

УДК 57.576

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА, И АНАЛИЗ ИХ УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОПАТОГЕНАМ

А. БУЗИАШВИЛИ ^{1*}, Л. ЧЕРЕДНИЧЕНКО ², С. КРОПИВКО ³, Я.Б. БЛЮМ ¹, А. ЕМЕЦ ^{1*}

¹ Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины, Украина, 04123, Киев, ул. Осиповского 2а,

² Институт картофелеводства Национальной академии аграрных наук Украины, Украина, 07853, Киевская область, Немешаево, ул. Чкалова 22

³ Институт молекулярной биологии и генетики Национальной академии наук Украины, Украина, 03860, Киев, ул. акад. Заболотного 150

E-mail: buziasvili.an@gmail.com, yemets.alla@nas.gov.ua

С помощью *Agrobacterium*-опосредованной трансформации осуществлен перенос гена лактоферрина человека (*hLf*) в геном ряда сортов картофеля (*Solanum tuberosum*) украинской селекции (Вернисаж, Левада, Свитанок Киевский и Зарево). Для этого использовали плазмидный вектор *pBIN35LF*, несущий ген *hLf* под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты и терминатора октопинсинтазы, а также селективный маркерный ген неомycinфосфотрансферазы II (*nptII*), обеспечивающий устойчивость к канамицину. В результате селекции были отобраны 44 линии сорта Вернисаж, 26 линий сорта Левада, 25 линий сорта Свитанок Киевский и 16 линий сорта Зарево, устойчивых к 100 мг/л канамицину. Интеграция целевого гена в геном картофеля была подтверждена с помощью полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров к гену *hLf*. Идентификацию рекомбинатного лактоферрина в тканях трансгенных линий проводили с помощью Вестерн блоттинга с использованием специфических моноклональных антител к лактоферрину. Отобранные трансгенные линии картофеля были протестированы на устойчивость к бактериальным и грибному фитопатогенам. С помощью теста диффузии в агар установлено, что сок трансгенных линий картофеля обладает антибактериальным эффектом по отношению к таким фитопатогенным бактериям, как *Ralstonia solanacearum* (возбудитель бактериальной гнили картофеля) и *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* (возбудитель кольцевой гнили картофеля).

Устойчивость трансгенных растений картофеля к фитопатогену изучали путем заражения растений *in vitro* изолятом *Phytophthora infestans*. В результате была установлена повышенная устойчивость в проанализированных трансгенных линиях картофеля к *P. infestans* по сравнению с контролем. Таким образом, полученные данные показывают, что перенос гена *hLf* в растения картофеля повышает их устойчивость к бактериальным и грибным патогенам.

Ключевые слова: ген лактоферрина человека, генетическая трансформация, *Solanum tuberosum*, *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*, *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora infestans*.

Введение. Среди выращиваемых овощных культур картофель занимает одно из основных положений на мировом рынке, при этом Украина является одной из ведущих стран-производителей этой культуры. В частности, в 2011–2015 гг. среднегодовой урожай картофеля в Украине превышал 20 млн. т, данный показатель был выше только в Китае, Индии и России [1], в то время как в 2017 г. валовый урожай картофеля в наибольших странах-экспортерах Европы составлял: в Германии – 11,7 млн. т, во Франции – 8,5 млн. т и 9 млн. т в Польше [2]. Известно, что выращивание картофеля связано с высоким риском заражения фитопатогенами. Высокой подверженности заболеваниям картофеля способствует густая плот-

© А. БУЗИАШВИЛИ, Л. ЧЕРЕДНИЧЕНКО,
С. КРОПИВКО, Я.Б. БЛЮМ, А. ЕМЕЦ, 2020

ность посадки и генетическая однородность данной культуры, которую размножают преимущественно вегетативным способом. Обратной стороной селекции на улучшение пищевых качеств картофеля является его повышенная чувствительность к фитопатогенам. Поскольку картофель наряду с другими сельскохозяйственными культурами наиболее подвержен заражению бактериальными и грибными патогенами, широко практикуются методы химической защиты данных культур с использованием пестицидов [3, 4]. Перечисленные факторы провоцируют высокие темпы усиления агрессивности фитопатогенов путем формирования их устойчивости к пестицидам. Лучший способ упреждения угрозы заражения картофеля фитопатогенами — получение новых устойчивых к фитопатогенам его линий и сортов методами традиционной селекции или с помощью биотехнологических подходов. Поэтому на сегодняшний день актуальной задачей является создание сортов картофеля нового поколения, сочетающих высокую урожайность, адаптивность к климатическим условиям и комплексную устойчивость к болезням [3–5].

К наиболее опасным бактериальным патогенам картофеля относятся *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* и *Ralstonia solanacearum*, повреждающие в Украине до 25–30 % урожая этой культуры, вызывая такие заболевания, как кольцевая и коричневая гниль [6–9]. Кроме бактериальных заболеваний, картофель подвержен заражению грибными патогенами, среди которых наиболее распространенным является *Phytophthora infestans*, вызывающим фитофтороз. К примеру, в период с 2014 по 2017 гг., более 91,5 % площадей, на которых выращивался картофель в Украине, были повреждены такими грибными заболеваниями, как фитофтороз и альтернариоз [6, 10].

На сегодняшний день использование методов генной инженерии позволяет переносить определенные целевые гены в растительный геном, в частности, и в геном картофеля, для повышения его устойчивости к фитопатогенам [11–14]. Один из таких генов-интереса — ген лактоферрина [15]. Лактоферрин — это гликопротеин из семейства трансферринов, содержащийся в секреторных жидкостях млекопитающих — молоке, слюне, желчи, слезах и др.

Этот белок способен связывать и переносить ионы железа; кроме того, он является частью неспецифического природного иммунитета человека. Благодаря способности связываться с липополисахаридами клеточной стенки бактерий и грибов лактоферрина характерна антибактериальная и фунгицидная активность; также была показана антивирусная, антипротозойная и противораковая активность лактоферрина *in vitro* [15]. Ранее была продемонстрирована способность лактоферрина повышать устойчивость растений к некоторым фитопатогенам при его переносе и экспрессии в трансгенных линиях некоторых видов растений [15].

Поэтому целью данной работы был перенос гена лактоферрина человека *hLf* в геном растений картофеля с помощью метода *Agrobacterium*-опосредованной трансформации и изучение устойчивости полученных трансгенных линий к бактериальным (*C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *R. solanacearum*) и грибному *P. infestans* (Mont.) de Bary) фитопатогенам.

Материалы и методы. *Растительный материал.* В качестве исходного материала для генетической трансформации использовали сорта картофеля Вернисаж, Левада, Свитанок Киевский и Зарево, созданные и любезно предоставленные Институтом картофелеводства Национальной академии аграрных наук Украины. Для микроклонального размножения картофеля использовали питательную среду МСК, содержащей микро- и макросоли Мурашигескуга (МС) (4,3 г/л) [16], 10 г/л сахарозы, 0,8 мг/л пиридоксина, 2 мг/л тиамина, 10 г/л агара, рН 5,7.

Agrobacterium-опосредованная трансформация картофеля геном лактоферрина человека. Трансформацию растений картофеля проводили в соответствии с методом, описанным в работе [17] с некоторыми модификациями. Для этого использовали плазмидный вектор pBIN35LF, несущий ген лактоферрина человека *hLf* под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (P35S) и терминатора октопинсинтазы, а также селективный маркерный ген неомизинфосфотрансферазы II (*nptII*), обеспечивающий устойчивость к канамицину. Данная плаزمид была стабильно интегрирована в супервирулентный штамм *A. tumefaciens* ЕНА 105 [17].

