

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.05.095>

УДК 57.084.1

**А.Ю. Бузіашвілі¹, Л.М. Чередніченко²,
С.В. Кропивко³, А.І. Ємець¹**

¹ ДУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України”, Київ

² Інститут картоплярства НААН України, Немешаєво

³ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

E-mail: buziashvili.an@gmail.com.

Лінії томатів, які експресують ген лактоферину людини, характеризуються стійкістю до фітофторозу

Представлено членом-кореспондентом НАН України А.І. Ємець

Трансгенні лінії томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.) сортів *Лазідний* та *Money Maker*, що експресують ген лактоферину людини (*hLf*), було отримано з використанням *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Для перенесення гена *hLf* застосовували плазмідний вектор *pBin35LF*, що містив цільовий ген під контролем конститутивного 35 S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (*CaMV35S*), а також ген неоміцинофосфотрансферази II (*nptII*), що забезпечує стійкість до канаміцину. Інтеграцію гена *hLf* в геном трансгенних ліній підтверджували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з використанням специфічних праймерів до *hLf*. Експресію білка лактоферину визначали за допомогою вестерн-блоту. Стійкість трансгенних ліній до *Phytophthora infestans* в умовах *in vitro* досліджували, використовуючи біотести дифузії в агар, зараження асептичних рослин та ізольованих листків. Встановлено підвищену стійкість до фітофторозу трансгенних ліній томатів порівняно з контрольними рослинами. Отримані результати свідчать про те, що експресія лактоферину сприяє підвищенню стійкості трансгенних рослин томатів до агресивних грибних фітонатогенів, таких як *P. infestans*.

Ключові слова: *Lycopersicon esculentum* Mill., ген лактоферину людини, стійкість, *Phytophthora infestans*.

Істотною проблемою, пов'язаною із вирощуванням томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.), є зараження фітофторозом — хворобою, яка може ушкоджувати 80—100 % їх врожаю [1]. Збудником фітофторозу є *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary — паразитичний ооміцет, який має відносно вузьке коло рослин-господарів, що належать до родини Solanaceae [2]. Серед методів контролю фітофторозу важливу роль відіграють хімічні методи захисту і створення стійких до нього сортів. Оскільки *P. infestans* є типовим ендегічним паразитом, для його знищення може бути ефективним застосування препаратів системної дії, що здатні

Цитування: Бузіашвілі А.Ю., Чередніченко Л.М., Кропивко С.В., Ємець А.І. Лінії томатів, які експресують ген лактоферину людини, характеризуються стійкістю до фітофторозу. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2020. № 5. С. 95—102. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.05.095>

проникати всередину рослини і діяти віддалено від місця нанесення препарату. Але з часом ефективність таких препаратів знижується внаслідок високої генетичної мінливості штамів фітофтори [3]. Більше того, агресивні фітопатогени, такі як *P. infestans*, здатні долати природні механізми захисту рослин. Тому генетична трансформація цінних сортів рослин генами нерослинного походження, які здатні забезпечити системну стійкість до патогенів, може бути дієвим засобом підвищення їхньої стійкості до хвороб. Прикладами таких генів, що застосовуються в генній інженерії рослин, є цекропіни із лускокрилих комах, дефензини, протегрени, темпорини із тропічних амфібій тощо [4, 5]. Однак деякі з них можуть бути токсичними для споживачів, як у випадку із цекропінами, що мають гемолітичну активність [4].

