 08.11.2018 г.

Принята к публикации 15.01.2019 г.

Получены и исследованы безмаркерные масличные трансгенные растения рыжика посевного (*Camelina sativa* (L.) Crantz), с синтетическим геном антимикробного пептида цекропина P1 под контролем промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты. Для трансформации растений был использован агробактериальный бинарный вектор, не содержащий селективных генов устойчивости к антибиотикам и гербицидам. Скрининг безмаркерных трансформантов проводили по детектированию цекропина P1 по его антибактериальной активности и с помощью иммуноферментного анализа. Полученные растения проявляют повышенную устойчивость к инфекции бактерией *Erwinia carotovora*, грибом *Fusarium graminearum* и к окислительному стрессу в условиях заражения. Анализ жирнокислотного состава семян нетрансгенных и трансгенных линий камелины, экспрессирующих ген *cecP1*, показал повышенное количество α -линоленовой кислоты у трансгенных линий, по сравнению с семенами немодифицированных растений. Полученные результаты указывают на возможность включения гена цекропина P1 в интегральную антистрессовую защитную систему растений.

Ключевые слова: *Camelina sativa*, агробактериальная трансформация, безмаркерные трансгенные растения, жирнокислотный состав, микробные фитопатогены, окислительный стресс, устойчивость, цекропин P1

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-45-57

Рыжик посевной (*Camelina sativa* (L.)) – масличное растение семейства капустных (Brassicaceae) [1], известен как немецкий кунжут, ложный лен. Это однолетнее травянистое растение, семена которого имеют уникальный состав жирных кислот. Ценность камелинового масла заключается в высоком содержании полиненасыщенных жирных кислот, причем доля ненасыщенных жирных кислот ряда $\omega 3$ составляет 35–40% [2]. Масло этого растения отличается высоким содер-

жанием каротиноидов, превышающим его значения в подсолнечном масле, соевом и др., оно также богато витамином Е, который является мощным антиоксидантом (105 мг на 100 мл масла, что в 2,5 раза больше, чем в масле рапса, и в 7 раз больше, чем в масле льна) [3]. Рыжик выращивается, в основном, в Северной Америке, в Австралии и в северных районах Европы. В России рыжик выращивается для поддержания севооборота под подсолнечником и зерновыми культурами,

Список сокращений: АМП – антимикробные пептиды; ЖК – жирные кислоты; КГА – картофельно-глюкозный агар, МС – безгормональная среда Мурашига–Скуга; ОП – оптическая плотность суспензии; СОД – супероксиддисмутаза; *cecP1* – ген цекропина P1; 35S – промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты.

семенной жмых используется в производстве кормов для животных. Для получения масла эту культуру выращивают в ограниченном количестве в Волгоградской, Орловской и Саратовской областях. Проводятся исследования, направленные на получение трансгенных растений рыжика как продуцента ценных продуктов для различных биотехнологий [4]. Несмотря на свою общую повышенную устойчивость, рыжик чувствителен к бактериальным и грибным фитопатогенам, вызывающим увядание и корневую гниль. Для повышения устойчивости растений к фитопатогенам используется метод трансформации растений генами антимикробных пептидов (АМП), обладающих широким спектром антибиотической и фунгицидной активности [5]. В качестве целевого гена положительно зарекомендовал себя ген антимикробного пептида цекропина P1 (*cec P1*), выделенный из нематод млекопитающих [6]. Цекропин P1 относится к группе линейных α -спиральных пептидов, не содержащих цистеин [7]. Ген цекропина P1 кодирует 31-членную аминокислотную последовательность и обладает высокой активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Показана также активность цекропина P1 против фитопатогенных грибов [8, 9].

Для отбора трансгенных растений традиционно используют селективные гены устойчивости к антибиотикам и гербицидам [10] или гены-репортеры [11]. Трансгенные растения, получаемые с помощью конструкций, не содержащих селективные гены, более привлекательны благодаря их биобезопасности, прежде всего, в отношении вероятности переноса к диким сородичам трансгенных растений генов устойчивости к гербицидам, а также переноса к почвенным бактериям или к бактериям ЖКТ человека генов устойчивости к антибиотикам. Получение безмаркерных трансгенных растений путем переноса Т-ДНК, не содержащей последовательности для селективного гена, является перспективным направлением и имеет ряд преимуществ: 1) не требуется применение дополнительных, зачастую трудоемких методов удаления селективного гена из генома трансгенных растений; 2) трансформанты не подвергаются селективному стрессу, который может вызвать гиперметилирование ДНК и, как следствие, «замолкание» целевых генов [12, 13]; 3) в геноме трансформантов меньше «генетического мусора», а чем короче переносимая в растения генетическая конструкция, тем выше вероятность экспрессии целевого гена [14].

Ранее были получены растения рыжика, содержащие ген цекропина P1 и селективный ген неомизинфосфотрансферазы II (*npt II*), придающий трансгенным растениям устойчивость к каминацину [9].

Целью данной работы стало получение и физиолого-биохимический анализ безмаркерных растений *Camelina sativa* (L.), экспрессирующих ген антимикробного пептида цекропина P1.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Растительный материал

Объектами исследования служили растения рыжика (*Camelina sativa* (L.) Crantz) отечественного сорта «омский», полученного из Сибирской опытной станции ВНИИМК. Семена стерилизовали 1,5 мин в 70%-ном этаноле («Лабтех», Россия), затем 2 мин в 20%-ном растворе гипохлорита натрия и промывали 3 раза по 10 мин в стерильной дистиллированной воде. Семена проращивали на безгормональной среде Мура-сига–Скуга (МС) [15], содержащей 7 г/л агара, 30 г/л сахарозы (рН 5,8) и стандартный набор солей («Лабтех»). Растения культивировали при температуре 22–24 °С, при 16-часовом дне и освещенности 2 клк. Укорененные растения переносили в теплицу.

Бактериальные штаммы и плазмиды

Для генетической трансформации использовали клетки штамма *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404(pAL4404) [16], содержащие вектор pVM::*cecP1* с синтетическим геном антибактериального пептида цекропина P1 [17]. Ночную культуру бактерий выращивали в среде LB [18], разводили до оптической плотности 1,0 при 600 нм и добавляли поверхностно-активное вещество Tween-20 (USB, США) до 0,075% [19].

В работе использовали фитопатогенный штамм бактерии *Erwinia carotovora subsp. carotovora* B15, полученный из Horticulture Centre (Канада), и штамм фитопатогенного гриба *Fusarium graminearum* Schwabe 1839 (VKM F-2381), полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов в Пущино (VKM@ibpm.pushchino.ru). Бактериальный штамм выращивали на питательной среде LB, а грибной штамм – на картофельно-глюкозном агаре (КГА), содержащем экстракт термостабильных белков из клубней картофеля (200 г в 1 л), 15 г глюкозы и 25 г агара (Difco, США) [20].