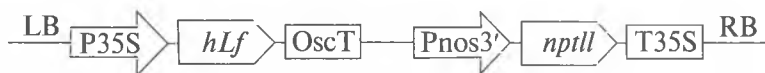


Рис. 1. Структура фрагмента Т-ДНК плазмидного вектора pBin35LF LB и RB — левая и правая границы Т-ДНК, *OscT* — терминатор октопинсинтазы, *hLf* — ген лактоферрина человека, *P35S* — 35S промотор вируса мозаики цветной капусты, *Pnos* — промотор нопалинсинтазы, *nptII* — ген неомицинфосфотрансферазы, *T35S* — 35S терминатор вируса мозаики цветной капусты

В качестве эксплантов для трансформации использовали междоузлия побегов, содержащие 1–2 боковые почки. В каждом эксперименте использовали по 30–60 эксплантов. Клетки агробактерии наращивали в течение 16 ч при 28 °С на орбитальном шейкере ELMi S-3M A10 (ELMi Ltd., Латвия) (скорость вращения 130 об/мин) в 20 мл среды LB [18] с добавлением 100 мг/л канамицина и 50 мг/л рифампицина. Инокуляцию эксплантов суспензией агробактерии с оптической плотностью $OD_{600} = 600$ проводили в течение 30 мин в присутствии 0,15 мМ ацетосирингона. Далее экспланты просушивали в течение 5 мин на стерильной фильтровальной бумаге и помещали на чашки Петри со средой МСК-К (в состав которой входили 4,3 г/л микро- и макросолей МС [16], 30 г/л сахарозы, 100 мг/л мио-инозитола, 0,5 мг/л пиридоксина, 0,5 мг/л никотиновой кислоты, 1 мг/л тиамина, 2 мг/л глицина, 0,5 мг/л БАП, 0,25 мг/л 2,4-Д, 8 г/л агара, pH 5,7) для кокультивирования с агробактерией в течение 16 ч. После кокультивирования экспланты переносили на среду МСК-С1, состав который был идентичен среде МСК-К, дополненной 100 мг/л канамицина (для селекции трансгенных линий) и 600 мг/л цефотаксима (для элиминации бактериальных клеток в среде). После 1-го месяца селекции на среде МСК-С1 регенерировавшие растения высотой 2–3 см с развитыми листьями, стеблями и корнями отделяли от эксплантов и переносили в 20 см пробирки со средой МСК-С2, состав которой идентичен среде МСК-К, но с добавлением 100 мг/л канамицина и 600 мг/л цефотаксима. Селекцию на среде МСК-С2 проводили в течение 2-х месяцев для обеспечения стабильной интеграции гена *hLf* и исключения нетрансгенных линий. Частоту трансформации картофеля определяли как соотношение количества эксплантов, на которых регенерировали побеги в условиях селективного давле-

ния, к общему количеству эксплантов, взятых для трансформации, умноженное на 100 % [19]. После этого устойчивые к канамицину побеги переносили на среду МСК-Р (на основе среды МСК с добавлением 600 мг/л цефотаксима) и спустя 1 месяц культивирования проводили молекулярно-генетический (ПЦР) и биохимический (Вестерн блоттинг гибридная интеграция) анализы для подтверждения стабильной интеграции гена *hLf* в геноме отобранных линий и идентификации лактоферрина в них, как результат экспрессии перенесенного гена *hLf*. Проанализированные трансгенные растения далее высаживали в горшки диаметром 15 см в почву для адаптации в условиях *in vivo* в теплице.

ПЦР-анализ трансгенных растений картофеля. Геномную ДНК из 200–300 мг ткани (побегов и листьев) трансгенных растений выделяли с использованием цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ метод) [20]. Наличие гена лактоферрина в трансгенных линиях определяли путем амплификации фрагмента размером 734 п.о. с использованием специфических праймеров к гену *hLf*: GLF (5'-TGTCTTCCTCGTCCTGCTGTTCC-3') и GLR (5'-CATACTCGTCCCTTTCAGCCTCG-3') [21]. В состав реакционной смеси объемом 25 мкл входили 100 нг геномной ДНК, 5×буфер для *Taq* полимеразы, буфер, содержащий Mg^{2+} (Helicon), 0,2 мкМ каждого праймера, 200 мкМ каждого дНТФ, и 0,5 U *Taq* полимеразы («Fermentas», Lithuania). ПЦР проводили с использованием амплификатора PCR Applied Biosystem 2720 Thermocycler (США) при следующих условиях: первичная денатурация 3 мин при 94 °С; 40 циклов по 30 с при 94 °С, 30 с при 62 °С, 1 мин при 72 °С; окончательный синтез 7 мин при 72 °С [17]. Продукты реакции разделяли в 1%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Эффективность трансформации по результатам ПЦР анализа определяли как соотноше-

ние количества ПЦР-положительных трансгенных растений к общему количеству канамидин-устойчивых растений, умноженное на 100 % [22].

Вестерн блоттинг. Тотальную фракцию белка из надземных тканей (массой 1 г) ПЦР-положительных растений получали согласно методики [23] с некоторыми модификациями. Растительные ткани гомогенизировали в жидком азоте с добавлением 100 мкл буфера для экстракции, содержащем 50 мМ Трис-НСl (pH 6,5), 1 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl, 0,1 % Triton X-100 [24]. Для защиты белков от протеолитической деградации в буфер добавляли смесь ингибиторов протеаз (P9599, «Sigma-Aldrich», США) в расчете 10 мкл/мл. Гомогенат осаждали при 16 000 об/мин в течение 30 мин при +4 °C на центрифуге Eppendorf centrifuge 5417R (ФРГ) и отбирали супернатант. Количество белка в образцах измеряли с помощью метода Бредфорда [25]. Пробы, содержащие по 100 мкг тотального белка, а также проба, содержащая 100 нг бычьего лактоферрина (L9507, «Sigma-Aldrich», США) (положительный контроль), разделяли в 12%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях [26] и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (RPN3032D, «GE Healthcare, Mickleton», США) при 250 мА. После переноса мембрану блокировали в течение ночи в 5%-ном обезжиренном сухом молоке в буфере TBS-T (20 мМ Трис-НСl, 15 мМ NaCl, 0,1 % Triton X-100, pH 8) при 4 °C. Затем мембрану инкубировали с первичными кроличьими антителами против лактоферрина (1 : 15000) («Merck Millipore», США) и вторичными антикроличьими козьими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (1 : 5000) (A4914, «Sigma-Aldrich», США). Хемилюминесценцию фиксировали после обработки мембраны ECL буфером (0,1М Трис-НСl, pH 8,5, 250 мМ люминола, 90 мМ кумаровой кислоты, 30 % H₂O₂) для экспозиции в течение 1 мин с использованием аппарата ChemiDoc™ XRS+ («BioRad», США). Результаты Вестерн блоттинга анализировали с помощью программного обеспечения ImageLab™ 2.0.

Биотесты на устойчивость трансгенных растений картофеля к фитопатогенам. Тест диффузии в агар. Из свежих тканей (стеблей и лис-

тьев) трансгенных линий картофеля получали сок путем их измельчения, прессования и фильтрования. Полученные образцы дополнительно центрифугировали 10 мин при 14 500 об/мин на центрифуге Eppendorf MiniSpin (ФРГ), а также стерилизовали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Изучение ингибиторного влияния образцов сока [27], полученных из трансгенных растений, на рост бактерий *R. solanacearum* (возбудителя бактериальной гнили картофеля) и *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (возбудителя кольцевой гнили картофеля) проводили с помощью метода диффузии в агар, описаного ранее [28]. Для этого использовали штаммы *R. solanacearum* ATCC 11696 [29] и *C. michiganensis* Ac-1996 из Украинской коллекции микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии Национальной академии наук Украины [30]. Тест диффузии в агар проводили путем внесения 100 мкл выращенных в среде LB культур исследуемых штаммов бактерий (с оптической плотностью OD₆₀₀ = 0,1) в чашки Петри диаметром 9 см со средой PDA [31]. Бактериальную суспензию распределяли с помощью стерильного стеклянного шпателя по поверхности среды, после чего помещали диски стерильной фильтровальной бумаги диаметром 5 мм, и на них наносили по 20 мкл сока трансгенных растений, а также сок контрольных растений (негативный контроль). Далее чашки Петри инкубировали в течение 16 ч при 28 °C, после чего фиксировали наличие зон задержки роста вокруг дисков фильтровальной бумаги с соответствующими образцами.

