

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 577.218:577.182.99:577.152.1
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-3-325-331>

Поступило в редакцию 18.12.2019
Received 18.12.2019

**А. Ю. Мисюкевич¹, Т. А. Гапеева¹, Т. Г. Третьякова¹, Т. В. Семанюк²,
академик И. Д. Волотовский¹**

¹Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

²Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству
и плодовоовощеводству, Самохваловичи, Республика Беларусь

АКТИВАЦИЯ ГЕНА ПЕРОКСИДАЗЫ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА MsrA1

Аннотация. Антимикробный пептид MsrA1 является искусственной рекомбинантной молекулой, полученной на основе цекропина А личинки североамериканского шелкопряда и мелиттина пчелы медоносной. Трансгенные растения белорусского сорта картофеля Одиссей с конститутивно экспрессируемым геном MsrA1 обладают повышенной устойчивостью к грибным патогенам *Phytophthora infestans* и *Alternaria solani*. С использованием методов кДНК–ПЦР и ДНК-секвенирования показано, что в клетках данных растений в отсутствие фитопатогенной инфекции наблюдается активация экспрессии гена пероксидазы класса POX. Увеличение экспрессии гена данного фермента косвенно свидетельствует о повышенном образовании активных форм кислорода, что может определять особую устойчивость к грибным патогенам. Полученные данные подтверждают также возможность участия внутриклеточного гетерологичного антимикробного пептида в формировании устойчивости к окислительному стрессу путем активации защитной системы растения-хозяина.

Ключевые слова: антимикробный пептид, картофель, трансгенные растения, устойчивость к грибным фитопатогенам, пероксидаза.

Для цитирования: Активация гена пероксидазы в клетках растений картофеля, экспрессирующих ген антимикробного пептида MsrA1 / А. Ю. Мисюкевич [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 3. – С. 325–331. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-3-325-331>

**Ala Yu. Misiukevich¹, Tamara A. Gapeeva¹, Tatina G. Tretyakova¹, Tamara V. Semanyuk²,
Academician Igor D. Volotovskii¹**

¹Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus on Potato and Fruit and Vegetable Growing, Samokhvalovichi, Republic of Belarus

ACTIVATION OF THE PEROXIDASE GENE IN POTATO PLANTS EXPRESSING THE GENE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE MsrA1

Abstract. Antimicrobial peptide MsrA1 is a synthetic hybrid molecule based on cecropin A from giant silk moth larvae and on melittin from melliferous bee venom. Transgenic potato plants of the Belarusian variety Odyssey with the constitutive expression of *msrA1* gene are shown to exhibit increased resistance to fungal pathogens *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. Peroxidase genes expression studies using cDNA-PCR and DNA sequencing revealed the activation of the POX peroxidase gene in transgenic plants in the absence of pathogens. This may be indirect evidence of the increased formation of reactive oxygen species, which may explain special resistance to fungal pathogens. The data obtained also confirm a possible role of intracellular antimicrobial peptide in making the plants more resistant to oxidative stress by the way of activation of the host plant defense system.

Keywords: antimicrobial peptide, potato, transgenic plants, resistance to fungal phytopathogens, peroxidase

For citation: Misiukevich A. Yu., Gapeeva T. A., Tretyakova T. G., Semanyuk T. V., Volotovskii I. D. Activation of the peroxidase gene in potato plants expressing the gene of antimicrobial peptide MsrA1. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, vol. 64, no. 3, pp. 325–331 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-3-325-331>

Введение. Эндогенные антимикробные пептиды (АМП) являются частью защитной системы организмов. Более 3000 АМП обнаружено для 6 царств живой природы от микробов до эукариот, создаются также синтетические АМП целевого назначения [1; 2]. Большинство АМП явля-

ются катионными молекулами, хотя существуют и анионные. Эндогенные АМП синтезируются преимущественно на рибосомах, являются частью врожденной иммунной системы многоклеточных организмов, а также могут участвовать в приобретенном иммунном ответе [3]. Основными мишенями катионных АМП являются отрицательно заряженные фосфолипиды биологических мембран. Внешние мембраны клеток эукариот являются преимущественно нейтральными или имеют меньший отрицательный заряд, чем мембраны прокариот. Это снижает аффинность к ним катионных пептидов. У многоклеточных организмов АМП могут секретироваться на поверхность клеток, действуя в пристеночном слое, где создаются действующие концентрации пептидов, превышающие МИК патогенов. Следует отметить, что существует порог безопасных концентраций, при превышении которого эндогенные АМП способны повреждать клетки хозяина.