Трансформация рыжика

Генетическую трансформацию проводили методом агроинфильтрации незрелых цветочных почек [21]. Растения помещали в герметичную камеру за 5–7 дней до начала цветения, цветочные почки окунали в суспензию агробактерий ($ОП_{600} = 1,0$) и выдерживали в вакууме (10^4 Па) в течение 2–10 мин. Для каждого из трех опытов использовали по три растения. После этого растения переключали на горизонтальную поверхность с влажной фильтровальной бумагой, сверху растения укрывали так же влажной фильтровальной бумагой и выдерживали сутки в темноте при комнатной температуре. Затем растения переносили в теплицу и выращивали в условиях длинного светового дня (16 ч) до конца вегетации. С каждого растения собирали стручки, сушили в течение 10 дней при комнатной температуре. После этого собирали семена и хранили их при температуре 4 °С. Для дальнейшего исследования семена стерилизовали и проращивали на среде МС.

Вестерн-блот анализ

Для определения экспрессии гена *secP1* в трансгенных растениях получали бесклеточные экстракты [22]. Электрофорез проводили в трициновой системе ДСН-ПААГ, белки переносили на нейлоновую мембрану PDVF (Amersham Pharmacia Biotech, Великобритания) [23]. Иммуноферментный анализ цекропина Р1 проводили с помощью полученных к этому синтетическому пептиду кроличьих поликлональных антител и антикроличьих иммуноглобулинов, конъюгированных с пероксидазой хрена. Искусственный цекропин Р1 был получен методом твердофазного синтеза [24]. Проявление мембраны проводили с помощью хемилюминесцентной системы ECL (Pierce, США).

Выделение ДНК

ДНК для ПЦР-анализа выделяли из 3-недельных трансгенных растений [25]. Полученную растительную ДНК использовали в качестве матрицы в ПЦР анализах. Для этого были использованы праймеры для гена *secP1* – 5'-CGGGATCCATGG-GCTCTTG-3' и 5'-CGAGATCTCTACTTAGCGC-GGC-3' («Евроген», Россия). Таким образом, реакционная смесь содержала 0,1 мкг растительной ДНК камелины в качестве матрицы, 10 мМ трис-НСl (Sigma, США), рН 8,8 (при 25 °С), 50 мМ КСl («Лабтех»), 0,1% Тритон X-100 (USB, США),

1,5 мМ MgCl₂ («Лабтех»), 0,2 мМ смеси dNTP (USB), по 50 пМ каждого праймера и 2,5 ед. ДНК *Taq*-полимеразы (Thermo, Литва). Реакцию проводили на амплификаторе MJ-Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) в объеме 25 мкл, согласно следующему режиму: 5 мин при 94 °С; 30 циклов – [1 мин при 94 °С; 30 с при 55 °С; 30 с при 72 °С], затем 7 мин при 72 °С. Возможную контаминацию препаратов растительной ДНК следовыми количествами агробактериальной ДНК проверяли путем амплификации фрагмента (670 пн) гена *VirB1* с использованием праймеров GGCTACATCGAAGATCGTATGAATG (f) и GACTATAGCGATGGTTACGATGTTGAC (r). Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 6%-ном ПААГ в трис-боратном буфере, в камере для вертикального электрофореза VF-10 10 x 10 см («Хеликон», Россия). В качестве маркеров молекулярной массы ДНК использовали препарат 100 пн PLUS («Лаборатория МЕДИГЕН», Россия).

Анализ антимикробной активности растительных экстрактов

Для определения влияния экстрактов трансгенных растений на рост клеток фитопатогенных бактерий *Erwinia carotovora* использовали метод диффузии в агар [26]. Для этого листья растений растирали в фарфоровой ступке с жидким азотом, затем добавляли экстракционный буфер (10%-ный глицерин (AppliChem, Германия), 40 мМ ЭДТА («ДиаЭМ»), 150 мМ NaCl («Лабтех»), 100 мМ NH₄Cl («Лабтех»), 4 мМ фенилметилсульфонилфторида (Serva, США), 10 мМ трис-НСl, рН 7,5 (Sigma), 3,0 мг/мл диэтиотрейтола (Sigma), 0,2 мг/мл лейпептина (Serva), 0,2 мг/мл ингибитора трипсина (USB, США), 2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (Sigma) [27] и продолжали растирать до гомогенной суспензии. Полученный экстракт центрифугировали 20 мин при 10000 g и определяли в супернатанте антибиотическую активность. 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 бесклеточные экстракты (100 мкл) из трансгенных и нетрансгенных листьев, предварительно измерив в экстрактах концентрацию общего белка (1 мг/мл) [28]. Агаровые блоки инкубировали 8 ч при 4 °С для диффузии экстрактов в агар, затем блоки переносили в 25 °С и через два дня локализовали стерильные зоны вокруг лунок.

Биотесты на изолированных листьях и растениях

Для проверки устойчивости трансгенных растений к фитопатогенам молодые листья инфицировали суспензией бактерий *E. carotovora* (10^3 – 10^5 кл./мл) или заражали кусочками мицелия гриба *Fusarium graminearum*. В качестве контроля служили молодые листья нетрансформированных растений. Фитопатогенными бактериями и грибами инокулировали черешки листьев трансгенных и нетрансгенных растений, помещали их на агаризованную питательную среду МС в чашки Петри, выдерживали в закрытом состоянии при 24 °С и 16-часовом световом дне и через 1–14 сут (в зависимости от вида патогена) оценивали степень повреждения. Целые растения заражали уколом иглы, смоченной в суспензии патогенных бактерий. Для заражения грибными патогенами кусочек агара с мицелием помещали в междуузлия листьев. В каждом варианте опыта заражали по 4 листа.

Степень повреждения растений фитопатогенами оценивали в соответствии с индексом заболевания [29]. Согласно этому методу, выделяли пять категорий выраженности симптомов у отдельных проростков: 0 – не обнаружено заметных симптомов; 1 – проявление симптомов только на верхушке проростка; 2 – все тело проростка поражено, но проростки стоят прямо; 3 – проросток упал, но все еще зеленый и сочный; 4 – проросток завял и засох. Учитывая степень выраженности симптомов у отдельных проростков, определяли индекс заболевания по формуле:

$$[(B+2C+3D+4E)/4(A+B+C+D+E)] \cdot 100, \quad (1)$$

где А, В, С, D и E – число проростков с симптомами 0, 1, 2, 3, и 4, соответственно. В том случае, если погибали все проростки, индекс был равен 100. Если же ни у одного из тестируемых проростков не было выявлено симптомов болезни, индекс – 0. Степень устойчивости к заболеванию оценивали по уменьшению этого индекса.

Устойчивость растений к окислительному стрессу в условиях заражения фитопатогенами

Для оценки устойчивости зараженных растений к окислительному стрессу листья трансгенных и контрольных растений инокулировали суспензией бактерии *E. carotovora* с плотностью 10^3 – 10^5 кл./мл. В качестве контроля необработанные патогеном листья растений обеих групп (трансгенные и нетрансгенные) окунали в дистил-

лированную воду, излишки воды стряхивали и листья помещали в чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу. Для анализа брали по три листа с трех растений каждой из пяти линий, делали высечки из листьев, объединив их, через двое суток измеряли параметры окислительного стресса. Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) растительный материал (100 мг) гомогенизировали в 1 мл 100 мМ фосфатного буфера, рН 6,8. Активность СОД определяли, используя тетразолий нитросиний [30]. За одну единицу активности СОД принимали содержание фермента, вызывающее ингибирование фотохимического восстановления тетразолия нитросинего на 50%. Активность СОД соответствовала удельной активности, т.е. количеству фермента, которое катализирует превращение 1 мкМ субстрата за 1 мин в пересчете на мкг суммарного растворимого белка в исследуемом образце. Данные представлены в единицах активности фермента ЕУ/мкг белка.