Перспективним та потенційно безпечним антимікробним білком природного походження є лактоферин людини. Лактоферин — це білок ссавців із родини трансферинів, який є компонентом неспецифічного природного імунітету з антибактеріальною, фунгіцидною, противірусною активністю. Цей білок має молекулярну масу 80 кДа і складається із двох субодиниць, у кожній є Fe-зв'язувальний центр [6]. Противірусна активність лактоферину обумовлена його здатністю зв'язуватися з глікопротеїнами вірусних частинок, що перешкоджає їх проникненню всередину клітини. Антибактеріальна і фунгіцидна активність лактоферину здійснюється за рахунок утворення пор у клітинній оболонці грибів та бактерій [7]. Крім того, одним із спільних механізмів захисту рослин і тварин від патогенних мікроорганізмів є зниження доступності іонів заліза для патогенів за рахунок їх депонування [8]. Лактоферин має спорідненість до Fe у десятки разів вищу, ніж трансферин, що робить його важливим компонентом природного імунітету [9]. Численні дослідження підтверджують ефективність лактоферину проти бактеріальних і грибних мікроорганізмів, патогенних для людини та рослин [10]. Отже, перенесення гена *hLf* в геном рослин може забезпечити їх стійкість до широкого спектра фітопатогенів [6]. У даній роботі підтверджено експресію лактоферину в трансгенних лініях томатів сортів Money Maker та Лагідний, отриманих нами в попередніх дослідженнях [11], і вперше виявлено, що експресія лактоферину сприяє підвищенню їх стійкості до фітофторозу.

Матеріали і методи. Трансгенні лінії рослин томатів з геном лактоферину людини (*hLf*) було отримано з використанням штаму *A. tumefaciens* ЕНА 105, що ніс бінарний вектор pBin35LF з геном *hLf* під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV35S) та геном неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*), як це описано нами раніше [11]. Лінії рослин з підтвердженою за допомогою ПЛР інтеграцією *hLf* в їх геном мікроклонально розмножували на середовищі МСТ для подальшого біохімічного аналізу та біотестів на стійкість до фітофторозу.

Для підтвердження експресії лактоферину людини в трансгенних лініях проводили вестерн-блотинг з використанням специфічних моноклональних антитіл до лактоферину. Ізолювання тотальної фракції білка з трансгенних та контрольних рослин і розділення в поліакриламідному гелі за денатуруючих умов здійснювали відповідно до методики, описаної в [12]. Розділені зразки переносили на нітроцелюлозну мембрану (RPN3032D, GE Healthcare, Mickleton, США) за допомогою апарата Bio-Rad Criterion™ Blotter (Bio-Rad, США) при 250 мА. Мембрану блокували прогятом 16 год при 4 °С в 5 %-му знежиреному сухому молоці в буфері TBS-T [12]. Інкубування мембрани з первинними кролячими

моноклональними антитілами проти лактоферину в розведенні 1 : 15000 (Merck Millipore, США) проводили протягом 1 год 30 хв та протягом 40 хв з вторинними антикролячими антитілами кози, кон'югованими з пероксидазою хрому (1 : 5000) (A4914, Sigma-Aldrich). Результати вестерн-блотингу візуалізували за допомогою апарата ChemiDoc™ XRS+ (BioRad, США) і аналізували з використанням програмного забезпечення ImageLab™ 2.0.

Стійкість трансгенних ліній томатів до *P. infestans* визначали в умовах *in vitro* за допомогою тестів дифузії в агар, зараження асептичних рослин та окремих листків. Ізолят *P. infestans* високовірулентної раси 1.2.3.4.5.6.6+0.7.8.9.10.11 хуз [13] був люб'язно наданий Інститутом картоплярства НАН України. Культуру фітофтори вирощували на середовищі PDA [14], доповненому 600 мг/л цефотаксиму для елімінації бактеріальної контамінації ізоляту.

Для визначення фунгістатичного впливу на *P. infestans* зразків трансгенних ліній томатів використовували лінії з підтвердженою експресією лактоферину. Фунгістатичний вплив визначали, використовуючи тест дифузії в агар, який проводили за методикою, описаною в [15] з деякими модифікаціями. Для цього в чашки Петрі ($d = 9$ см) вносили середовище PDA, у середовищі вирізали циліндричні лунки ($d = 5$ мм), в які додавали по 100 мкл зразків трансгенних і нетрансгенних рослин, після чого по центру чашки Петрі розміщували диск агару з міцелієм *P. infestans*. Чашки Петрі інкубували 10 діб при 28 °С і фіксували розмір зон затримки росту навколо лунок із соком рослин. Для визначення фунгістатичної активності листя та пагони трансгенних і контрольних ліній рослин гомогенізували. Тверду фракцію зразків осаджували при 13 400 об/хв за допомогою центрифуги Eppendorf Mini Spin, супернатант стерилізували крізь нітроцелюлозні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм і одразу використовували для аналізу.