Оценка устойчивости к фитофторозу картофеля методом заражения *in vitro*. Для оценки устойчивости картофеля к фитофторозу *in vitro* использовали изолят *P. infestans*, любезно предоставленный Институтом картофелеводства Национальной академии аграрных наук Украины. Культуру *P. infestans* выращивали на среде PDA [31], дополненной 600 мг/л цефотаксима для элиминации возможной бактериальной контаминации изолята. Для определения уровня устойчивости трансгенных линий картофеля к фитофторозу, трансгенные и контрольные растения высотой 10 см опрыскивали суспензией конидий (300 мкл) в концентрации $3,5 \times 10^4$ /мл.

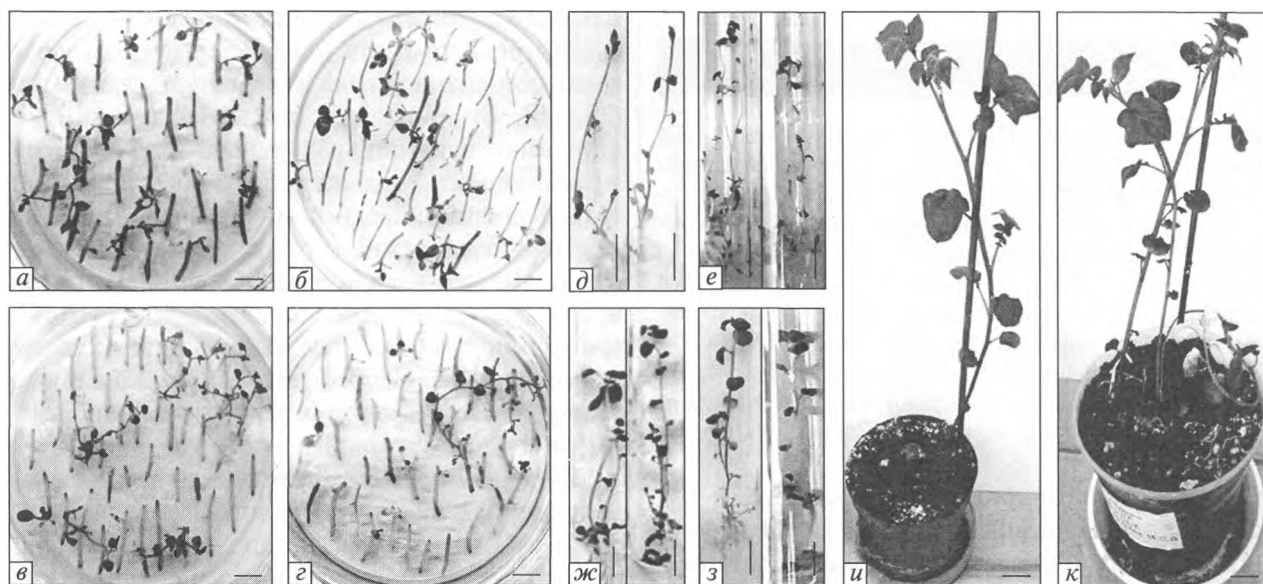


Рис. 2. Результаты *Agrobacterium*-опосредованной трансформации эксплантов картофеля геном *hLf*: а–г — экспланты картофеля сортов Вернисаж, Свитанок Киевский, Левада и Зарево, соответственно, на среде МСК–С1 через 1 мес после трансформации; д–з — трансформированные побеги картофеля сортов Вернисаж, Свитанок Киевский, Левада и Зарево на среде МСК–С2 спустя 3 мес после трансформации; и — контрольное (нетрансгенное) растение картофеля сорта Зарево; к — трансгенное растение картофеля сорта Зарево *in vivo*. Масштаб: а–з — 1,5 см; и, к — 3 см

Для этого конидии смывали стерильной дистиллированной водой с чашек Петри, в которых находилась 10-дневная культура *P. infestans*, подсчет их количества определяли с помощью камеры Горяева. Для выхода зооспор суспензию выдерживали 4 ч при 4 °С. Результаты заражения наблюдали на 1-й, 4-й и 8-й дни эксперимента, регистрируя такие симптомы, как увядание, наличие пятен на листьях и стеблях, формирование мицелия. Устойчивость растений оценивали по 9-бальной шкале [32]: 8–9 — отсутствие симптомов на стеблях и повреждение менее 5 % поверхности листьев; 6–7 — отсутствие симптомов на стеблях и повреждение 5–25 % листьев; 4–5 — увядание 25 % стеблей и повреждение 25–50 % листьев; 2–3 — увядание 25–50 % стеблей и 50–75 % листьев; 1 — повреждено более 75 % всего растения.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты повторяли не менее трех раз, полученные данные обрабатывали, используя программный пакет Microsoft Office 2010.

Результаты и обсуждение. Трансформация картофеля. С целью повышения устойчивости картофеля к фитопатогенным бактериям и гри-

бам нами был осуществлен перенос гена лактоферрина человека *hLf* в геном сортов картофеля Вернисаж, Левада, Свитанок Киевский и Зарево с помощью метода *Agrobacterium*-опосредованной трансформации. Сорта картофеля Вернисаж, Левада, Свитанок Киевский и Зарево — известные украинские сорта картофеля, обладающие определенной устойчивостью к некоторым заболеваниям и вредителям [17, 33–35]. Эти сорта пригодны как для технического (Вернисаж, Левада), так и столового употребления (Свитанок Киевский, Зарево) [17, 36].

После 2 недель культивирования и селекции на среде МСК–С1 на трансформированных эксплантах картофеля появились регенерировавшие побеги. В течение следующих 2 недель культивирования в чашках Петри со средой МСК–С1 некоторые побеги замедляли рост, желтели и погибали (рис. 2, а–г). После 1 мес селекции растения высотой 2–3 см с темно-зелеными листьями, полностью развитыми стеблями и корнями отделяли от эксплантов и переносили в пробирки со средой МСК–С2 (рис. 2, д–з). Потом в течение 2 мес

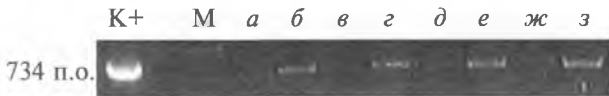


Рис. 3. Результаты ПЦР-анализа геномной ДНК трансгенных линий картофеля с использованием специфических праймеров к гену *hLf*. К+ — позитивный контроль (плазмида pBin35LF), М — маркер длин ДНК (GeneRuler 100 bp Plus (ThermoScientific, США), а, в, д, ж — геномная ДНК контрольных (нетрансгенных) линий, б, г, е, з — амплифицированный фрагмент гена *hLf* размером 734 п.о. в геномной ДНК трансгенных линий, а, б — сорт Вернисаж; в, г — сорт Левада; д, е — сорт Свитанок Киевский; ж, з — сорт Зарево

растения культивировали на среде МСК-С2, содержащей канамицин в качестве селективного агента (100 мг/л). Отобранные линии с нормальной морфологией, подобной таковой у контрольных (нетрансгенных) растений, переносили на среду МСК-Р для дальнейшего их роста и развития. Затем растения анализировали с помощью метода ПЦР и Вестерн блоттинга для подтверждения стабильной интеграции гена *hLf* и идентификации белка лактоферрина в тканях трансгенных линий. Линии, экспрессировавшие лактоферрин, были адаптированы к условиям *in vivo* (рис. 2, и, к).

ПЦР анализ трансгенных линий картофеля. Для подтверждения интеграции гена *hLf* в геном, 44 линии сорта Вернисаж, 26 линий сорта Левада, 25 линий сорта Свитанок Киевский и 16 линий сорта Зарево, устойчивых к канамицину, анализировали с помощью ПЦР [17]. Интеграцию гена интереса обнаружили во всех 4 сортах, использованных в ходе экспериментов (рис. 3).