Катионные АМП, которые активно взаимодействуют с мембранами, обладают свойством амфипатичности, т. е. формируют структуры, в которых гидрофобные и гидрофильные части молекулы находятся на противоположных участках действующего домена. После связывания АМП с отрицательно заряженными мембранами с помощью электростатических сил их гидрофобные участки встраиваются в мембраны, создавая дефекты, вызывающие утечку ионов и метаболитов. Это либо приводит к гибели клетки инфекционного агента из-за деполяризации и разрушения мембран, либо создает условия для проникновения пептида внутрь клетки патогена. Действие АМП на внутриклеточные мишени реализуется через такие механизмы, как прямое повреждение нуклеиновых кислот и мембран внутри клетки, генерация активных форм кислорода, нарушение синтеза нуклеиновых кислот и белков, ингибирование активности ферментов и др. [4]. Однако универсального механизма действия АМП не предложено. Любой антимикробный пептид уникален по способу взаимодействия с живой системой, причем один и тот же пептид способен различно действовать в зависимости от мишени [5]. Кроме того, не удастся установить, каким образом достигается специфичность действия эндогенных АМП в отношении определенного круга патогенов, характерных для какого-либо организма.

Генно-инженерный синтез АМП может быть использован для изучения механизма действия как эндогенных, так и гетерологичных пептидов внутри клетки. Особое значение такие исследования приобретают при разработке генно-инженерных способов защиты сельскохозяйственных культур от неблагоприятных факторов. Механизм действия АМП обеспечивает возможность универсальной защиты растений от широкого спектра инфекционных агентов (бактерий, грибов, вирусов) [6–8], а также существенно снижает возможность развития резистентности к АМП у фитопатогенов [9; 10]. Ранее на основе растений белорусских сортов нами была создана трансгенная форма картофеля с геном антимикробного пептида MsrA1. Антимикробный пептид MsrA1 является искусственной рекомбинантной молекулой, полученной на основе цекропина А личинки североамериканского шелкопряда и мелиттина пчелы медоносной. Данный пептид особенно эффективен по отношению к грибным патогенам [11]. Показано также, что внутриклеточный синтез MsrA1 в растениях картофеля сортов Desiree и Russet Burbank сопровождается повышением устойчивости, в том числе к грибным фитопатогенам *Phytophthora cactorum* и *Fusarium solani* [12]. В [13] в результате анализа транскриптома растений риса, синтезирующих гетерологичный пептид цекропин А, показано, что в отсутствие фитопатогенной инфекции увеличивается экспрессия ряда генов системы защиты от окислительного стресса, при этом наиболее активными являются гены пероксидаз. Целью данной работы было изучить базальный уровень экспрессии генов пероксидаз в клетках трансгенных растений картофеля белорусского сорта Одиссей, экспрессирующих рекомбинантный ген MsrA1 [14].

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования были трансгенные линии с экспрессируемым геном антимикробного пептида MsrA1, созданные на основе растений картофеля белорусского сорта Одиссей, полученных из РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству» (Самохваловичи, Минский р-н). Растения культивировали *in vitro* при температуре 20–22 °С с 16-часовым фотопериодом (200 мкм м⁻²с⁻¹; лампы LF 35W/54-765, Philips, Польша) на агаризованных питательных средах.

Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР были разработаны с помощью программы «Primer-BLAST» и синтезированы в ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» (г. Минск).

Выделение суммарной растительной ДНК из листьев растений картофеля проводили с помощью набора реагентов NucleoSpin® PlantII (Macherey-Nagel, Германия).

Суммарную РНК для кДНК(РНК)-ПЦР выделяли из листьев растений, выращенных *in vitro*, с использованием Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit.

Препараты кДНК получали на матрице суммарной растительной РНК с использованием праймеров oligo-dT₁₈ и AMV-обратной транскриптазы производства Thermo Fisher Scientific Baltics (Литва). Концентрацию кДНК выравняли по оптической плотности препаратов, определяемой на спектрофотометре Ultrospec 3300 pro (Biochrom Ltd). Контроль пригодности кДНК для ПЦР-анализа проводили с использованием праймеров для гена актина картофеля (X55749): 5'-catggtattgtcagcaattg, 5'-ccacgctcagtgaggatc); размеры ПЦР-продуктов составляют 501 п. н. для ДНК-матрицы и 373 п. н. для кДНК-матрицы.