Стійкість трансгенних ліній томатів до фітофторозу оцінювали в умовах *in vitro* за методикою, описаною в [13]. У кожному експерименті використовували по 10 трансгенних і контрольних рослин томатів. Для зараження рослин використовували інокулят із кількістю конідій $(3 \div 3,5) \cdot 10^4$ /мл. Конідії змивали стерильною дистильованою водою з культури *P. infestans*, яку вирощували протягом 10 діб у чашках Петрі на середовищі PDA. Для виходу зооспор суспензію конідій витримували 4 год при 4 °С, після чого на рослини наносили по 300 мкл інокуляту за допомогою ручного обприскувача. Облік ураження проводили через 8 діб після зараження, враховуючи типові симптоми фітофторозу, такі як в'янення стебла і листків, некротичні плями та поява міцелію на живильному середовищі й органах рослин. Стійкість трансгенних ліній визначали за 9-бальною шкалою, за якою 9 балам відповідає відсутність ураження, 8 – відсутність симптомів на стеблах та поодинокі плями на 5 % листків, 6–7 – відсутність симптомів на стеблах та ушкодження 5–25 % листків, 4–5 – ознаки в'янення на 25 % стебел та плями некрозу на 25–50 % листків, 2–3 – в'янення та некроз покривають 25–50 % поверхні стебел та 50–75 % листків, 1 балу – ушкодження більш ніж 75 % поверхні всієї рослини.

Визначення стійкості до фітофтори відокремлених листків трансгенних і контрольних рослин томатів виконували відповідно до методики, описаної в [13], з деякими змінами. Прості листочки розміром 1,5–2 см відокремлювали від живців рослин, вирощених у культурі *in vitro*, і розміщували у чашках Петрі на чотирьох шарах фільтрувального паперу, змоченого стерильною дистильованою водою. На адаксіальний бік листків наносили по

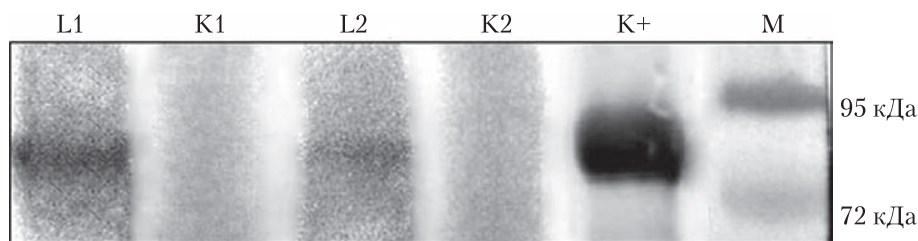


Рис. 1. Результати імунодетекції лактоферину в трансгенних рослинах томатів сортів Лагідний (L1, K1) та Money Maker (L2, K2): L1, L2 – проби з трансгенних ліній; K1, K2 – проби із контрольних ліній томатів; K+ – бичачий лактоферин; M – маркер молекулярної маси білків (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, ThermoFisher Scientific)

10 мкл інокуляту з кількістю конідій $(3 \div 3,5) \cdot 10^4$ /мл. Як контроль на листки наносили по 10 мкл стерильної дистильованої води. Частоту ураження відокремлених листків визначали через 8 діб як відношення кількості листків з вираженими некротичними плямами до загальної кількості заражених листків.

Кожний експеримент повторювали не менше трьох разів. Статистичну обробку результатів досліджень виконували за допомогою програмного пакета Microsoft Office 2010, достовірність результатів підтверджували, використовуючи *t*-критерій Стьюдента для 5 % рівня значущості.