Частота трансформации картофеля по результатам селекции составляла 24,2, 30,2, 24,5 и 18,5 % (рис. 4, а), а эффективность трансформации по результатам ПЦР была на уровне 6,8, 3,8, 4 и 6,25 % (рис. 4, б) для сортов Вернисаж, Левада, Свитанок Киевский и Зарево, соответственно. В аналогичных исследованиях эффективность трансформации картофеля была показана на уровне 0,5–18,4 % [37] и 1,2–10,7 % [38], что сопоставимо с нашими результатами. В то же время некоторые авторы сообщают о гораздо более высокой эффек-

тивности *Agrobacterium*-опосредованной трансформации картофеля (до 68 %) с использованием сегментов стебля в качестве эксплантов [39, 40]. Был проведен ряд исследований по изучению влияния различных факторов на эффективность *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, среди которых были отмечены как наиболее важные генотип растительного организма, тип промоторов в плазмидных векторах, тип штаммов *A. tumefaciens* [41–44]. Очевидно, что для дальнейшего повышения эффективности *Agrobacterium*-опосредованной трансформации картофеля можно дополнительно подбирать необходимые условия.

Вестерн блоттинг. Для подтверждения экспрессии лактоферрина человека в трансгенных линиях картофеля проводили Вестерн блоттинг с использованием специфических моноклональных антител к лактоферрину. В результате проведенного анализа в исследованных образцах был обнаружен рекомбинантный лактоферрин. Молекулярная масса идентифицированного белка находилась в пределах 80 кДа, что соответствует позитивному контролю (бычий лактоферрин), как это показано для трансгенной линии сорта Зарево на рис. 5. Таким образом, полученные данные свидетельствуют не только о переносе и интеграции гена лактоферрина в геном исследуемых сортов картофеля, а также о его экспрессии в трансгенных линиях.

С помощью денситометрического анализа было установлено, что содержание лактоферрина, к примеру, в одной из анализируемых трансгенных линий картофеля сорта Зарево (рис. 5) составляло 0,05 % от общего количества тотального растворимого белка. Эти результаты сопоставимы с уровнями экспрессии лактоферрина человека в трансгенных растениях люцерны, которые были получены с использованием аналогичной векторной конструкции с геном *hLf*, экспрессирующимся под контролем 35S промотора [45]. Хотя уровни экспрессии рекомбинантного лактоферрина в различных видах растений существенно различаются и даже могут быть выше значений, приведенных выше [46, 47], известно лишь одно аналогичное исследование по трансформации картофеля геном лактоферрина под кон-

тролем P2 промотора ауксин-индуцибельной манопинсинтазы и тандемного 35S-промотора с уровнем содержания рекомбинантного белка 0,01 % от общего количества тотального растворимого белка [48].

Биотесты на устойчивость картофеля к фитопатогенам. Тест диффузии в агар. Бактериостатическую активность сока трансгенных линий картофеля оценивали с использованием таких фитопатогенных бактерий, как *R. solanacearum* штамм ATCC 11696 [28] и *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* штамма Ac-1996 [29]. Следует отметить, что эти штаммы фитопатогенных бактерий являются карантинными микроорганизмами и находятся в списке регулируемых патогенов в Украине [49]. Результаты теста диффузии в агар при изучении трансгенной линии сорта Зарево представлены на рис. 6. При этом следует отметить, что сок нетрансгенных растений не оказывал заметного антибактериального эффекта на *C. michiganensis* (рис. 6, а) и *R. solanacearum* (рис. 6, б).

Зоны задержки роста бактерий были заметны возле дисков, на которые наносили свежее-изолированный сок трансгенных растений, что можно объяснить наличием рекомбинантного лактоферрина в образце, который обладает антибактериальной активностью (рис. 6, а, б). Полученные данные соответствуют результатам, описанным ранее при изучении антибактериальной активности экстрактов из трансгенных растений, экспрессирующих лактоферрин человека. В частности, экспрессия лактоферрина в растениях табака [50–52], риса [24, 53–57], картофеля [48], томатов [58], женьшеня [59], люцерны [45], груши [60] и др. приводила к ингибированию роста различных видов бактерий, таких как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, и *Ralstonia solanacearum*. Полученные ранее линии картофеля, экспрессирующие ген *hLf*, продемонстрировали антибактериальную активность тотального белка, выделенного из их клубней, против трех видов условно-патогенных для человека бактерий (*E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella paratyphi*) [48]. В нашей же работе впервые показано, что образцы, полученные из трансгенных линий картофеля, экспрессирующих лактоферрин, об-

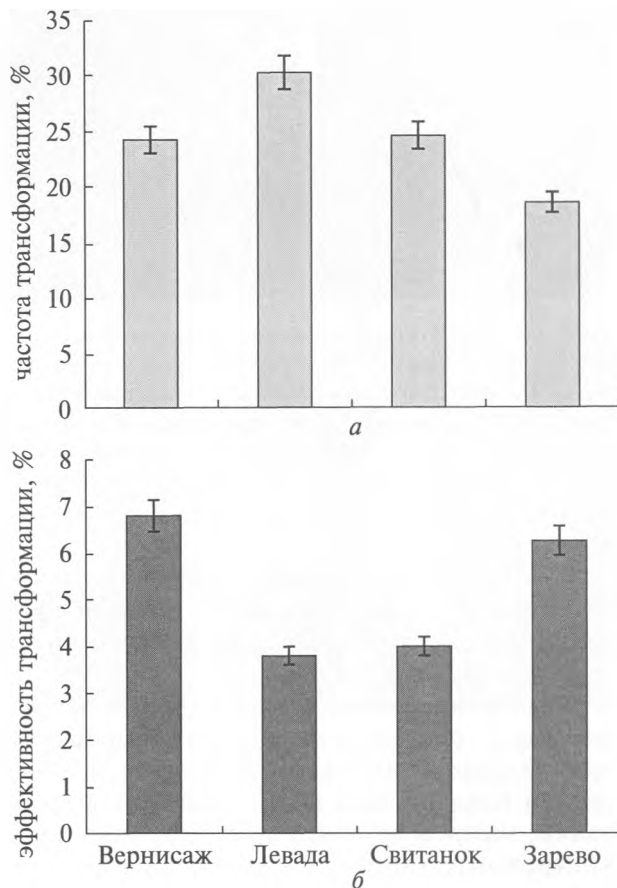


Рис. 4. Частота (а) и эффективность (б) трансформации используемых в работе сортов картофеля геном *hLf*

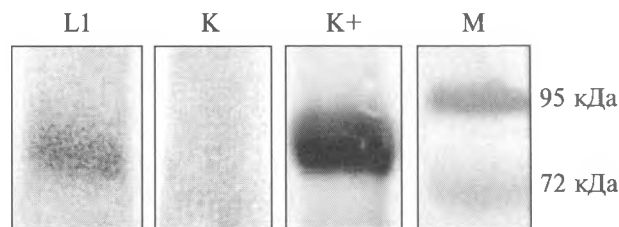


Рис. 5. Результаты идентификации рекомбинантного лактоферрина с помощью Вестерн блоттинга: L1 – трансгенная линия картофеля сорта Зарево, К – контрольное растение, К+ – бычий лактоферрин (позитивный контроль), М – маркеры молекулярной массы белков (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, ThermoFisher Scientific)

ладают антибактериальным эффектом по отношению к таким фитопатогенным бактериям, как *R. solanacearum* и *C. michiganensis* subsp.