ПЦР проводили в термоциклере CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Био-Рад, США) с использованием набора Luna® Universal qPCR Master Mix производства Thermo Fisher Scientific Baltics (Ферментас, Литва). Реакционная смесь для ПЦР содержала также специфические олигонуклеотидные праймеры (6–10 пмоль на реакцию), 50–150 нг ДНК-матрицы или количество кДНК-матрицы, соответствующее 50 нг тотальной РНК. В качестве гена-нормализатора использовали ген фактора элонгации картофеля. Программа для термоциклера была следующей: 95 °С – 5 мин; {94 °С – 30 с, 57–59 °С – 30 с, 72 °С – 30 с} 40 циклов; 72 °С – 7 мин. Скорость изменения температуры – 1 °С/с.

Конечные продукты ПЦР в реальном времени также определяли методом горизонтального гель-электрофореза. Анализ гелей проводили методом детекции флуоресценции в ультрафиолетовом свете ($\lambda_{\text{детекции}} = 520$ нм) с помощью прибора для документирования гелей ГельДок 2000 (Био-Рад, США). Размеры фрагментов ДНК определяли путем их сравнения с линейкой ДНК-маркеров.

Определение нуклеотидных последовательностей проводили методом автоматического секвенирования с использованием генетического анализатора флуоресцентно-меченых фрагментов ДНК, разделяемых методом капиллярного гель-электрофореза, ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, США). В качестве образцов для секвенирования использовали ПЦР-продукты, выделенные из агарозного геля с использованием набора реагентов и колонок Macherey-Nagel™ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Thermo Fisher Scientific, Германия). Для секвенирования использовали те же праймеры, что и для получения ПЦР-продуктов. Реакцию секвенирования проводили в термоциклере CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Био-Рад, США) с применением набора реагентов Big Dye Termination v.3.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) по протоколу фирмы. Программа для термоциклера была следующей: 1. 96 °С – 60 с; 2. {96 °С – 10 с; 50 °С – 5 с; 60 °С – 4 мин} 25 циклов. Очистку проб от флуоресцентно-меченых дезоксирибонуклеотидов проводили методом осаждения ДНК этанолом. Результаты обрабатывались с помощью программы ABI Prism Sequencing Analysis 3.7. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программного обеспечения в общественном достоянии «BLASTn» (NCBI).

Результаты и их обсуждение. Анализ баз данных GenBank, NCBI показал наличие аннотированных последовательностей генов для трех пероксидаз: пероксидазы раннего ответа на заражение вирусом Y^{NTN} картофеля (roхMM, DQ925471.1); мРНКпероксидазы a1 (mRNA, partialcds, JX428800.1) и мРНК аскорбат-пероксидазы (APx, mRNA, AB041343.1). С помощью программы Primer BLAST был подобран ряд последовательностей праймеров для идентификации данных генов методом ПЦР (таблица), которые протестированы на матрицах ДНК и кДНК контрольных и трансгенных растений.

Праймеры, подобранные на основе последовательности мРНК пероксидазы a1, оказались неэффективными для исследуемых растений, что, вероятно, связано со значительным сортовым полиморфизмом. При использовании праймеров, подобранных на основе последовательности мРНК аскорбат-пероксидазы, методом кДНК-ПЦР с детекцией в агарозном геле существенных различий между контрольными и трансгенными образцами выявлено не было, что может быть, в частности, связано с очень высоким уровнем экспрессии исследуемого гена, определяемой по