Результати та обговорення. Для підтвердження експресії гена *hLf* в трансгенних лініях томатів сортів Money Maker та Лагідний, отриманих нами раніше [11], проводили вестерн-блотинг з використанням специфічних моноклональних антитіл проти лактоферину. У зразках з трансгенних ліній томатів і в позитивному контролі (бичачий лактоферин) був наявний сигнал, що відповідає молекулярній масі 80 кДа, у фракціях тотального білка з контрольних ліній томатів сигнал був відсутній (рис. 1). Таким чином, було підтверджено, що в трансгенних лініях відбувається експресія гена *hLf* і синтез білкового продукту цього гена. За допомогою денситометричного аналізу було оцінено концентрацію лактоферину в зразках з трансгенних ліній на рівні 0,04 % тотального розчинного білка (ТРБ) (8,3 мкг/мг тканини) для сорту Лагідний та 0,02 % ТРБ (4,8 мкг/мг) для сорту Money Maker. Такий рівень експресії лактоферину в трансгенних рослинах відповідає результатам, отриманим раніше в аналогічних дослідженнях [6].

Інгібіторний вплив зразків з трансгенних ліній томатів на ріст культури *P. infestans* визначали за допомогою тесту дифузії в агар (рис. 2). Показано, що зразки контрольних рослин істотно не впливають на ріст культури (див. рис. 2, а, в), тоді як зразки з трансгенних рослин мають значний фунгістатичний ефект (див. рис. 2, б, з), який виявлявся в затримці росту міцелію. Раніше було показано фунгістатичний ефект лактоферину на міцеліальні і дріжджові гриби, що спричинюють хвороби людини та рослин [10]. Також було виявлено здатність тотальних білкових фракцій рослин, які експресують лактоферин, затримувати ріст фітопатогенних грибів (*Phytophthora infestans*, *Fusarium graminearum*) [12, 15]. У даному дослідженні вперше показано, що зразки з трансгенних рослин томатів, що експресують лактоферин, здатні пригнічувати ріст міцелію *P. infestans*.

Стійкість трансгенних і контрольних ліній томатів до фітофторозу в умовах штучного зараження *in vitro* оцінювали за 9-бальною шкалою [13]. На 8-му добу після зараження