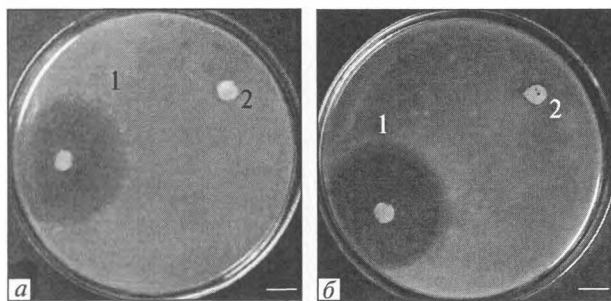


Рис. 6. Результаты изучения антибактериальной активности образцов контрольных и трансгенных линий картофеля сорта Зарево: а — ингибирование роста *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, б — ингибирование роста *R. solanacearum*; 1 — трансгенная линия, экспрессирующая ген *hLf*, 2 — контроль (нетрансгенная линия). Масштаб: 1 см

sepedonicus. Следовательно, такие линии картофеля могут характеризоваться повышенной устойчивостью к болезням, вызванным данными бактериями, *in vivo*.

Оценка устойчивости картофеля к фитофторозу *in vitro*. Для исследования устойчивости трансгенных линий картофеля к *P. infestans* *in vitro* использовали по 10 трансгенных растений, экспрессирующих лактоферрин, и по 10 контрольных (нетрансгенных) растений картофеля. Растения опрыскивали суспензией конидий *P. infestans* в концентрации $3,5 \times 10^4$ /мл после выхода зооспор. Эффекты заражения оценивали в течение 8 дней. На следующий день после инокуляции симптомы заражения отсутствовали как у трансгенных, так и у нетрансгенных растений (рис. 7, а, з). На 4-й день после инокуляции более 75 % листьев на контрольных растениях увядали, и возле их стеблей на питательной среде появился мицелий, в то время как на трансгенных растениях лишь 25–50 % листьев были повреждены, в основном листья оставались темно-зелеными и непораженными, и на питательной среде у основания стебля трансгенных растений не развивался мицелий (рис. 7, б, д). На 8-й день после заражения все контрольные растения увядали и были полностью поражены грибом, в то время как поражение трансгенных растений достигало лишь 50–75 %, а некоторые растения в условиях заражения продолжали расти и развиваться (рис. 7, в, е). Результаты оценки заражения *in vitro* нетрансгенных ли-

ний картофеля сорта Зарево и линий, экспрессировавших ген *hLf*, свидетельствуют о повышении устойчивости трансгенных растений по сравнению с контрольными с 1 до 7 баллов по 9-балльной шкале (рис. 5, б, в, д, е).

Фунгицидная активность лактоферрина была показана в других исследованиях в условиях *in vitro* и *in vivo* против дрожжевых и мицелиальных грибов [50, 61–64]. Так, был показан фунгистатический эффект бычьего лактоферрина (*bLf*) при его экспрессии в геномах растений *A. thaliana* и *N. tabacum* против *Rhizoctonia solani* [61]; также был показан его антимикотический эффект против *otyrtis cinerea* при экспрессии *bLf* в *N. tabacum* [50] и против *Fusarium graminearum* при экспрессии в пшеницы [62]. В нашей работе впервые было продемонстрировано, что растения картофеля, экспрессирующие лактоферрин, обладают повышенной устойчивостью к высоковирулентному фитопатогенному грибу *P. infestans*.

Хотя сорт Зарево и обладает относительной устойчивостью к некоторым болезням [32–35], следует отметить, что фитофтороз каждый год причиняет убыток производителям на более, чем 3 млрд. долл. США [2, 65, 66]. Болезни растений, вызываемые бактериальными и грибными патогенами, сложно поддаются контролю из-за быстрых темпов появления новых высокопатогенных штаммов. Более того, глобализация и унификация мировой торговой политики, а также глобальные изменения климата оказывают все возрастающее влияние на распространение фитопатогенов во все больших масштабах [2, 65, 66]. Интенсивное развитие методов биотехнологии растений за последние 30 лет, а также изучение биохимических и молекулярно-биологических механизмов взаимодействия растения с патогеном, предоставляет множество возможностей для повышения устойчивости к заболеваниям культурных растений [11–14].

В 1994 г. были опубликованы результаты первого исследования по переносу гена *hLf* в растительный геном [22]. В 1998 г. теми же авторами было показано значительное повышение устойчивости растений табака (*N. tabacum*), экспрессирующих *hLf*, к фитопатогенным бактериям [48]. С того времени проведено большое количество работ по переносу

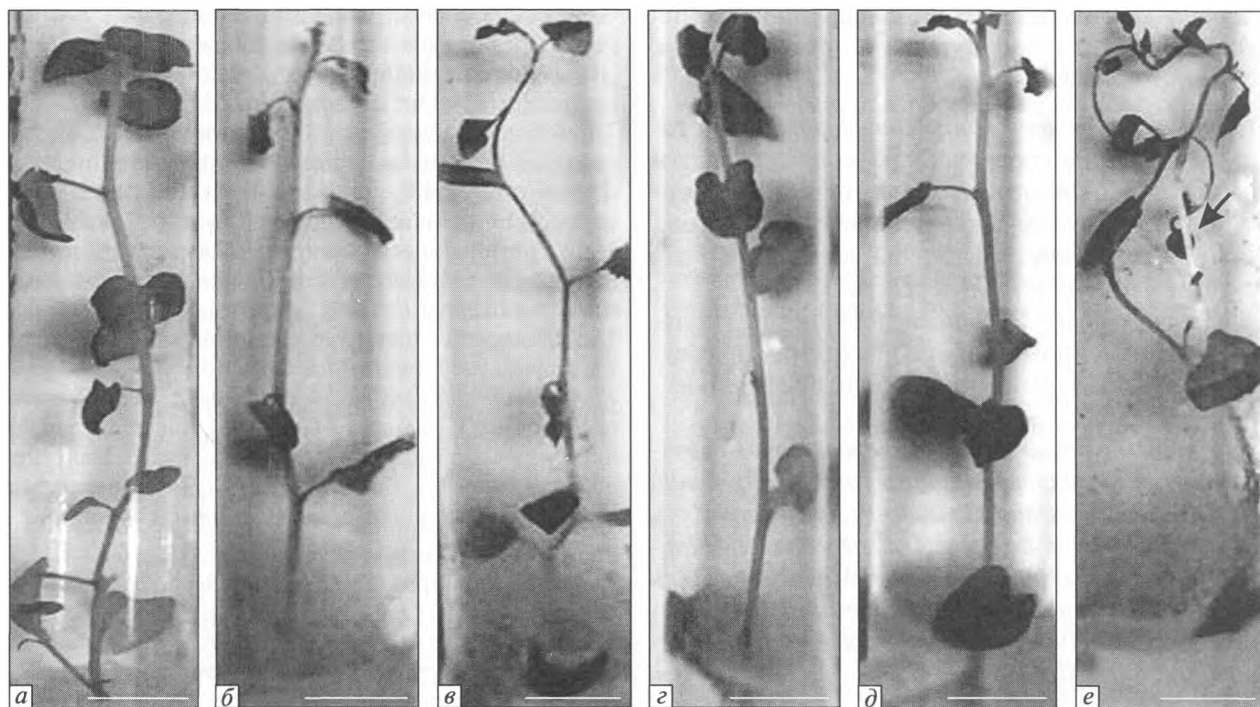


Рис. 7. Результаты биотеста на чувствительность картофеля сорта Зарево к *P. infestans in vitro*: а–в — контрольные линии, г–е — трансгенные линии, а, г — 1 день после заражения (day post-inoculation, dpi), б, д — 4 dpi, в, е — 8 dpi. Стрелка указывает на регенерировавший побег, не поврежденный *P. infestans*. Масштабная линейка: 1.5 см

гена лактоферрина в геномы разных видов культурных растений с целью улучшения качества продуктов питания и повышения устойчивости растений к фитопатогенам [15]. В предыдущих исследованиях, посвященных экспрессии лактоферрина в разных трансгенных растениях, была показана антимикробная и фунгицидная активность лактоферрина *in vitro* и *in vivo* против ряда видов бактерий и грибов, вызывающих болезни растений и человека [17, 24, 36, 45–48, 50–62]. Так, в работе [62] показано, что тотальный белковый экстракт из трансгенной пшеницы, экспрессирующей *bLf*, оказывал фунгистатическое воздействие на *F. graminearum*, в работе [61] — такой же экстракт из трансгенных растений *A. thaliana* и *N. tabacum*, экспрессирующих *bLf*, ингибировал рост гриба *R. solani*. В работах [24, 48, 50–59] в опытах *in vitro* показана антибактериальная и фунгистатическая активность тотального белкового экстракта из трансгенных растений картофеля, табака, женьшеня и риса,

экспрессирующих бычий, свиной, верблюжий и человеческий лактоферрин, против *E. coli*, *B. thuringiensis*, *S. aureus*, *Candida albicans* и т.д. В работах, посвященных получению трансгенного табака [48], а в работе [58] — генетически модифицированных растений томата, экспрессирующих *hLf*, было показано повышение устойчивости трансгенных растений к *R. solanacearum*. В работе [60] было подтверждено повышение устойчивости генетически модифицированной груши, несущей ген *bLf*, к *E. amylovora*, а также продемонстрирована устойчивость люцерны, трансформированной геном *hLf*, к *P. syringae* и *C. michiganensis* [45].