Выделение жирных кислот и определение их содержания и состава в семенах растений рыжика посевного

Подготовка пробы. Перевод триглицеридов и фосфолипидов семян рыжика в метиловые эфиры соответствующих высших жирных кислот выполнен методом безэкстракционного метилирования метоксидом натрия и трехфтористым бором в метаноле [31]. Каждый из образцов перемальывали в кофемолке и просеивали сквозь сито с ячейкой размером 0,4 мм. К навеске 16–20 мг порошкообразной пробы прибавляли 2 мг маргаринового кислоты в 0,2 мл толуола (внутренний стандарт) и 350 мкл 1М метанольного раствора метоксида натрия, нагревали 20 мин при 70 °С. Добавляли 500 мкл 15%-ного трехфтористого бора в метаноле, нагревали еще 20 мин. Прибавляли 1 мл воды и 2 мл перегнанного гептана, экстрагировали метиловые эфиры жирных кислот в органическую фазу, которую далее подвергали хроматографированию.

Хроматография. Анализ выполнен на аналитическом газовом хроматографе «ВАРИАН 3900» со следующими параметрами процесса: колонка – 15 м × 0,2 мм × 0,2 мкм с полярной фазой «Супелковакс-10», газ-носитель – гелий (1,8 мл/мин), метод ввода пробы – деление потока газа-носителя в отношении 1:65, объем вводимой жидкой пробы – 2,0 мкл, температурная программа анализа – от 100 °С (30 с) до 245 °С (5 мин) со скоростью 10 °С/мин, температура испарителя и пламенно-ионизационного детектора – 260 °С и 255 °С, соответственно.

Регистрация сигнала выполнена с помощью компьютерной программы «Мультихром-1,5».

Хроматографические пики метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот идентифицировали с помощью стандартных калибровочных смесей насыщенных и ненасыщенных жирных эфиров ME-14 и ME-20 («Супелко»).

Количественное определение жирнокислотных компонентов масла рыжика выполнено методом внутреннего стандарта (т.е. маргариновая кислота внесена в каждый из образцов исследуемого материала непосредственно перед его химической дериватизацией). Калибровочные коэффициенты кислот C_{16:0}, C_{18:0}, C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3} по маргариновой кислоте C_{17:0} предварительно определены хроматографированием раствора с известными концентрациями перечисленных кислот реактивной чистоты (не менее 98%), для минорных компонентов они приняты равными калибровочному коэффициенту C_{18:1} по C_{17:0}.

Статистический анализ

Для статистической обработки данных использовали программы Statistica 6.0 и MS Excel 2007. Измерения проводили в трех аналитических и трех биологических повторностях. На графиках и диаграммах приведены средние значения и их стандартные отклонения. Достоверность отличий оценивали с использованием непараметрического критерия Мана–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Трансформация рыжика

В генетической конструкции [17], использованной для трансформации, отсутствовали селективные гены устойчивости к антибиотикам и гербицидам в области Т-ДНК, которая интегрируется в геном растений, (рис. 1).

Трансформацию рыжика проводили методом агроинфильтрации незрелых цветочных почек [19]. Для трансформации растений использовали разное время вакуумной агроинфильтрации от 2 до 10 мин (табл. 1). Для поиска трансформированных растений семена (по 50 шт от каждого опыта), полученные после трансформации, стерилизовали и проращивали в чашках Петри на среде МС (рис. 2).

Скрининг и анализ трансгенных растений

Скрининг растений, синтезирующих антимикробный пептид, цекропин P1, проводили методом иммуноферментного анализа и по детекции антибиотической активности экстрактов. В первом случае проводили вестерн-блот анализ экс-

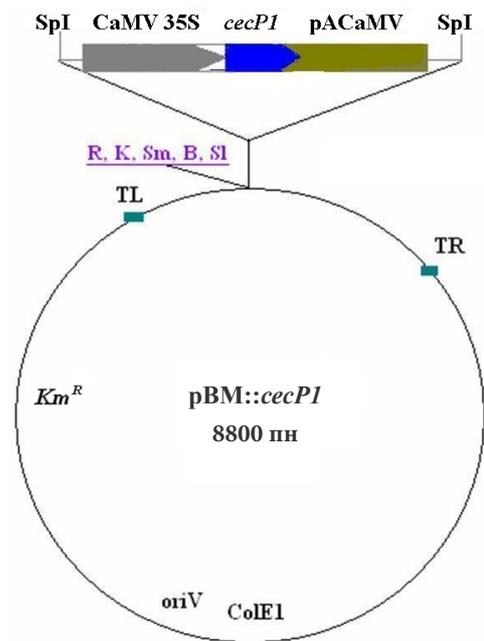


Рис. 1. Схема бинарного вектора pBM::cecP1. CaMV 35S – промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; pACaMV – сигнал полиаденилирования вируса мозаики цветной капусты; cecP1 – ген цекропина P1; Km^R – ген устойчивости к антибиотику канамицину для селекции бактерий; oriV – начало репликации; TL и TR – левая и правая границы Т-ДНК; ColE1 – начало репликации плазмиды ColE1; R, K, Sm, B, SI, SpI – сайты рестрикции EcoRI, KpnI, SmaI, BamHI, SalI, SphI

Fig. 1. Scheme of binary vector pBM::cecP1. CaMV 35S – promoter 35S RNA of mosaic cauliflower virus; pACaMV – signal of polyadenylation of mosaic cauliflower virus; cecP1 – gene of cecropin P1; Km^R – gene of resistance to antibiotics kanamycin for bacteria selection; oriV – onset of replication; TL and TR – left and right borders of DNA; ColE1 – onset of replication of plasmid ColE1; R, K, Sm, B, SI, SpI – restriction sites EcoRI, KpnI, SmaI, BamHI, SalI, SphI

трактов из листьев, содержащих около 100 мкг общего белка. В экстрактах отдельных растений был обнаружен искомый пептид с молекулярной массой 3,3 кДа, соответствующий зрелой форме цекропина P1 (рис. 3).