ПЦР-праймеры для аннотированных последовательностей генов пероксидаз картофеля

PCR-primers for annotated gene sequences of potato peroxidase

Наименование пары праймеров Name of primer pair		Ген/мРНК Gene/mRNA	Последовательность, 5'–3' Sequence, 5'–3'	Размер ампликона, п. н. Size of amplicon, n. p. bp.	ПЦР-матрица PCR-matrix
PJX	S	al mRNA	AGGCATGGTGTTCGGACT	177	ДНК
	A		AGAATCGAAGCATCACAACCA		кДНК
AP1	S	APx mRNA	ACGAGGTGGTCTGTTCGTG	132	ДНК
	A		TCAACAGCCTTGAGGTACTCC		кДНК
AP2	S	APx mRNA	TCTTGCATGGCACTCTGCTG	101	ДНК
	A		TGTTTGACCATGAGCTTGC		кДНК
AP3	S	APx mRNA	CGGAGCTTTTGAGTGGGGAA	198	ДНК
	A		CCTCCTTCCCCTCACCATT		кДНК
POX1	S	<i>roxMM</i>	CGTCCAGTTGTATCTTGTGCG	183	ДНК
	A		TCCACTTCCCATGTTGGTCC	87	кДНК
POX2	S		GGTTGTGACGCTTCCATTCT	195	ДНК
	A		CGCAACTACGGAGTCACGA		кДНК
POX3	S		GTCCAGTTGTATCTTGTGCGG	181	ДНК
	A		CCACTTCCCATGTTGGTCCAT	81	кДНК
POX4	S		GGTTGTGACGCTTCCATTCT	318	ДНК
	A		TCCACTTCCCATGTTGGTCC	221	кДНК

Примечание: S, A – прямой, обратный праймер.

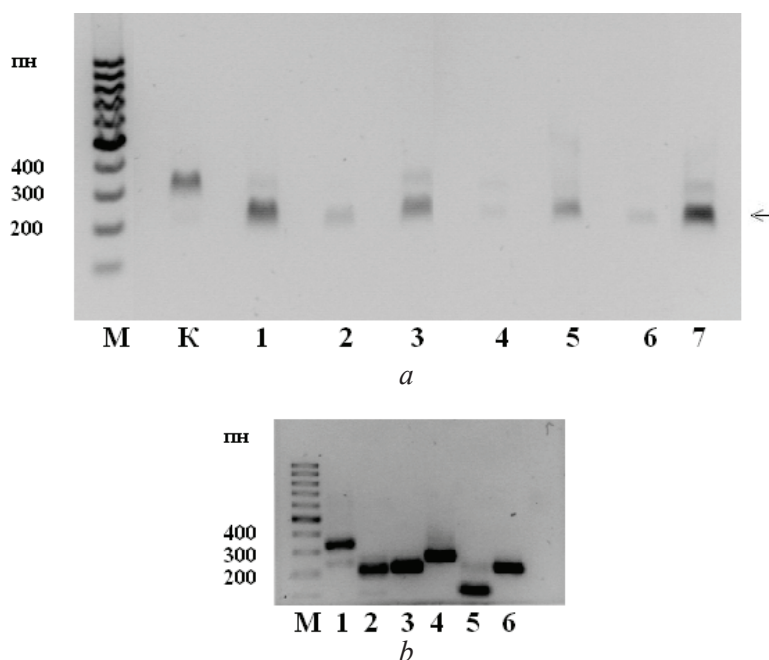
Note: S, A – direct, reverse primer.

интенсивности гель-электрофоретических полос (данные не представлены). Результаты секвенирования полученных ампликонов соответствовали наличию нескольких изоформ данного фермента, что не позволяет достаточно корректно проводить сравнительный анализ образцов методом ПЦР в реальном времени с красителем SYBR Green.

В результате для дальнейшей работы был выбран *roxMM* ген. Следует отметить, что в данном случае праймеры подбирались к последовательностям гена, содержащим интрон, что позволяет исключить артефакты, связанные с примесями ДНК в препаратах кДНК. Праймеры для гена *roxMM* были использованы при проведении ПЦР на матрице ДНК (результаты не представлены) и кДНК трансгенных и контрольных растений картофеля. Результаты кДНК-ПЦР с праймерами POX4 представлены на рисунке. Аналогичные результаты были получены для праймеров POX1. Следует отметить, что представлены результаты гель-электрофореза конечных продуктов ПЦР, так как эффект увеличения уровня транскриптов гена пероксидазы был обнаружен визуально и не возникло необходимости в классической обработке результатов кинетики образования ПЦР-продуктов с использованием порогового цикла амплификации (Ct).

В соответствии с рисунком *a* наблюдались два ПЦР-продукта, один из которых соответствовал по размерам предполагаемому мРНК-транскрипту (около 221 п. н.), другой – фрагменту ДНК с интроном (около 328 п. н.). Количество ПЦР-продукта, соответствующего мРНК-транскрипту гена *roxMM* для большинства трансгенных растений, было значительно больше, чем для контрольного нетрансформированного образца. Интенсивность гель-электрофоретических полос, представленных на рисунке *a*, коррелировала с содержанием мРНК-транскриптов гена-нормализатора (данные не представлены). Соответствие ПЦР-продуктов последовательностям фрагментов ДНК или кДНК гена *roxMM* было подтверждено также методом гнездовой ПЦР с праймерами POX2 и POX3 (таблица). В качестве матрицы для реамплификации использовали кДНК-ПЦР-продукты, полученные с применением праймеров POX4. Результаты приведены на рисунке *b*. Размеры ампликонов соответствовали ожидаемым, указанным в таблице.