В нашей работе было показано, что экспрессия гена лактоферрина человека в картофеле значительно повышает его устойчивость к бактериальным (*C. michiganensis* и *R. solanacearum*) и грибному (*P. infestans*) патогенам. Данные результаты, также как и результаты приведенных выше исследований, указывают на перспективность использования технологии

переноса гена лактоферрина для повышения устойчивости культурных растений к фитопатогенам.

Соответствие этическим стандартам. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием организмов или органов людей и животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Это исследование не получало финансирования от учреждений в государственном, коммерческом или некоммерческом секторах.

Работа выполнена в рамках проекта «Использование гена лактоферрина для получения линий растений семейства Solanaceae, устойчивых к фитопатогенам» комплексной междисциплинарной программы исследований «Молекулярные и клеточные» Национальной академии наук Украины (2015–2019 гг.) (№ государственной регистрации — 0115U005021).

OBTAINING OF TRANSGENIC POTATO PLANTS EXPRESSING HUMAN LACTOFERRIN GENE AND ANALYSIS OF THEIR RESISTANCE TO PHYTOPATHOGENS

A. Buziashvili, L. Cherednichenko, S. Kropyvko, Y. Blume, A. Yemets

Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2a, Institute of Potato, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Ukraine, 07853, Kyiv region, Nemishaeve, Chkalov st., 22. Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03860, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 150. E-mail: buziashvili.an@gmail.com, yemets.alla@nas.gov.ua

The transfer of human lactoferrin gene was carried out into genomes of a number of potato (*Solanum tuberosum*) varieties of Ukrainian selection with the use of *Agrobacterium*-mediated transformation. For this, the plasmid vector pBIN35LF was used carrying human lactoferrin gene *hLf* controlled by 35S promoter of Cauliflower mosaic virus (CaMV35S) and octopine synthase terminator, and a selective marker gene neomycinophosphotransferase II conferring the resistance to kanamycin was used. As a result of selection, 44 lines of Vernisage cultivar, 26 lines of cv. Levada, 25 lines of cv. Svitank Kyivskyi and 16 lines of cv. Zarevo resistant to 100 mg/l of kanamycin were obtained. PCR and

Western blot analyses of transformed lines with specific primers to *hLf* gene and a monoclonal antibody against lactoferrin were performed to confirm the transgenic nature of selected tomato plants and *hLf* gene expression. The selected transgenic potato lines were tested on the resistance to bacterial and fungal phytopathogens. With the use of agar diffusion assay, the antibacterial effect of the juice of transgenic potato lines was established against phytopathogenic bacteria *Ralstonia solanacearum* (causing potato brown rot) and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (causing potato ring rot) was found. The resistance of transgenic potato plants to late blight was investigated by *in vitro* infection of plants with *Phytophthora infestans* isolate. As a result, the enhanced resistance to *P. infestans* of obtained transgenic potato lines was established compared to control. Thus, the obtained data show that transfer of *hLf* gene into potato genome enhance potato resistance to bacterial and fungal pathogens.

ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН КАРТОПЛІ, ЩО ЕКСПРЕСУЮТЬ ГЕН ЛАКТОФЕРИНУ ЛЮДИНИ, ТА АНАЛІЗ ЇХ СТІЙКОСТІ ДО ФІТОПАТОГЕНІВ

А. Бузиашвілі, Л. Чередніченко, С. Кропивко, Я. Блум, А. Ємець

За використання *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації було здійснено перенесення гена лактоферина людини в геном ряду сортів картоплі (*Solanum tuberosum*) української селекції (Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево). Для цього використовували плазмідний вектор pBIN35LF, який ніс ген лактоферина людини *hLf* під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти та термінатора октопінсинтази, а також селективний маркерний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*), що забезпечує стійкість до канаміцина. В результаті селекції були відібрані 44 лінії сорта Вернісаж, 26 ліній сорта Левада, 25 ліній сорта Світанок Київський та 16 ліній сорта Зарево, стійких до 100 мг/л канаміцина. Інтеграція цільового гена в геном картоплі була підтверджена за допомогою метода полімеразної ланцюгової реакції за використання специфічних праймерів до гена *hLf*. Ідентифікацію рекомбінатного лактоферина в тканинах трансгенних ліній проводили за допомогою Вестерн блоттинга за використання специфічних моноклональних антитіл проти лактоферину. Відібрані трансгенні лінії картоплі були протестовані на стійкість до бактеріальних та грибних фітопатогенів. За допомогою теста дифузії в агар було встановлено, що сік трансгенних ліній картоплі володіє антибактеріальним ефектом по відношенню до таких фітопатогенних бактерій, як *Ralstonia solanacearum*