Как видно на рисунке, детекция целевого продукта в трансгенных растениях позволяет определить линии с различной интенсивностью положительных сигналов, т.е. одновременно отмечать уровень синтеза цекропина P1. Нами получено 44 линии cecP1-содержащих растений. Присутствие гена cecP1 в трансгенных растениях, которые дали положительный сигнал в вестерн-блот анализе T₀ поколения, подтверждено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). При электрофоретическом разделении продуктов ПЦР со



Рис. 2. Растения рыжика в теплице станции искусственного климата «Биотрон» через неделю после агроинfiltrации

Fig. 2. Camelina plants in the greenhouse climate control station Biotron one week after agroinfiltration

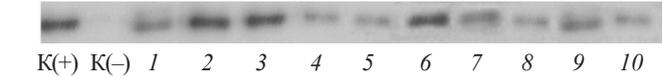
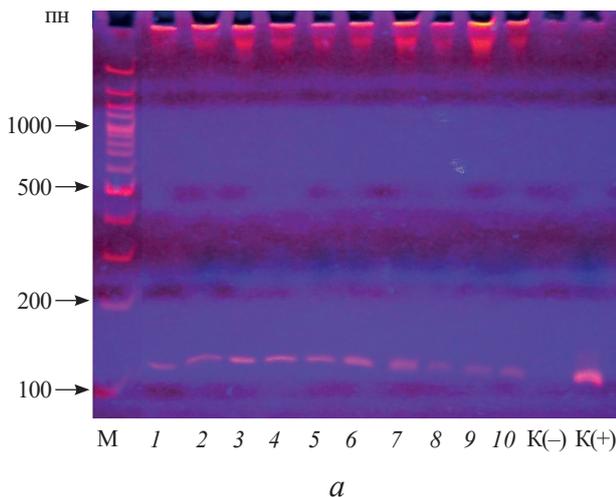


Рис. 3. Вестерн-блот анализ белковых экстрактов из трансгенных растений рыжика, синтезирующих пептид цекропин P1. K(+)- 20 нг синтетического цекропина P1; K(-) – нетрансформированное растение; 1-10 – трансформированные растения (линии 1-10)

Fig. 3. Western blot analysis of protein extracts of tobacco transformed plants, synthesizing peptide cecropin P1. K (+) - 20 ng synthetic cecropin P1; K (-) – extract of untransformed plant; 1-10 – extracts of transformed plants (lines 1-10)

специфическими праймерами в образцах ДНК трансгенных растений, как и ожидалось, был обнаружен фрагмент размером 102 пн, соответствующий полному размеру гена цекропина P1, кодирующего зрелую форму этого пептида (рис. 4a). Предварительно образцы растительных тканей проверяли на отсутствие агробактериальной контаминации. Для этого с препаратами растительной ДНК проводили ПЦР с праймерами к гену *VirB1*. Во всех анализируемых образцах агробактериальное заражение отсутствовало (данные не приведены).

Для получения растений поколения T₁ десять случайно выбранных линий трансгенных растений поколения T₀ были высажены в теплицу до периода цветения и конца вегетации. Растения имели нормальный фенотип и сохраняли способность образовывать при самоопылении жизнеспособные

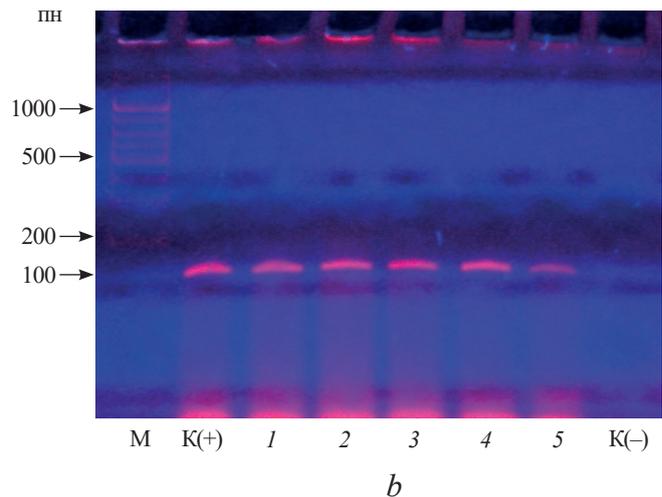


Рис. 4. ПЦР-анализ ДНК трансгенных растений рыжика T₀ поколения (a) и T₁ поколения (b), содержащих ген *cecP1*, с праймерами для этого гена. М – маркер ММ ДНК (100 пн PLUS («Лаборатория МЕДИГЕН»)); 1-10 – ДНК-продукты независимых трансгенных линий (линии 1-10); K(-) – нетрансгенное растение (контроль); K(+)- плазмида, содержащая ген *cecP1*

Fig. 4. PCR analysis of DNA transformed of camelina plants containing *cecP1* gene, with primers for this gene. T₀ generation (a) and T₁ generation. М – MM marker DNA (100 bp PLUS (“Laboratory of MEDIGEN”)); 1-10 – DNA products independent transformed lines (lines 1-10); K(-) – untransformed plant (control); K(+)- plasmid containing the gene *cecP1*

семена. Полученные семена растений поколения T₀ были высажены на среду МС. Спустя две недели проростки каждой линии анализировали на присутствие гена *secP1*. ПЦР-анализ растений поколения T₁ показал присутствие гена *secP1* в большей части трансгенных растениях (рис. 4b). У пяти из десяти выбранных линий отношение количества растений, содержащих ген *secP1*, к растениям, не содержащим его, было 3:1, что предполагает у них интеграцию одной копии трансгена в ядерный геном.

Второй метод скрининга растений связан с анализом антибактериальной активности исследуемых экстрактов. Уровень активности оценивали по радиусу зоны отсутствия роста бактерий *Erwinia carotovora* на агаризованной среде вокруг лунок, в которые был добавлен растительный экстракт с одинаковым количеством белка из листьев трансгенных и нетрансгенных растений. Экстракты контрольных растений практически не обладали антибактериальной активностью. На рис. 5 приведены результаты анализа антибиотической активности синтетического пептида цекропина P1 34 нг (лунка 7), 3,4 нг (лунка 6), контрольного растения (лунка 8) и пяти линий трансформированных *secP1*-растений (лунки 1–5).

Радиус зоны отсутствия бактериального роста вокруг лунок с экстрактами трансгенных растений составлял от 2 до 10 мм. Эксперименты с добавлением к экстрактам контрольных растений фиксированных количеств синтетического цекропина P1 позволили установить содержание этого пептида в разных линиях трансгенных растений в количестве от 0,003 до 0,03% от общего растворимого белка.

При получении безмаркерных *secP1*-содержащих растений частота их генетической трансформации определялась как отношение числа побегов,



Рис. 5. Действие экстрактов трансгенных растений рыжика на рост бактериального патогена *E. carotovora*. Лунки 1–5 – экстракты из листьев пяти линий трансгенных растений; лунка 6 – синтетический пептид цекропин P1 (3,4 нг); лунка 7 – синтетический пептид цекропин P1 (34 нг); 8 – экстракт из листьев нетрансгенных растений

Fig. 5. Effect of extracts of transgenic camelina plants on the growth of the bacterial pathogen *E. carotovora*. Holes: 1–5 – extracts from the leaves of the 5 independent transformed lines (lines 1–5, respectively); 6 – synthetic cecropin P1 (3.4 ng); 7 – synthetic cecropin P1 (34 ng); 8 – leaf extract untransformed plant

образовавшихся из семян на бесселективной среде и давших в анализе положительные цекропин P1-сигналы, к общему числу культивируемых эксплантов. Исследована зависимость частоты трансформации рыжика от продолжительности агроинфильтрации. Наиболее оптимальной оказалась экспозиция незрелых почек в течение 5 мин, частота трансформации при этом составила 25,4% (табл. 1).