Секвенирование ампликонов, полученных методом ДНК- и кДНК-ПЦР, также подтвердило соответствие последовательностей фрагментов аннотированной в базе данных GeneBank, NCBI последовательности гена *roxMM* с идентичностью 72–90 %, а также показало наличие интронов



Экспрессия гена *poxMM* пероксидазы картофеля: *a* – кДНК-ПЦР с праймерами POX4: К – контрольное (нетрансформированное) растение; 1–7 – линии трансгенных растений; *b* – реамплификация фрагментов, полученных с помощью праймеров POX4: 1, 2, 3 – праймер POX4, POX3, POX2 соответственно (контрольное растение); 4, 5, 6 – праймер POX4, POX3, POX2 соответственно (трансгенное растение). М – маркеры линейных размеров ДНК Thermo Scientific Gene Ruler 100 bp DNA Ladder. ПЦР-продукт, соответствующий мРНК-транскрипту гена *poxMM*, обозначен стрелкой

Expression of potato *poxMM* gene: *a* – cDNA-PCR with POX4 primers: К – wild type plant; 1–7 – transgenic lines; *b* – reamplification of fragments obtained with POX4 primers: 1, 2, 3 – POX4, POX3, POX2 primers respectively (wild type plants); 4, 5, 6 – POX4, POX3, POX2 primers respectively (transgenic plants). М – DNA molecular weight marker Thermo Scientific Gene Ruler 100 bp DNA Ladder. PCR product corresponding to mRNA transcript of *poxMM*, gene is indicated by arrow

в ПЦР-продуктах, которые по результатам гель-электрофореза соответствовали последовательностям ДНК. Так как при проверке качества кДНК с помощью праймеров для последовательности гена актина картофеля, содержащей интрон, примесей ДНК в препаратах обнаружено не было (данные не представлены), можно сделать вывод о необходимости использования специфичных праймеров для проверки препарата кДНК на наличие примесей ДНК. Необходимость данного приема определяется уровнем экспрессии конкретного гена: чем меньше количество кДНК-мишени для используемых праймеров, тем больше вероятность артефактов, связанных с примесями ДНК в препаратах, и тем больше необходимость применения праймеров, позволяющих различить ДНК- и кДНК-матрицу.

Полученные данные об увеличении базального уровня мРНК-транскриптов гена пероксидазы (в отсутствие фитопатогенной инфекции) в клетках трансгенных растений картофеля с конститутивно экспрессируемым геном антимикробного пептида MsrA1 согласуются с данными [13] по активации генов пероксидаз в клетках трансгенных растений риса. Растения риса, конститутивно экспрессирующие ген антимикробного пептида цекропина в эндоплазматическом ретикулуме, обладали повышенной устойчивостью к грибному патогену *Magnaporthe grisea*, вызывающему пирикуляртиоз риса. Исследуемые в данной работе растения белорусского сорта Одиссей, экспрессирующие ген *msrA1*, также обладают повышенной устойчивостью к инфицированию *Phytophthora infestans* и *Alternaria solani*, как показано нами ранее [14]. Особая устойчивость по отношению к грибным патогенам может быть связана со спецификой взаимодействия с мишенями таких пептидов, как цекропин и MsrA1. Решающей стадией данного взаимодействия может являться, как показано для некоторых АМП с выраженным фунгицидным действием, АФК-индуцированная программируемая гибель клетки грибного патогена [15]. В связи с этим можно предположить, что синтезируемый внутри клетки АМП, как и в случае прямого взаимо-

действия с патогеном, воздействует на мишени внутри клетки растения-хозяина, вызывая повышение уровня активных форм кислорода (АФК) и активности пероксидаз. Данные процессы могут вносить вклад в механизм повышения устойчивости к фитопатогенной инфекции, особенно к грибной. Известно, например, что пероксидазы способны выходить на поверхность клетки и создавать участки, которые менее уязвимы для проникновения грибного патогена, а АФК является не только фактором разрушения и триггером апоптоза клетки, но и индуктором защитных реакций. В результате внутриклеточный гетерологичный АМП в определенных концентрациях может индуцировать процессы, которые, не принося серьезного вреда клеткам растений, приводят их в состояние готовности (преадаптации) к окислительному стрессу, как это показано для трансгенных растений риса в [13].