(збудник бактеріальної гнилі картоплі) та *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (збудник кільцевої гнилі картоплі). Стійкість трансгенних ліній картоплі до фітофторозу досліджували шляхом зараження рослин *in vitro* ізолятом *Phytophthora infestans*. У результаті було встановлено підвищену стійкість у проаналізованих трансгенних лініях картоплі до *P. infestans* у порівнянні з контролем. Таким чином, отримані дані вказують на те, що перенос гена *hLf* в геном картоплі підвищує її стійкість до бактеріальних та грибних патогенів.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Melnyk, S.I., Kovchi, A.L., Stefkivska, Y.L., Kravchuk, O.O., and Gorytska, T.V., Potato market in Ukraine, *Plant Varieties Studying and Protection*, 2017, vol. 13, no. 2, pp. 206–10. doi 10.21498/2518-1017.13.2.2017.105419 (in Ukrainian).
- Cook, E., Agriculture, forestry and fishery statistics. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2018. 195 p.
- Kolobayev, V.A., Rogozina, Ye.V., Cultivars immunity to phytopathogens as a factor of environmental safety: the cases of potato and sugarcane, *Biosphere*, 2014, vol. 6, no. 3, pp. 222–30 (in Russian).
- Erenkova, L.A., Molyavko, A.A., Marukhlenko, A.V., and Borisova, N.P., New generation potato varieties with resistance to pathogens, *Breeding, Seed Product. Genet.*, 2018, vol. 4, pp. 47–50. doi 10.24411/2413-4112-2018-10007 (in Russian).
- Fiers, M., Edel-Hermann, V., Chatot, C., Alabouvette, C., and Steinberg, C., Potato soil-borne diseases. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 2012, vol. 32, pp. 93–132. doi: 10.1007/s13593-011-0035-z.
- Gordienko, V.V., Zaharchuk, N.A., Creation of initial breeding material of potato with complex resistance to fusarium dry rot and tuber late blight, *Plant Varieties Stud. Protect.*, 2017, vol. 13, no. 3, pp. 239–44. doi: 10.21498/2518-1017.13.3.2017.110705 (in Ukrainian).
- Kolomiets, Y.V., Grygoryuk, I.P., and Butsenko, L.M., Bacterial diseases of tomato plants in terms of open and covered growing of Ukraine, *Ann. Agrar. Sci.*, 2017, vol. 15, no. 2, pp. 213–6. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2017.05.010>.
- Kolomiets, Y.V., Grygoryuk, I.P., Butsenko, L.M., and Kalinichenko, A.V., Biotechnological control methods against phytopathogenic bacteria in tomatoes, *Appl. Ecol. Environm. Res.*, 2019, vol. 17, no. 2, pp. 3215–30. https://doi.org/10.15666/aecr/1702_32153230.
- Kolomiets, Y.V., Grygoryuk, I.P., Likhanov A., Butsenko L.M., and Blume Ya., Induction of bacterial canker resistance in tomato plants using plant growth promoting *Rhizobacteria*, *The Open Agric. J.*, 2019, vol. 13, pp. 215–22. doi: 10.2174/1874331501913010215.
- Boroday, V.V., Parfeniuk, A.I., Spreading and development of the main potato (*Solanum tuberosum* L.) diseases in Ukraine, *Agroecol. J.*, 2018, vol. 4, pp. 82–7. doi: 10.33730/2077-4893.4.2018.161774 (in Ukrainian).
- López-García, B., San Segundo, B., and Coca, M., Antimicrobial peptides as a promising alternative for plant disease protection, In: *Small Wonders: Peptides for Disease Control*, 2012, pp. 263–94. doi: 10.1021/bk-2012-1095.ch013.
- Moosa, A., Farzand, A., Sahi, S.T., and Khan, S.A., Transgenic expression of antifungal pathogenesis-related proteins against phytopathogenic fungi –15 years of success, *Israel. J. Plant Sci.*, 2017. doi: 80/07929978.2017.1288407.
- Jung, Y., Kang, K., Application of antimicrobial peptides for disease control in plants. *Plant Breed. Biotechnol.*, 2014, vol. 2, no. 1, pp. 1–13. doi: 10.9787/PBB.2014.2.1.001.
- Patil, V.U., Gopal, J., and Singh, B.P., Improvement for bacterial wilt resistance in potato by conventional and biotechnological approaches, *Agric. Res.*, 2012, vol. 1, pp. 299–316. doi: 10.1007/S40003-012-0034-6.
- Yemets, A.I., Tanasienko, I.V., Krasylenko, Y.A., and Blume, Y.B., Plant-based biopharming of recombinant human lactoferrin, *Cell Biol. Int.*, 2014, vol. 38, pp. 989–1002. doi: 10.1002/cbin.10304.
- Murashige, T., Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, pp. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Buziashvili, A., Yemets, A., Obtaining of tomato and potato plants with human lactoferrin gene *hLf*, *Reports Natl. Acad. Sci. Ukraine*, 2018, vol. 10, pp. 88–94. doi: 10.15407/dopovidi2018.10.088 (in Ukrainian).
- Sambrook, J.F. Russell, D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 2001.
- Jeroen, S., Damm, B., Melchers, L., and Hoekema, A., Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*), *Plant Cell Rep.*, 1993, vol. 12, pp. 644–7. doi: 10.1007/BF00232816.
- Rogers, S.O., Bendich, A.J., Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues, *Plant Mol. Biol.*, 1985, vol. 5, pp. 69–76. doi: 10.1007/BF00020088.
- Tanasienko, I.V., Yemets, A.I., Pirkko, Y.V., Korhkovyy, V.I., Abumhadi, N., and Blume, Y.B., Generation of transgenic barley lines producing human lactoferrin using mutant alpha-tubulin gene as the selective marker, *Cytol. Genet.*, 2011, vol. 45, no. 1, pp. 3–10. doi: 10.3103/S0095452711010026.
- Baskaran, P., Soys, V., Balázs, E., and Van Stadena, J., Shoot apical meristem injection: A novel and effi-

- cient method to obtain transformed cucumber plants. *South African. J. Bot.*, 2016, vol. 103, pp. 210–15. doi: 10.1016/j.sajb.2015.09.006.
23. Mitra, A., Zhang, Z., Expression of a human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial protein(s), *Plant Physiol.*, 1994, vol. 106, no. 3, pp. 977–81.
24. Rachmawati, D., Mori, T., Hosaka, T., Takaiwa, F., Inoue, E., and Anzai, H., Production and characterization of recombinant human lactoferrin in transgenic Javanica rice, *Breed. Sci.*, 2005, vol. 55, no. 2, pp. 213–22. doi: 10.1270/jsbbs.55.213.
25. Bradford, M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–54.
26. Laemmli, U., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–5.
27. Onuoha, S.C., Alisa, C.O., Antimicrobial potential of leaf juice and extracts of *Moringa oleifera* lam against some human pathogenic bacteria, *J. Pharm. Biol. Sci.*, 2013, vol. 5, no. 4, pp. 37–42. doi: 10.9790/3008-0543742.
28. Chahardooli, M., Farzaneh, A., and Sohrabi, A., Expression of recombinant Arabian camel lactoferrin-related peptide in *Pichia pastoris* and its antimicrobial identification, *J. Sci. Food Agricult.*, 2016, vol. 96, no. 2, pp. 569–75. doi: 10.1002/jsfa.7125.
29. Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., and Arakawa, M., Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov., *Microbiol. Immunol.*, 1992, vol. 36, no. 12, pp. 1251–75. doi: 10.1111/j.1348-0421.1992.tb02129.x.
30. Podgorskiy, V.S., Ukrainian national collection of microorganisms. 2nd Edn. Nauk. Dumka: Kyiv, 2007, 270 p. (in Ukrainian).
31. Tournas, V., Stack, M.E., Mislivec, P.B., Koch, H.A., and Bandler, R., Chapter 18. Yeasts, Molds, and Mycotoxins. In: FDA Bacteriological Analytical Manual, 8th edn. Revision A. USA: AOAC International, 1998.
32. Tkachyk, S.O., Methods of phytopathological researches with artificial infection of plants. Kyiv: Nylan-LTD, 2014, 76 p. (in Ukrainian).
33. Cherednichenko, L.M., Evaluation of the potato selection material for the resistance of the aboveground plant parts to late blight with the use of detached leaf particles, *Potato Growing of Ukraine*, 2013, vol. 1–2, pp. 19–24. (in Ukrainian).
34. Podhaietskiy, A.A., Kravchenko, N.V., Kovalenko, V.M., Bondus, R.O., Hordińenko, V.V., Cherednichenko, L.M., and Sobra, V.M., Ecological testing of potatoes, *Ukr. J. Ecol.*, 2018, vol. 8, no. 4, pp. 17–25. (in Ukrainian).
35. Michalska, A.M., Sobkowiak, S., Flis, B., Zimnoch-Guzowska, E., Virulence and aggressiveness of *Phytophthora infestans* isolates collected in Poland from potato and tomato plants identified no strong specificity, *Eur. J. Plant Pathol.*, 2016, vol. 144, pp. 325–36. doi: 10.1007/s10658-015-0769-6.
36. Buziashvili A.Yu., Yemets, A.I., *Agrobacterium*-mediated transformation of potato with human lactoferrin gene, *Fact. Exper. Evolut. Organisms*, 2019, vol. 25, pp. 184–9. (in Ukrainian).
37. Han, E.H., Goo, Y.M., Lee, M.K., and Lee, S.W., An efficient transformation method for a potato (*Solanum tuberosum* L. var. Atlantic), *J. Plant Biotechnol.*, 2015, vol. 42, pp. 77–82. doi: 10.5010/JPB.2015.42.2.77.
38. Shin, D.Y., Seong, E.S., Na, J.K., Yoo, J.H., Kang, W.H., Ghimire, B.K., Lim, J.D., Yu, C.Y., Conditions for regeneration and transformation of *Solanum tuberosum* cultivars using the cotton glutathione S-transferase (Gh-5) gene, *African. J. Biotechnol.*, 2011, vol. 10, no. 67, pp. 15135–41. doi: 10.5897/AJB11.1895.
39. Soto, N., Enriquez, G.A., Ferreira, A., Corrada, M., Fuentes, A., Tiel, K., and Pujol, M., Efficient transformation of potato stems segments from cultivar Dİsirİne, using phosphinothricin as selection marker, *Biotechnol. Aplic.*, 2007, vol. 24, no. 2, pp. 139–44.
40. Craze, M., Bates, R., Bowden, S., and Wallington, E.J., Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of potato (*Solanum tuberosum*) and production of transgenic microtubers, *Curr. Protocols Plant Biol.*, 2018, vol. 3, no. 1, pp. 33–41. doi: 10.1002/cppb.20065.
41. Alimohammadi, M., Bagherieh-Najjar, M., *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: basic principles and influencing factors, *African. J. Biotechnol.*, 2009, vol. 8, no. 20, pp. 5142–8.
42. Opabode, J., *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency, *Biotechnol. Mol. Biol. Reviews*, 2006, vol. 1, no. 1, pp. 12–20.
43. Bakhsh, A., Anayol, E., and Ozcan, S., Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana tabacum* L., *Emirates J. Food Agricult.*, 2014, vol. 26, no. 3, pp. 259–64. doi: 10.9755/ejfa.v26i3.16437.
44. Gelvin, S., Liu, C., Genetic manipulation of *Agrobacterium tumefaciens* strains to improve transformation of recalcitrant plant species. *Plant Mol. Biol. Manual.*, 1994. pp. 85–97.
45. Stefanova, G., Slavov, S., Gecheff, K., Vlahova, M., and Atanassov, A., Expression of recombinant human lactoferrin in transgenic alfalfa plants. *Biol. Plant.*, 2013, vol. 57, no. 3, pp. 457–64.
46. Vlahova, M., Stefanova, G., Petkov, P., Barbulova, A., Petkova, D., Kalushkov, P., and Atanassov, A., Genetic modification of alfalfa (*Medicago sativa* L.) for