Таблица 1

Зависимость частоты агробактериальной трансформации цветочных почек рыжика посевного от продолжительности вакуумной инфильтрации суспензии *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404

Dependency of frequency of agrobacterial transformation of flower buds *Camelina sativa* on duration of vacuum infiltration of *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suspension

Время вакуумной инфильтрации, мин	Число незрелых цветочных почек на растении*	Число трансгенных семян, взятых для проращивания	Доля трансформированных проростков, %
2	97 ± 8	6	11,3
4	114 ± 10	11	22,5
5	79 ± 6	13	25,4
6	82 ± 8	10	20,3
10	65 ± 6	4	9,1

Примечание: общее число семян, взятых для проращивания в каждой экспозиции составляло 50 шт. ОД₆₀₀ = 1,0.

*Представлены средние значения и их стандартные ошибки из трех аналитических (отдельное растение) и трех биологических повторностей (отдельный эксперимент).

Note: the Total number of seeds taken for germination in each exposure was 50 pcs. OD₆₀₀ = 1.0.

*Average values and their standard errors from three analytical (separate plant) and three biological repetitions (separate experiment) are presented.

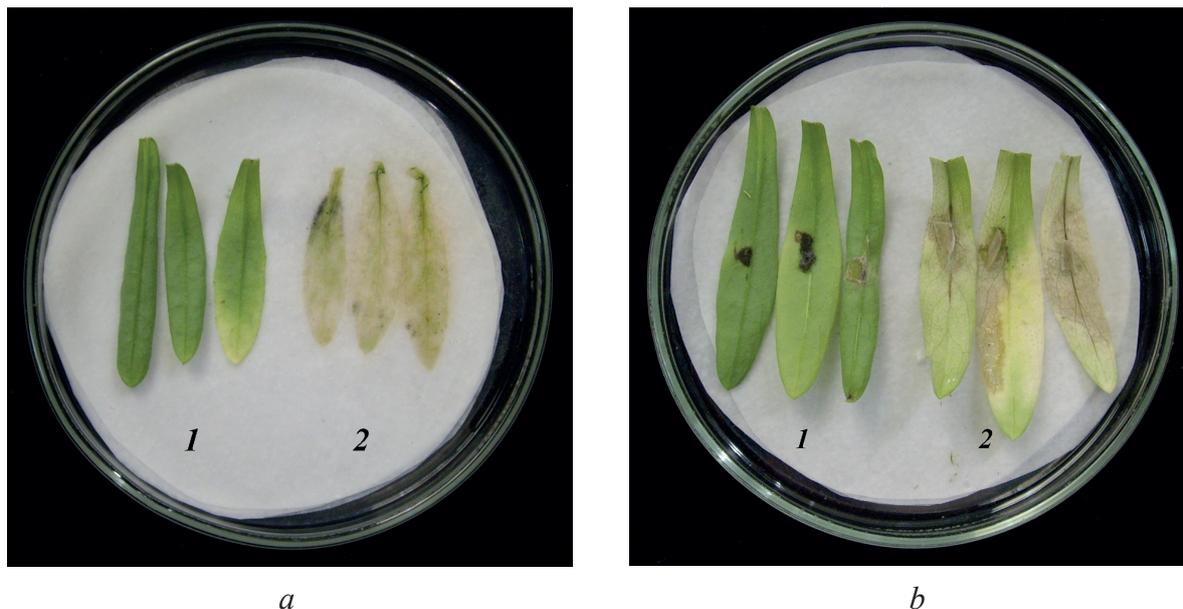


Рис. 6. Устойчивость отдельных листьев трансгенных растений рыжика к фитопатогенным микроорганизмам *E. carotovora* (a) и *F. graminearum* (b) через неделю после инфицирования. 1 – листья трансгенных растений (полное сохранение первоначальной плотности и цвета); 2 – листья контрольных растений (некроз и гибель ткани)

Fig. 6. Enhancing the stability of individual leaves of transgenic camelina plants to phytopathogen microorganisms *E. carotovora* (a) and *P. graminearum* (b) through the week after infection: 1 – leaves of transformed plants - complete preservation of initial density and color; 2 – the leaves of control plants - necrosis and death of tissue

Устойчивость трансгенных растений к фитопатогенам

Полученные *secP1*-растения проявляли повышенную устойчивость к фитопатогенным микроорганизмам *Erwinia carotovora* и *Fusarium graminearum*. Анализ трансгенных растений показал значительное повышение их устойчивости к бактерии *E. carotovora* (рис. 6a). Уже через одни сутки после заражения на листьях контрольных растений были заметны следы повреждения – отмирание ткани, начинающееся от места заражения. На 2-е сутки происходило полное отмирание листа. Аналогичные результаты были получены при заражении листьев трансформированных растений грибным патогеном *F. graminearum* (рис. 6b).

Степень повреждения растений грибным патогеном оценивали спустя 8–14 сут. после заражения. К концу 2-й недели на листьях контрольных растений был заметен некроз ткани и отмирание, в то время как листья трансгенных растений оставались почти без признаков повреждения. Степень заболевания целых проростков оценивали по индексу заболевания

(см. формулу (1)). В четырех линиях трансгенных растений рыжика по отношению к *E. carotovora* индекс заболевания не превышал 30%. В то время как у контрольных растений индекс заболевания достигал 100% уже на 3-и сутки (рис. 7).

Эти данные говорят о повышенной устойчивости трансгенных растений, по сравнению с контрольными, благодаря экспрессии антимикробного пептида цекропина P1.

Исследование жирнокислотного состава семян рыжика

Проведено исследование жирнокислотного состава семян трансгенных растений рыжика. В ходе анализа было показано увеличение процентной доли ненасыщенной жирной кислоты α -линоленовой от 5% до 27% в трансгенных растениях в зависимости от линии, по сравнению с контролем (нетрансформированными растениями). Жирнокислотный состав суммарных липидов семян рыжика посевного (в % от суммы ЖК) приведен в табл. 2. Эти данные свидетельствуют о том, что за счет увеличения доли α -линоленовой жирной кислоты, масло этих растений приобретает более ценное диетическое качество.

Природа и относительное содержание (%) жирных кислот в семенах контрольных и трансгенных растений рыжика посевного (*Camelina sativa* (L.))

The nature and relative content of fatty acid of control and transgenic plants seeds *Camelina sativa* (L.)

Жирная кислота*	Контроль	Трансгенные линии				
		1	2	3	4	5
Пальмитиновая (C _{16:0})	10,6	8,3	8,2	8,0	9,3	8,6
Стеариновая (C _{18:0})	3,8	2,9	3,1	3,1	3,5	3,4
Олеиновая (цис-9-октадеценовая) (C _{18:1})	11,5	13,4	9,5	9,7	8,7	8,3
Линолевая (октадекадиеновая) (C _{18:2} - ω6)	23,1	18,9	17,5	17,8	22,0	20,8
α-Линоленовая (октадекатрисеновая) (C _{18:3} - ω3)	30,4	32,0	38,7	38,0	33,1	35,5
Арахидиновая (эйкозеновая) (C _{20:0})	2,1	1,4	1,7	1,7	1,9	2,0
Гондоиновая (цис-11-эйкозеновая) (C _{20:1})	10,7	4,2	12,8	12,7	11,5	12,0
Эруковая (цис-13-докозеновая) (C _{22:1})	2,3	1,9	2,5	2,3	2,4	2,5
Абсолютное содержание суммы всех ЖК в биомассе семян, %	17,9	24,8	22,2	24,8	17,2	22,2
Отношение ω3/ω6 (w/w)	1,1	1,7	2,2	2,1	1,5	1,7

Примечание: Приведены средние арифметические величины трех аналитических измерений из трех биологических повторностей. Во всех случаях величина стандартного отклонения не превышала 3% от среднего.