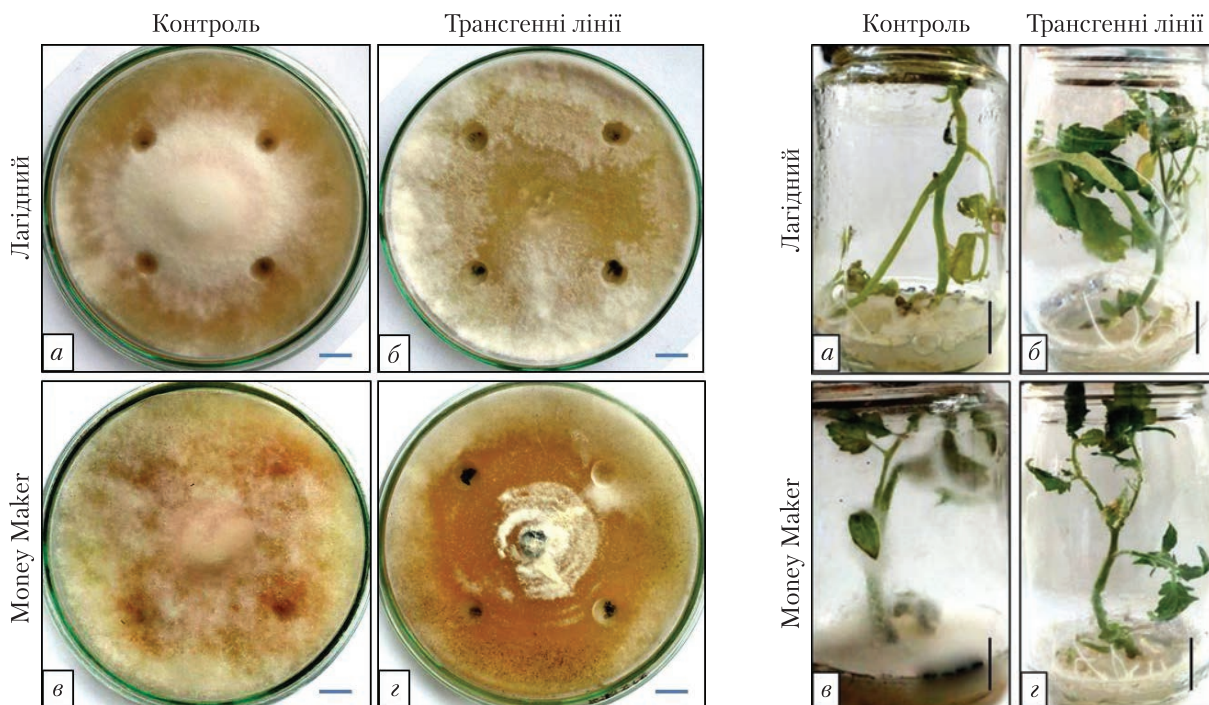


Рис. 2. Фунгістатичний ефект соку рослин томатів сортів Лагідний (а, б) і Money Maker (в, г), що експресують *hLf*, на культуру *P. infestans*: а, в – зразки з контрольних рослин; б, г – зразки трансгенних рослин. Масштабна лінія: 1 см

Рис. 3. Результати біотесту на чутливість томатів сортів Лагідний (а, б) та Money Maker (в, г) до зараження *P. infestans* в умовах *in vitro*: а, в – нетрансформовані лінії; б, г – трансгенні лінії, що експресують *hLf*. Масштабна лінія: 1,5 см

відмічено інтенсивне в'янення нетрансформованих рослин досліджуваних сортів томатів – більше ніж 75 % поверхні рослин було ушкоджено фітофторою. При цьому на стеблах і листках контрольних рослин томату сорту Money Maker спостерігався інтенсивний розвиток міцелію (рис. 3, в), тоді як на заражених рослинах томату сорту Лагідний в основному відмічали в'янення та некротизацію листків, а міцелій *P. infestans* розвивався лише на живильному середовищі (див. рис. 3, а). Отже, стійкість контрольних рослин обох сортів до *P. infestans* можна оцінити на рівні 1 бала. Результати дослідження чутливості до зараження фітофторою трансгенних рослин томатів сортів Лагідний та Money Maker були подібними: менш ніж 25 % листків було ушкоджено некротичними плямами, симптоми на стеблах були відсутні (див. рис. 3, б, г), що відповідає 7 балам стійкості за 9-бальною шкалою. Таким чином, резистентність до фітофторозу трансгенних рослин томатів, що експресують *hLf*, підвищилась з 1 до 7 балів порівняно з нетрансгенними.

Також було протестовано на стійкість до *P. infestans* відокремлених листків трансгенних і контрольних ліній томату в умовах *in vitro*. На 8-му добу після інокуляції на листках і контрольних, і трансгенних рослин спостерігали поодинокі плями некрозу. При цьому на листках, на які наносили стерильну дистильовану воду, симптоми зараження були відсутні. Частота прояву симптомів фітофторозу на листках контрольних рослин томату сорту Лагідний становила 69 %, Money Maker – 75 %; на листках трансгенних рослин – 43 і 55 % для

сортів Лагідний та Money Maker відповідно. Отже, результати зараження відокремлених листків, як і зараження цілих рослин вказують на підвищення стійкості трансгенних рослин томатів порівняно з нетрансформованими.