Заключение. Таким образом, было установлено, что в клетках трансгенных растений картофеля с геном АМП цекропин-мелиттинового типа, обладающих повышенной устойчивостью к грибным патогенам, в отсутствие фитопатогенной инфекции происходит активация гена пероксидазы. Так как пероксидазы участвуют в клеточных процессах, в которых задействованы АФК, то увеличение экспрессии гена данного фермента может косвенно свидетельствовать о повышенном образовании АФК в клетках трансгенных растений. Конститутивно повышенный уровень пероксидазы и АФК в клетках исследуемых трансгенных растений может вносить вклад в развитие специфической устойчивости по отношению к грибным патогенам. Полученные данные также свидетельствуют в пользу того, что механизмы антибиотического действия гетерологичных антимикробных пептидов в клетках растений могут включать не только прямое воздействие на клетки фитопатогенов, но и активацию защитной системы растения-хозяина.

Список использованных источников

1. Short Cationic Peptidomimetic Antimicrobials / R. Kuppusamy [et al.] // *Antibiotics* (Basel). – 2019. – Vol. 8, N 2. – P. 44. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020044>
2. Zasloff, M. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms: My Perspective / M. Zasloff // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2019. – Vol. 1117. – P. 3–6. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_1
3. Мусин, Х. Г. Антимикробные пептиды – потенциальная замена традиционным антибиотикам / Х. Г. Мусин // *Инфекция и иммунитет.* – 2018. – Т. 8, № 3. – С. 295–308. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-3-295-308>
4. Sinha, R. Antimicrobial Peptides: Recent Insights on biotechnological Interventions and future perspectives / R. Sinha, P. Shukla // *Protein Pept. Lett.* – 2019. – Vol. 26, N 2. – P. 79–87. <https://doi.org/10.2174/0929866525666181026160852>
5. Antimicrobial peptide simulations and the influence of force field on the free energy for pore formation in lipid bilayers / W. F. Bennett [et al.] // *J. Chem. Theory Comput.* – 2016. – Vol. 12, N 9. – P. 4524–4533. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.6b00265>
6. Ilyas, H. An approach towards structure based antimicrobial peptide design for use in development of transgenic plants: a strategy for plant disease management / H. Ilyas, A. Datta, A. Bhunia // *Curr. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 24, N 13. – P. 1350–1364. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170116124558>
7. Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology / E. Holaskova [et al.] // *Biotechnol. Adv.* – 2015. – Vol. 33, N 6. – P. 1005–1023. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.007>
8. Molecular farming of antimicrobial peptides: available platforms and strategies for improving protein biosynthesis using modified virus vectors / M. L. Leite [et al.] // *An. Acad. Bras. Ciênc.* – 2019. – Vol. 91, N 1. – P. e20180124. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820180124>
9. Antimicrobial peptide expression in a wild tobacco plant reveals the limits of host-microbe-manipulations in the field / A. Weinhold [et al.] // *eLife.* – 2018. – Vol. 7. – P. e28715. <https://doi.org/10.7554/elife.28715>
10. Yeung, A. T. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications / A. T. Yeung, S. L. Gellatly, R. E. Hancock // *CMLS.* – 2011. – Vol. 68, N 13. – P. 2161–2176. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0710-x>
11. Cavallarin, L. Cecropin A – derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens / L. Cavallarin, D. Andreu, B. San Segundo // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 1998. – Vol. 11, N 3. – P. 218–227. <https://doi.org/10.1094/mpmi.1998.11.3.218>
12. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens / M. Osusky [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 18, N 11. – P. 1162–1166. <https://doi.org/10.1038/81145>
13. Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression / S. Campo [et al.] // *Plant Biotechnol. J.* – 2008. – Vol. 6, N 6. – P. 585–608. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00339.x>
14. Трансгенные растения картофеля белорусских сортов, экспрессирующие гены антимикробных пептидов цекропин-мелиттинового типа / Н. Л. Вутто [и др.] // *Генетика.* – 2010. – Т. 46, № 12. – С. 1626–1634.
15. Jabs, T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals / T. Jabs // *Biochem. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 57, N 3. – P. 231–245. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00227-5](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00227-5)