*В липидах растений содержались также пальмитолеиновая кислота (цис-9-гексадеценовая, C_{16:1-цис-9}); вакценовая (цис-11-октадеценовая) (C_{18:1-цис-11}); паулиновая (цис-13-эйкозеновая) (C_{20:1}); бегеновая (докозеновая) (C_{22:0}); докозодиеновая (C_{22:2}); нервоновая (цис-15-тетракозеновая) (C_{24:1}); эйкозодиеновая (C_{20:2-ω6}); эйкозатриеновая (C_{20:3-ω3}), концентрация каждой из которых составляла ≤ 2%.

Note: The results are shown as arithmetical values three analytical measurements of three biological experiments each. In all cases, the value of the standard deviation does not exceed 3% of average.

*In lipids of plants also contained palmitoleic acid (cis-9-geksadecenoic, 16:1-cis-9); vakcenoic (cis-11-oktadecenoic) (18:1-cis-11); paulinoic (cis-13-eicosenoic) (20:1); behenic (dokozenoic) (22:0); dokozadienic acid (22:2); nervonic (cis-15-tetrakozenic) (24:1); jejkozadienic (20:2-ω6); jejkozatrienic (20:3-ω3), each of which concentration was ≤ 2%.

Устойчивость растений к окислительному стрессу

Трансгенные растения исследовали на устойчивость к окислительному стрессу, вызванному заражением патогенными бактериями *E. carotovora*. В качестве маркера стресса исследовали активность супероксиддисмутазы (СОД). Для сравнения эту активность измеряли в клетках незараженных растений.

Известно, что устойчивые к стрессу растения отличаются более низкой активностью СОД и меньшими окислительными повреждениями [32, 33]. Активность СОД в стрессовых условиях повышалась у растений обеих групп, как у контрольных, так и у трансгенных растений. Однако в листьях контрольных зараженных растений активность фермента возрастала в 2 раза, а у трансгенных зараженных растений в 1,12–1,49 раза (рис. 8).

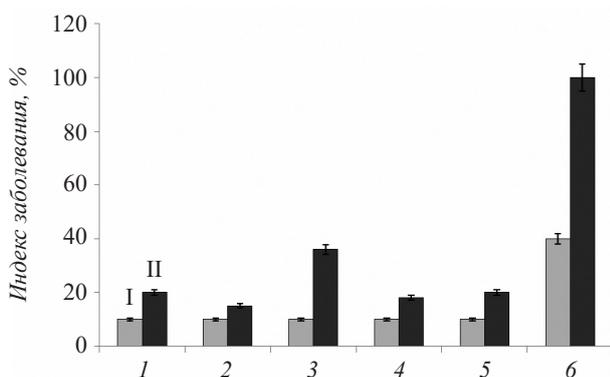


Рис. 7. Устойчивость линий трансгенных растений рыжика к *E. carotovora*. I – увеличение индекса заболевания с 0-го по 2-й день после инокуляции; II – увеличение повреждений с 0-го по 4-й день после инокуляции. 1–5 линии трансформантов, несущих ген *cecP1*; 6 – контроль (нетрансформированные растения)

Fig. 7. Resistance lines of transformed plants camelina to *E. carotovora*. I – the index increase disease from 0 to the 2nd day after inoculation; II – increasing damage from 0 to the 4th day after inoculation. 1–5 lines of transformed carrying *cecP1* gene; 6 – control (untransformed plants)

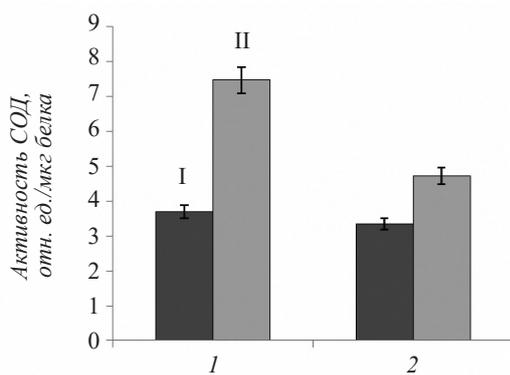


Рис. 8. Влияние биотического стресса (20 ч после контаминации), вызванного бактериями *E. carotovora*, на активность супероксиддисмутазы. 1 – контрольные растения, 2 – трансгенные растения (среднее значение из пяти линий). I – незараженные листья, II – зараженные листья

Fig. 8. Effect of biotic stress (20 h after contamination) caused by the bacteria *E. carotovora*, on the activity of superoxide dismutase. 1 – control plants; 2 – transgenic plants (average value from 5 lines). I – uninfected leaves, II – infected leaves

Предполагается, что относительно низкое содержание СОД в листьях инфицированных трансгенных растений по сравнению с активностью фермента в листьях контрольных зараженных растений, возможно, связано с синтезом антимикробного пептида цекропина Р1 и его защитным действием.

Участие синтетического гена цекропина Р1 в антистрессовой системе с усилением им различных адаптивных ответов в растениях было установлено ранее [34]. Также было установлено меньшее снижение скорости фотосинтеза у цекропин Р1-экспрессирующих растений рапса в условиях заражения и повышение устойчивости *cecP1*-растений к окислительному стрессу, вызванному действием параквата [34]. Отмечена повышенная устойчивость цекропин Р1-экспрессирующих маркерных растений *Camelina sativa* (L.) к солевому стрессу [9]. Экстракт из трансгенных *cecP1*-растений каланхоэ (*Kalanchoe pinnata*), добавленный в среду для культивирования, обеспечивал более интенсивный рост и усиливал ризогенез каллусов растений хрустальной травки (*Mesebryanthemum crystallinum*) [35]. Повышенная биологическая активность обнаружена в полученных экстрактах *cecP1*-растений *K. pinnata* в экспериментах не только на растениях, но и на животных по его ранозаживляющим и иммуномодулирующим свойствам [36–38]. Полученные результаты

указывают на повышенную биологическую активность экстракта растений, продуцирующих антимикробный пептид цекропин Р1. Результаты настоящей работы согласуются с данными работ, в которых показано, что конститутивная экспрессия антимикробных пептидов трансгена цекропина А в рисе [39] и *msrA3* в картофеле [40] вызывает повышение экспрессии ряда его собственных генов и увеличивает антимикробную и антиоксидантную защиту растений. У цекропин А-синтезирующих растений среди генов с повышенной экспрессией обнаружены гены защиты не только против фитопатогенов и окислительного стресса, но и гены фотосистем, способствующие повышению фотосинтетической активности растений, в условиях бактериального заражения (*pet* ген, ответственный за синтез медьсодержащего белка пластоцианина при переносе электронов, *atp* ген АТФ-синтетазы, *cab* ген, ответственный за светособирающие комплексы I и II). Трансгенные растения картофеля с геном АМР *msrA3* проявляли повышенную устойчивость к фитопатогену *Fusarium solani* и абиотическому стрессу, вызванному темнотой, поранением и высокой температурой.