- quality improvement and production of novel compounds, *Biotechnol. Biotechn. Equipm.*, 2005, vol. 19, no. 3, pp. 56–62. doi: 0/13102818.2005.10817286.
47. Legrand, D., Salmon, V., Spik, G., Gruber, V., Burnat, P., and Merot, B., Recombinant lactoferrin, methods of production from plants and uses. *US Patent No. 6,569,831 B1*, May 27, 2003.
48. Chong, D.K., Langridge, W.H., Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants, *Transgen. Res.*, 2000, vol. 9, no. 1, pp. 71–8. doi: 10.1023/A:1008977630179.
49. On the amendments to the list of regulated pests. The edition of the order of the Ministry of Agrarian Policy and Food of Ukraine, July 16, 2019 № 397. (in Ukrainian).
50. Fukuta, S., Kawamoto, K., Mizukami, Y., Yoshimura, Y., Ueda, J., and Kanbe, M., Transgenic tobacco plants expressing antimicrobial peptide bovine lactoferricin show enhanced resistance to phytopathogens. *Plant Biotechnol.*, 2012, vol. 29, no. 4, pp. 383–9. doi: 0.5511/plantbiotechnology.12.0619a.
51. Sohrabi, S.M., Niazi, A., Chahardooli, M., and Aram, F., Isolation and expression of antimicrobial camel lactoferrin (*cLf*) gene in tobacco, *Plant OMICS*, 2014, vol. 7, pp. 298–307.
52. Chahardooli, M., Fazeli, A., Niazi, A., and Ghaabooli, M., Recombinant expression of LFchimera antimicrobial peptide in a plant-based expression system and its antimicrobial activity against clinical and phytopathogenic bacteria, *Biotechnol. Biotechn. Equipm.*, 2018, vol. 32, no 3, pp. 714–23. doi: 10.1080/13102818.2018.1451780.
53. Humphrey, B.D., Huang, N., and Klasing, K.C., Rice expressing lactoferrin and lysozyme has antibiotic-like properties when fed to chicks, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2003, vol. 36, no. 2, pp. 190–9. doi: 10.1093/jn/132.6.1214.
54. Lee, T.T., Chang, C.C., Juang, R.S., Chen, R.B., Yang, H.Y., Chu, L.W., Wang, S.R., Tseng, T.H., Wang, C.S., Chen, L.J., and Bi, Yu., Porcine lactoferrin expression in transgenic rice and its effects as a feed additive on early weaned piglets, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, vol. 58, no. 8, pp. 5166–73. doi: 10.1021/jf903904s.
55. Takase, K., Hagiwara, K., Onodera, H., Nishizawa, Y., Ugaki, M., Omura, T., Numata, S., Akutsu, K., Kumura, H., and Shimazaki, K., Constitutive expression of human lactoferrin and its N-lobe in rice plants to confer disease resistance, *Biochem. Cell Biol.*, 2005, vol. 83, no. 2, pp. 239–49. doi: 10.1139/o05-022.
56. Franco, I., Castillo, E., Pérez, M.D., Calvo, M., and Sánchez, L., Effects of hydrostatic high pressure on the structure and antibacterial activity of recombinant human lactoferrin from transgenic rice, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2012, vol. 76, no. 1, pp. 53–9. doi: 10.1271/bbb.110433.
57. Funakoshi, T., Hosaka, T., Inoue, E., and Anzai, H., Gene expression of lactoferrin-derived antimicrobial peptides in rice, *Plant Physiol. Biochem.*, 2017, vol. 123. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.12.037.
58. Lee, T. J., Coyne, D. P., Clemente, T. E., and Mitra, A., Partial resistance to bacterial wilt in transgenic tomato plants expressing antibacterial lactoferrin gene, *J. Am. Soc. Horticult. Sci.*, 2002, vol. 127, no. 2, pp. 158–64. doi: 10.21273/JASHS.127.2.158.
59. Jo, S.H., Kwon, S.Y., Park, D.S., Yang, K.S., Kim, J.W., Lee, K.T., Kwak, S.S., and Lee, H.S., High-yield production of functional human lactoferrin in transgenic cell cultures of siberian ginseng (*Acanthopanax senticosus*), *Biotechnol. Bioprocess Engineer.*, 2006, vol. 11, no. 5, pp. 442–8. doi: 10.1007/BF02932312.
60. Malnoy, M., Venisse, J.S., Brisset, M.N., and Chevreau, E., Expression of bovine lactoferrin cDNA confers resistance to *Erwinia amylovora* in transgenic pear, *Mol. Breed.*, 2003, vol. 12, no. 3, pp. 231–44. doi: 10.1023/A:1026365311067.
61. Nguyen, T.C., Lakshman, D.K., Han, J., Galvez, L.C., and Mitra, A., Transgenic plants expressing antimicrobial lactoferrin protein are resistant to a fungal pathogen, *J. Plant Mol. Biol. Biotechnol.*, 2011, vol. 2, no.1, pp. 1–8.
62. Han, J., Lakshman, D.K., Galvez, L.C., Mitra, S., Baenziger, P.S., and Mitra, A., Transgenic expression of lactoferrin impacts enhanced resistance to head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum*. *BMC Plant Biol.*, 2012, vol. 12, no. 33. doi: 10.1186/1471-2229-12-33.
63. Bruni, N., Capucchio, M.T., Biasibetti, E., Pesione, E., Cirrincione, S., Giraudo, L., Corona, A., and Dosio, F., Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine, *Molecules*, 2016, vol. 21, no. 6. doi: 10.3390/molecules21060752.
64. 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, vol. 8, no. 2. doi: 10.3389/fmicb.2017.00002.
65. Fry, W., *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer, *Mol. Plant Pathol.*, 2008, vol. 9, no. 3, pp. 385–402. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x.
66. Dominguez, P., Gomez, I., Barbero, M., Fellmann, T., Chatzopoulos, T., Jensen, H., and Philippidis, G., EU commodity market development: medium-term agricultural outlook, Luxembourg: *Publ. Office. Europ. Union*, 2018, ISBN 978-92-79-97850-0, doi 10.2760/4519, JRC113987.

Поступила в редакцию 06.12.19

После доработки 17.01.20

Принята к публикации 18.05.20