References

1. Kuppusamy R., Willcox M., Black D. StC., Kumar N. Short Cationic Peptidomimetic Antimicrobials. *Antibiotics (Basel)*, 2019, vol. 8, no. 2, pp. 44. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020044>
2. Zasloff M. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms: My Perspective. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, vol. 1117, pp. 3–6. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_1
3. Musin Kh. G. Antimicrobial peptides – a potential replacement for traditional antibiotics. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 295–308 (in Russian). <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-3-295-308>
4. Sinha R., Shukla P. Antimicrobial Peptides: Recent Insights on biotechnological Interventions. *Protein & Peptide Letters*, 2019, vol. 26, no. 2, pp. 79–87. <https://doi.org/10.2174/0929866525666181026160852>
5. Bennett W. F., Hong C. K., Wang Y., Tieleman D. P. Antimicrobial peptide simulations and the influence of force field on the free energy for pore formation in lipid bilayers. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2016, vol. 12, no. 9, pp. 4524–4533. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.6b00265>
6. Ilyas H., Datta A., Bhunia A. An Approach Towards Structure Based Antimicrobial Peptide Design for Use in Development of Transgenic Plants: A Strategy for Plant Disease Management. *Current Medicinal Chemistry*, 2017, vol. 24, no. 13, pp. 1350–1364. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170116124558>
7. Holaskova E., Galuszka P., Frebort I., Tufan Oz M. Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnology Advances*, 2015, vol. 33, no. 6, pp. 1005–1023. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.007>
8. Leite M. L., Sampaio K. B., Costa F. F., Franco O. L., Dias S. C., Cunha N. B. Molecular farming of antimicrobial peptides: available platforms and strategies for improving protein biosynthesis using modified virus vectors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2019, vol. 91, no. 1, pp. e20180124. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820180124>
9. Weinhold A., Dorcheh E. K., Li R., Rameshkumar N., Baldwin I. T. Antimicrobial peptide expression in a wild tobacco plant reveals the limits of host-microbe-manipulations in the field. *eLife*, 2018, vol. 7, p. e28715. <https://doi.org/10.7554/elife.28715>
10. Yeung A. T., Gellatly S. L., Hancock R. E. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, vol. 68, no. 13, pp. 2161–2176. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0710-x>
11. Cavallarin L., Andreu D., San Segundo B. Cecropin A – derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1998, vol. 11, no. 3, pp. 218–227. <https://doi.org/10.1094/mpmi.1998.11.3.218>
12. Osusky M., Zhou G., Osuska L., Hancock R. E., Kay W. W., Misra S. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature biotechnology*, 2000, vol. 18, no. 11, pp. 1162–1166. <https://doi.org/10.1038/81145>
13. Campo S., Manrique S., Garca-Martnez J., San Segundo B. Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, vol. 6, no. 6, pp. 585–608. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00339.x>
14. Vutto N. L., Gapeeva T. A., Pundik A. N., Tretyakova T. G., Volotovskii I. D. Transgenic Belarussian-Bred Potato Plants Expressing the Genes for Antimicrobial Peptides of the Cecropin-Melittin Type. *Russian Journal of Genetics*, 2010, vol. 46, no. 12, pp. 1433–1439. <https://doi.org/10.1134/s1022795410120057>
15. Jabs T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochemical Pharmacology*, 1999, vol. 57, no. 3, pp. 231–245. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00227-5](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00227-5)

Информация об авторах

Мисюкевич Алла Юрьевна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: alla.misyukevich.91@mail.ru.

Гареева Тамара Александровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Gapeeva@ibp.org.by.

Третьякова Татьяна Геннадиевна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь).

Семанюк Тамара Владимировна – ст. науч. сотрудник. НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству (ул. Ковалева, 2а, 223013, Самохваловичи, Минский р-н, Минская обл., Республика Беларусь). E-mail: safto@rambler.ru.

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: volotovskii@yahoo.com.

Information about the authors

Misiukevich Ala Yu. – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alla.misyukevich.91@mail.ru.

Gapeeva Tamara A. – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Gapeeva@ibp.org.by.

Tretyakova Tatiana G. – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

Semanyuk Tamara V. – Senior Researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus on Potato and Fruit and Vegetable Growing (2a, Kovalev Str., 223013, Samokhvalovichi, Minsk district, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: safto@rambler.ru.

Volotovskii Igor D. – Academician, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volotovskii@yahoo.com.