В данной работе исследование жирнокислотного состава семян растений рыжика показало повышенное содержание линоленовой ненасыщенной жирной кислоты у трансгенных линий по сравнению с контрольными растениями. По литературным данным, увеличение степени ненасыщенности жирных кислот в процессе развития листа связывается с биогенезом хлоропластов, мембраны тилакоидов которых отличаются высокой (до 85–90%) степенью полиненасыщенности [41]. Увеличение содержания линоленовой кислоты позволяло трансгенным растениям томата с повышенной экспрессией гена $\omega 3$ денатурации жирных кислот поддерживать высокую скорость фотосинтеза, а также большую по сравнению с диким типом фотохимическую активность и препятствовало низкотемпературному фотоингибированию фотосистем I и II [42]. Известно, что линоленовая кислота, обладающая тремя двойными связями, является промежуточным продуктом деградации липидов растений. Усиление деградации и в результате увеличение содержания промежуточных продуктов катаболизма приводит к активации синтеза новых молекул биополимеров вместо разрушающихся. Некоторые производные линоленовой кислоты обладают свойствами гормонов, активаторов и ингибиторов различных процессов метаболизма, вследствие чего они могут стимулировать рост растений и оказывать влияние на

рост и морфогенез растений. Имеются данные об их фунгицидных, репеллентных, антиопухолевых свойствах. Поэтому изменение соотношения этих производных при стрессе может оказать влияние на процессы адаптации в клетках растений [43]. В описанных условиях повышение степени ненасыщенности жирных кислот происходило вследствие интеграции гена *sec P1* в геном рыжика.

В результате настоящей работы получены безмаркерные трансгенные растения рыжика, обладающие повышенной безопасностью за счет отсутствия в геноме растений значительной части чужеродной ДНК, кодирующей ген устойчивости к канамицину *nr1II*. В настоящее время интерес к рыжику заметно повысился в связи с перспективой его использования в современной биотехнологии. Было показано, что добавление рыжика в рацион животных, рыб и птиц до 10% повышает качество мяса, рыбы, яиц [44]. Это растение выделяет физиологически активные соединения, благотворно влияющие на соседние культурные растения, и обладает аллелопатическими свойствами по отношению к сорнякам, ингибируя их рост [45]. Площади посевов рыжика увеличиваются, так как спрос на его семена в мире постоянно растет. Масло этого растения используется не только как ценный пищевой продукт, но и в медицинских целях для лечения ран и ожогов. Оно также имеет высокий потенциал в качестве биотоплива, индустриального масла и смазок.

Получение и физиолого-биохимическое исследование различных биохимических отечественных сортов рыжика посевного является важной задачей современной биотехнологии. Полученные в настоящей работе растения рыжика с синтетическим геном антимикробного пептида цекропина P1 обладают повышенной безопасностью, устойчивостью к фитопатогенам, и их семена имеют повышенное содержание ценной α -линоленовой жирной кислоты. Возможно, экспрессия генов антимикробных пептидов может активировать интегральную антистрессовую защитную систему растений и вызывать изменения синтеза новых биологически активных веществ, в том числе и жирных кислот. Это наблюдение является предметом продолжающихся исследований.

Авторы выражают благодарность И.Л. Родионову за проведение синтеза пептида цекропина P1 и А.Г. Ламану за получение антител к цекропину P1 и KLN-SEC конъюгатов.

Работа выполнена по Госзаданию № 0101-2014-0046, № РК 01201352439 и при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ № 18-08-00752, № 16-04-00623.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильченко И. Т. Род 687. Рыжик – *Camelina Crantz*. В кн. Флора СССР. В 30 томах, гл. ред. акад. В. Л. Комаров; под ред. Н.А. Буш, Л.: Изд-во Академии Наук СССР, 1939, VIII, 596–602.
2. Putnam D.H., Budin J.T., Field L.A., Breene W.M. *Camelina*: a promising low-input oilseed. *New crops*. Eds J. Janick and J.E. Simon. N. Y.: Wiley, 1993, 314–322. <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1993/v2-314.html>
3. Zubr J. Oil-seed crop: *Camelina sativa*. *Ind Crop Prod.*, 1997, 6, 113–119. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(96\)00203-8](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(96)00203-8)
4. Liu Z., Brost J., Hutcheon C. et al. Transformation of oil-seed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediated floral dip and simple large-scale screening of transformants. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 2012, 48, 462–468. doi: 10.1007/s11627-012-9459-7
5. Motesinos E., Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007, 210, 1–11. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00683.x
6. Andersson M., Boman A., Boman H.G. *Ascaris* nematodes from pig and human make three antibacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2003, 60, 599–606. doi: 10.1007/s000180300051
7. Martemyanov K.A., Spirin A.S., 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. Захарченко Н.С., Рукавцова Е.Б., Гудков А.Т. и др. Экспрессия искусственного гена антимикробного пептида цекропина P1 повышает устойчивость растений картофеля к фитофторозу и белой гнили. *Доклады Академии наук*, 2007, 415(1), 129–131. doi: 10.1134/S0012496607040059
9. Захарченко Н.С., Каляева М.А., Бурьянов Я.И. Экспрессия гена цекропина P1 повышает устойчивость растений *Camelina sativa* (L.) к микробным фитопатогенам. *Генетика*, 2013, 49(5), 609–616. doi: 10.7868/S0016675813050147
10. Angenon G., Dillen W., van Montagu M. Antibiotic-resistance markers for plant transformation. In *Plant Molecular Biology Manual*. Eds Gelvin S.B., Schilperoort R.A. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1994, C1, 1–13.
11. Herrera-Estrella L., Leon P., Olsson O., Teeri T.H. Reporter genes for plants. *Plant molecular biology manual*. Eds. Gelvin S.B., Schilperoort R.A. Dordrecht: Kluwer, 1994, 1–32.
12. Schmit F., Oakeley E.J., Jost J.P. Antibiotics Induce Genome-Wide Hypermethylation in Cultured *Nicotiana tabacum* plants. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 1534–1540.
13. Yisraeli J., Szyf M. Gene Methylation patterns and expression. *DNA Methylation: Biochemistry and Biological Significance*. Razin A. et al. Eds., Berlin: Springer Verlag. 1984, 392 p.