У даному дослідженні за допомогою вестерн-блот гібридизації підтверджено експресію гена *hLf* в отриманих раніше трансгенних лініях томату сортів Лагідний та Money Maker на рівні 0,04 і 0,02 % ТРБ відповідно. Також показано фунгістатичний вплив зразків трансгенних рослин, що експресують лактоферин, на культуру *P. infestans*. Крім того, результати зараження листків і асептичних рослин томатів в умовах *in vitro* вказують на підвищення стійкості до фітофторозу трансгенних рослин, що експресують лактоферин, порівняно з контрольними рослинами.

Дослідження виконано за фінансової підтримки проекту “Застосування гена лактоферину для створення стійких до фітопатогенів ліній рослин родини Solanaceae” цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України “Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства” (2015–2019 рр.) (номер державної реєстрації 0115U005021).

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Elansky S.N., Pobedinskaya M.A., Kokaeva L.Y., Statsyuk N.V., Dyakov Y.T. *Phytophthora infestans* populations from the European part of Russia: genotypic structure and metalaxyl resistance. *J. Plant. Pathol.* 2015. **97**, № 3. P. 449–456. <https://doi.org/10.4454/JPP.V97I3.020>
2. Tomato diseases identification, biology and control: A color handbook. 2 ed. Blancard D., Laterrot H., Marchoux G., Candresse Th. (Eds.). London: Manson Publ. Ltd, 2012. 688 p.
3. Федорчук С.В. Вплив хімічних препаратів, біологічних і регуляторів росту на розвиток збудників *Alternaria solani* та *Phytophthora infestans*. *Таврійський наук. вісн.* 2019. **98**. С. 128–133.
4. Jung Y.-J., Kang K.-K. Application of antimicrobial peptides for disease control in plants. *Plant Breed. Biotech.* 2014. **2**, №1. P. 1–13. <https://doi.org/10.9787/PBB.2014.2.1.001>
5. Pribylova R., Pavlik I., Bartos M. Genetically modified potato plants in nutrition and prevention of diseases in humans and animals: a review. *Vet. Med.-Czech.* 2006. **51**, № 5. P. 212–223. <https://doi.org/10.17221/5540-VETMED>
6. Yemets A.I., Tanasienko I.V., Krasylenko Yu.A., Blume Ya.B. Plant-based biopharming of recombinant human lactoferrin. *Cell Biol. Int.* 2014. **38**, № 9. P. 989–1002. <https://doi.org/10.1002/cbin.10304>
7. Muñoz A., Marcos J.F. Activity and mode of action against fungal phytopathogens of bovine lactoferrin-derived peptides. *J. Appl. Microbiol.* 2006. **101**, № 6. P. 1199–1207. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03089.x>
8. van Baarlen P., van Belkum A., Summerbell R.C., Crous P.W., Thomma B.P. Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiol. Rev.* 2007. **31**, № 3. P. 239–277. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00065.x>
9. Adlerova L., Bartoskova A., Faldyna M. Lactoferrin: a review. *Vet. Med.-Czech.* 2008. **53**, № 9. P. 457–468. <https://doi.org/10.17221/1978-VETMED>
10. Fernandes K.E., Carter D.A. The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens. *Front. Microbiol.* 2017. **8**. Art. 2. 10 p. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00002>
11. Бузіашвілі А.Ю., Ємець А.І. Отримання ліній рослин картоплі та томатів з геном лактоферину людини. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2018. № 10. С. 88–94. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.10.088>
12. Бузіашвілі А., Чередніченко Л., Кропивко С., Блюм Я., Ємець А. Получение трансгенных растений картофеля, экспрессирующих ген лактоферрина человека, и анализ их устойчивости к фитопатогенам. *Цитология и генетика.* 2020. **54**, № 3. С. 3–15.