14. Etchberger J.F., Hobert O. Vector-free DNA constructs improve transgene expression in *C.elegans*. *Nat. Methods*, 2008, 5, 3.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, 15, 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
16. Ooms G., Hooykaas J.J., Van veen R.J.M., et al. Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid.*, 1982, 7, 15–29.
17. Захарченко Н.С., Пиголева С.В., Юхманова А.А., Бурьянов Я.И. Использование гена антимикробного пептида цекропина P1 для получения безмаркерных трансгенных растений. *Генетика*, 2009, 45(8), 1061–1066. doi: 10.1134/S1022795409080067).
18. Sambrook J., Fritsch E.E., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. N. Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989, 1626 p.
19. Das P., Joshi N.C. Minor modifications in obtainable *Arabidopsis* floral dip method enhances transformation efficiency and production of homozygous transgenic lines harboring a single copy of transgene. *Advances in Bioscience Biotechnology*, 2011, 2, 59–67.
20. Наумов Н.А. Методы микологических и фитопатологических исследований. Л.: Сельхозиздат, 1937, 2–272.
21. Cljugh S.J., Bent A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium-mediated* transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 1998, 16, 735–743.
22. Jan P-S., Huang H-Y., Chen H-M. Expression of a synthesized gene encoding cationic peptide cecropin B in transgenic tomato plants protects against bacterial diseases. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 4, 769–775.
23. *Promega protocols and application guide*. Madison, USA, 1991, 262–265.
24. Родионова Л.Н., Заграничный В.Е., Родионов И.Л. и др. Полный твердофазный синтез γ -субъединицы фосфодиэстеразы cGMP сетчатки глаз быка и некоторые физико-химические свойства синтетического белка. *Биоорг. химия*, 1997, 12, 933–948.
25. Edwards K., Johnstone C., 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
26. Ohshima M., Mituhara 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
27. 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.
28. 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
29. Nariyoshi K., Hitoshi K., Takayuki A.B.E. Control of tomato bacterial wilt without disinfections using a new functional polymer that captures microbial cells alive on the surface and is highly biodegradable. *BioSci. Biotechnol. Biochem.*, 2005, 69, 326–333. doi: 10.1271/bbb.69.326
30. Beauchamp C.O., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 1971, 44, 276–287.
31. Griffiths M.J., van Hille R.P., Harrison S.T. Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae. *Lipids.*, 2010, 45, (11), 1053–1060. doi: 10.1007/s11745-010-3468-2 PMID:20820931
32. Mittova V., Tal M., Volokita M., Guy M. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon Pennellii*. *Plant Cell Envir.*, 2003, 26, 845–856. PubMed: 12803612
33. Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов Вл.В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений. *Физиология растений*. 2012, 59, 163–178. doi: 10.1134/S1021443712020057
34. Захарченко Н.С., Бурьянов Я.И., Лебедева А.А. и др. Физиологические особенности трансгенных растений рапса, экспрессирующих ген антимикробного пептида цекропина P1. *Физиология растений*, 2013, 60, 424–433. doi: 10.7868/S0015330313030160
35. Захарченко Н.С., Фурс О.В., Пиголева С.В. и др. Биологическая активность экстрактов цекропин P1-синтезирующих растений каланхоэ: перспективы для фармакологии. *Физиология растений*, 2018, 65(1), 94–100. doi: 10.7868/S0015330318010074
36. Lebedeva A.A., Zacharchenko N.S., Trubnikova E.V., et al. Bactericide, immunomodulating, and wound healing properties of transgenic *Kalanchoe pinnata* synergize with antimicrobial peptide cecropin P1 *in vivo*. *J. Immunology Res.*, 2017. doi: 10.1155/2017/4645701
37. Zakharchenko N.S., Belous A.S., Biryukova Y.K., et al. Immunomodulating and re-vascularizing activity of *Kalanchoe pinnata* synergize with fungicide activity of biogenic peptide cecropin P1. *J. Immunology Res.*, 2017. doi: 10.1155/2017/3940743
38. Белоус А.С., Шевелев А.В., Трубникова Е.В. и др. Лечение ран экстрактом листьев трансгенного каланхоэ с цекропином P1 (гистологическое исследование). *Вестник ПГМУ*, 2017, 1, 70–78.
39. Campo S., Manrique S., Garcia-Martinez J., San Segundo S. Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression. *Plant Biotechnol. J.*, 2008, 6, 585–608. doi: 10.1111/j.1467-7652.2008.00339.x

40. Goyal R.K., Hancock R.E.W., Mattoo A.K., Misra S. Expression of an engineered heterologous antimicrobial peptide in potato alters plant development and mitigates normal abiotic and biotic responses. *PLoS ONE*, 2013, 8(10), e77505. PubMed: PMC3797780
41. Murphy D.J. The molecular organisation of the photosynthetic membranes of higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1986, 864, 33–94.
42. Liu X-Y., Li B., Yang J-H., et al. Overexpression of tomato chloroplast omega-3 fatty acid desaturase gene alleviates the photoinhibition of photosystems 2 and 1 under chilling stress. *Photosynthetica*, 2008, 46(2), 185–192.
43. Tarchevsky I.A. The regulatory role of the degradation of biopolymers and lipids. *Russ. J. Plant Physiology*, 1992, 39, 1215–1223.
44. Cherian G., Campbell A., Parker T. Egg quality and lipid composition of eggs from hens fed *Camelina sativa*. *J. Appl. Poult. Res.*, 2009, 18, 143–150. doi: 10.3382/japr.2008-00070
45. Davis P.B. The invasion potential and competitive ability of *Camelina sativa* (L.) Crantz (camelina) in rangeland ecosystems. MSc thesis. Montana state University, Bozeman, MT, USA. [Online] Available: <http://etd.lid.montana.edu/etd/2010/davis/DavisP0510.pdf> [9 sept. 2010].

Obtaining and Analysis of Marker-free Oil Plants *Camelina sativa* (L.) Expressing Gene for Antimicrobial Peptide Cecropin P1

N.S. ZAKHARCHENKO^{1,*}, O.V. FURS¹, S.V. PIGOLEVA¹, O.V. DYACHENKO¹, A.V. ARIPOVSKI², Ya.I. BURYANOV¹ and T.V. SHEVCHUK¹

¹*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino Branch, 142290, Pushchino, Moskovskaya Oblast Russia*

²*State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279, Obolensk, Moskovskaya Oblast Russia*

*e-mail: znata_2008@mail.ru

Received September 25, 2018

Revised November 08, 2018

Accepted January 15, 2019

Abstract – The marker-free transgenic *Camelina sativa* (L.) plants carrying a synthetic gene for cecropin P1, an antimicrobial peptide, under the control of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter have been obtained and analyzed. The plants were transformed by the agrobacterial binary vector free of selection genes of antibiotic and herbicide resistance. Screening of the marker-free transformants was performed by measuring the antibacterial activity of cecropin P1 and by enzyme immunoassay. The obtained plants exhibited increased resistance to the infection by the *Erwinia carotovora* bacteria, *Fusarium graminearum* fungi, and to oxidative stress during infection. The analysis of the fatty acid composition of seed oil showed an increased amount of α -linolenic acid in the transgenic camelina lines as compared to unmodified plants. The obtained results indicate that the gene for cecropin P1 can be included in the integral antistress plant protective system.

Key words: *Camelina sativa*, cecropin P1, agrobacterium-mediated transformation, marker-free transgenic plants, fatty acid compositions, microbial phytopathogenes, oxidative stress, resistance, cecropin P1.

Acknowledgements – The work was financially supported by State job № 0101-2014-0046, № PK 01201352439 and with the partial financial support the Russian Fund for Basic Investigation, Grants № 18-08-00752, № 16-04-00623.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-45-57