13. Методика проведення фітопатологічних досліджень за штучного зараження рослин.: Ткачик С.О. (ред.). Київ: Нілан-ЛТД, 2014. 76 р.
14. Tournas V., Stack M. E., Mislivec P.B., Koch H.A., Bandler R. Chapter 18. yeasts, molds, and mycotoxins. *Bacteriological Analytical Manual*. 8th ed. Revision A. AOAC International, 1998. URL: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-yeasts-molds-and-mycotoxins>
15. Han J., Lakshman D.K., Galvez L.C., Mitra S., Baenziger P.S., Mitra A. Transgenic expression of lactoferrin impacts enhanced resistance to head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum*. *BMC Plant Biol.* 2012. 12, № 1. Art. 33. 9 p. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-33>

Надійшло до редакції 14.02.2020

REFERENCES

1. Elansky, S. N., Pobedinskaya, M. A., Kokaeva, L. Y., Statsyuk, N. V. & Dyakov, Y. T. (2015). *Phytophthora infestans* populations from the European part of Russia: genotypic structure and metalaxyl resistance. *J. Plant Pathol.*, 97, No. 3, pp. 449-456. <https://doi.org/10.4454/JPP.V97I3.020>
2. Blancard, D., Laterrot, H., Marchoux, G. & Candresse, Th. (Eds.). (2012). *Tomato diseases identification, biology and control: A color handbook*. 2 ed. London: Manson Publ. Ltd.
3. Fedorchuk, S. V. (2019). The impact of growth regulators, chemical and biological agents on the development of *Alternaria solani* and *Phytophthora infestans*. *Tavriiskyi naukovyi visnyk*, 98, pp. 128-133 (in Ukrainian).
4. Jung, Y.-J., Kang K.-K. (2014). Application of antimicrobial peptides for disease control in plants. *Plant Breed. Biotech.*, 2, No. 1, pp. 1-13. <https://doi.org/10.9787/PBB.2014.2.1.001>
5. Pribylova, R., Pavlik, I. & Bartos, M. (2006). Genetically modified potato plants in nutrition and prevention of diseases in humans and animals: a review. *Vet. Med.-Czech.*, 51, No. 5, pp. 212-223. <https://doi.org/10.17221/5540-VETMED>
6. Yemets, A. I., Tanasienko, I. V., Krasylenko, Yu. A. & Blume, Ya. B. (2014). Plant-based biopharming of recombinant human lactoferrin. *Cell Biol. Int.*, 38, No. 9, pp. 989-1002. <https://doi.org/10.1002/cbin.10304>
7. Muñoz, A., Marcos, J. E. (2006). Activity and mode of action against fungal phytopathogens of bovine lactoferricin-derived peptides. *J. Appl. Microbiol.*, 101, No. 6, pp. 1199-1207. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03089.x>
8. van Baarlen, P., van Belkum, A., Summerbell, R.C., Crous, P.W. & Thomma, B.P. (2007). Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiol. Rev.*, 31, No. 3, pp. 239-277. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00065.x>
9. Adlerova, L., Bartoskova, A. & Faldyna, M. (2008). Lactoferrin: a review. *Vet. Med.-Czech.*, 53, No. 9, pp. 457-468. <https://doi.org/10.17221/1978-VETMED>
10. Fernandes, K. E. & Carter, D. A. (2017). The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens. *Front Microbiol.*, 8, Art. 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00002>
11. Buziashvili, A.Yu. & Yemets, A.I. (2018). The obtaining of tomato and potato plants with human lactoferrin gene *hLf*. *Dopov. Nac. acad. nauk Ukr.*, No. 10, pp. 88-94. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.10.088> (in Ukrainian).
12. Buziashvili, A., Cherednichenko, L., Kropyvko, S., Blume, Y. & Yemets, A. (2020). Obtaining of transgenic potato plants expressing human lactoferrin gene and analysis of their resistance to phytopathogens. *Cytol. Genet.*, 54, No. 3, pp. 3-15. (in Russian)
13. Tkachyk, S. O. (Ed.) (2014). *Methods of phytopathological researches with artificial infection of plants*. Kyiv: Nylan-LTD (in Ukrainian).
14. Tournas, V., Stack, M. E., Mislivec, P. B., Koch, H. A. & Bandler, R. (1998). Chapter 18. Yeasts, molds, and mycotoxins. In *Bacteriological Analytical Manual*. 8th ed. Revision A. AOAC International. Retrieved from <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-yeasts-molds-and-mycotoxins>
15. Han, J., Lakshman, D. K., Galvez, L. C., Mitra, S., Baenziger, P. S. & Mitra, A. (2012). Transgenic expression of lactoferrin impacts enhanced resistance to head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum*. *BMC Plant Biol.*, 12, No. 1, Art. 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-33>

Received 14.02.2020

А.Ю. Бузиашвили¹, Л.М. Чередниченко²,
С.В. Кропивко³, А.И. Емец¹

¹ ГУ “Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины”, Киев

² Институт картофелеводства НААН Украины, Немешаево

³ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

E-mail: buziashvili.an@gmail.com

ЛИНИИ ТОМАТОВ, КОТОРЫЕ ЭКСПРЕССИРУЮТ ГЕН ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА, ХАРАКТЕРИЗУЮТСЯ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ФИТОФТОРОЗУ

Трансгенные линии томатов (*Lycopersicon esculentum* Mill.) сортов Лагидный и Money Maker, которые экспрессируют ген лактоферрина человека (*hLf*), были получены с помощью *Agrobacterium*-опосредованной трансформации. Для переноса гена *hLf* использовали плазмидный вектор pBin35LF, который содержал целевой ген под контролем конститутивного 35 S промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV35S), а также ген неомифосфотрансферазы II (*nptII*), который обеспечивает устойчивость к канамицину. Интеграцию гена *hLf* в геном трансгенных линий подтверждали с помощью полимеразной цепной реакции с использованием специфичных праймеров к *hLf*. Экспрессию белка лактоферрина определяли с помощью вестерн-блот анализа. Устойчивость трансгенных линий к *Phytophthora infestans* в условиях *in vitro* исследовали, используя биотесты диффузии в агар, заражения асептических растений и изолированных листьев. Установлена повышенная устойчивость к фитофторозу трансгенных линий томатов в сравнении с контрольными растениями. Полученные результаты свидетельствуют о том, что экспрессия лактоферрина способствует повышению устойчивости трансгенных растений томатов к агрессивным грибным фитопатогенам, таким как *P. infestans*.

Ключевые слова: *Lycopersicon esculentum* Mill., ген лактоферрина человека, устойчивость, *Phytophthora infestans*.

А.Ю. Бузиашвили¹, Л.М. Чередниченко²,
С.В. Кропивко³, А.И. Емец¹

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics of the NAS of Ukraine, Kyiv

² Institute of Potato of the NAAS of Ukraine, Nemishaeve

³ Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, Kyiv

E-mail: buziashvili.an@gmail.com.

TOMATO LINES EXPRESSING HUMAN LACTOFERRIN GENE ARE CHARACTERIZED BY ENHANCED RESISTANCE TO LATE BLIGHT

Transgenic lines of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) of cultivars Lahidny and Money Maker expressing human lactoferrin gene (*hLf*) were obtained with the use of *Agrobacterium*-mediated transformation. For the transfer of *hLf* gene, the pBin35LF plasmid vector was used with the gene-of-interest under control of 35 S promoter of cauliflower mosaic virus (CaMV35S) and the gene of neomycinophosphotransferase II (*nptII*) conferring the resistance to kanamycin. Integration of *hLf* into genome of transgenic lines was confirmed with the use of PCR with specific primers to *hLf*. Expression of lactoferrin protein was detected with the use of Western blot analysis. The resistance of transgenic lines to *Phytophthora infestans* was studied *in vitro* with the use of the disk diffusion assay, infection of aseptically plants, and detached leaves. The enhanced resistance to late blight of transgenic tomato lines was shown as compared to control lines. The obtained results demonstrate that the expression of lactoferrin improve the resistance of transgenic tomato plants to aggressive fungal pathogens such as *P. infestans*.

Keywords: *Lycopersicon esculentum* Mill., human lactoferrin gene, resistance, *Phytophthora infestans*.