

*N. V. SVERCHKOVA¹, T. V. ROMANOVSKAYA¹, N. V. EVSEGNEEVA¹,
G. V. ZHUK¹, E. I. KOLOMIETS¹, O. N. KUZMINA¹, V. YU. AGEETS²,
S. M. DEGTYARIK², E. V. MAKSIMJUK²*

**TECHNOLOGY OF PRODUCTION AND APPLICATION
OF PROBIOTIC EMILIN FOR PREVENTION
OF INFECTIOUS DISEASES IN CARP FISH SPECIES**

*¹Institute of Microbiology, National Academy of Sciences,
Minsk, Belarus, microbio@mbio.bas-net.by*

*²Institute of Fishery, National Academy of Sciences,
Minsk, Belarus, belniirh@tut.by*

Technology of producing probiotic preparation intended for commercial pisciculture was developed and scaled up to pilot plant level at Biotechnological Center, Institute of Microbiology, NAS Belarus. Production trials of probiotic were completed and application guidelines were formulated. It was shown that probiotic decreased contamination of carp internal organs with pathogenic and saprophytic microbiota, activated non-specific resistance systems and enhanced post-winter survival rate of fish species.

Поступила 05.04.2016 г.

УДК 577.29+632.938.2

*Л. Ю. ЧЕБОТАРЁВ¹, С. В. ЧУБАНОВА¹,
М. Н. МАНДРИК-ЛИТВИНКОВИЧ¹, В. Н. КУПЦОВ¹,
Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ¹, Е. А. НИКОЛАЙЧИК²*

**СОЗДАНИЕ БИБЛИОТЕКИ ГЕНОВ,
КОДИРУЮЩИХ ХАРПИНЫ
ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ,
С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ ФИТОПРОТЕКТОРНЫХ
СРЕДСТВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ**

*¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
lev.chebotarev@gmail.com*

*²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
nikolaichik@bio.bsu.by*

Получена библиотека генов харпинов различных бактерий родов *Pectobacterium* и *Xanthomonas* в составе плазмиды pJET1.2 и проведено клонирование этих генов в составе векторов pET42a(+) и pFLAG-СТС в клетках бактерий *E. coli* XL1-Blue, проведена их сверхэкспрессия. Фитопротекторные свойства

харпинов были проверены на растениях люпина желтого (защита от антракноза) и томата (защита от фузариоза). Полученные результаты демонстрируют потенциал создания на этой основе биологически активных белковых препаратов для защиты растений.

Введение. Защита растений от патогенов – актуальное направление биотехнологических исследований во многих странах мира, включая Республику Беларусь. С помощью традиционных методов селекции далеко не всегда удается получить устойчивые сорта, обладающие достаточной урожайностью. Использование химических средств защиты оказывает неблагоприятное воздействие на состояние здоровья человека и наносит ощутимый вред окружающей среде. Поэтому тенденцией последних десятилетий во всем мире является разработка фитопротекторных средств, активирующих естественный защитный потенциал растений, в результате чего повышается общая неспецифическая устойчивость к патогенам.

Иммунная система растений состоит из нескольких связанных между собой уровней, каждый из которых осуществляет реакцию на специфические раздражители.

Начальный уровень защиты представлен основным неспецифическим иммунитетом растения, который индуцируется группой консервативных молекул патогена, таких как липополисахариды грамотрицательных бактерий, факторы элонгации EF-Tu, пептидогликаны грамположительных бактерий, белки холодового шока и некоторые типы флагеллина [1–5]. Растение распознает эти молекулы с помощью расположенных в плазматической мембране рецепторов, которые также могут распознавать и специфические продукты растительного происхождения, возникающие при разрушении растительных клеток [6]. Стоит заметить, что запустить основной иммунитет могут также бактерии, непатогенные для данного растения, убитые либо мутировавшие микроорганизмы, например, утратившие способность к маскировке [3]. Основная функция такого иммунитета состоит в предотвращении инвазивного проникновения патогенов в ткани растения.

Иммунитет второго уровня является эффектор-активируемым и предназначен для сдерживания роста и развития патогена,

который смог успешно подавить основной иммунитет путем доставки в растительную клетку специализированных эффекторных молекул [4]. Появление эффекторных белков в некоторых случаях может детектироваться специальными белками растения (R-белками), что, как правило, приводит к развитию реакции гиперчувствительности (или сверхчувствительности), представляющей собой локальную гибель инфицированных клеток. Такая реакция препятствует распространению патогена за область первичного заражения [3]. Результатом локальной активации основного и/или эффектор-активированного иммунитета обычно является запуск системной приобретенной устойчивости. Наличие данного типа устойчивости к фитопатогенам известно достаточно давно [7], однако сам термин был предложен только в 1961 г. Ф. Россом [8], который установил, что после заражения части растения табака вирусом табачной мозаики растение целиком остается устойчивым к этому и другим патогенам на протяжении как минимум 20 дней [9]. Сегодня известно, что локальное инфицирование патогеном приводит к продукции мобильных иммунных сигналов [10], которые транспортируются по сосудистой системе к неинфицированным тканям растения, где индуцируют накопление ключевой сигнальной молекулы – салициловой кислоты, что приводит к продукции широкого ряда белков, связанных с патогенезом (PR-белков) [8], а также модификациям хроматина, увеличивающим экспрессию генов иммунитета, и к соматическим гомологичным рекомбинациям, что в совокупности выражается в формировании наследуемой иммунной памяти [8–10].

Жизненный цикл фитопатогенных микроорганизмов связан с необходимостью колонизировать растения и получать из них питательные элементы и воду, вследствие чего фитопатогены приспособились обходить иммунные барьеры растений, используя для этого целый ряд веществ различного происхождения. Для достижения высокой эффективности доставки факторов вирулентности патогенные бактерии обладают специализированными системами секреции. На сегодняшний день выделяют как минимум 9 типов систем секреции грамотрицательных и грам-

положительных бактерий [11, 12]. Система секреции третьего типа (ССТТ или ССЗТ) используется для доставки внутрь растительной клетки эффекторов, а также для секреции харпинов, функционирующих снаружи растительной клетки. Гены фитопатогенных бактерий, относящиеся к ССТТ, имеют сокращение *hrp* или *hrc* (от англ. hypersensitive response and pathogenesis – реакция гиперчувствительности и патогенность, «*hrp conserved*» – консервативные *hrp*) [13]. Было обнаружено, что данные гены входят в состав больших генных кластеров, которые кодируют компоненты аппарата секреции и белки, выполняющие вспомогательные и регуляторные функции [3, 14].

Одним из вспомогательных классов белков ССТТ являются харпины. Это в основном кислые термостабильные белки, аминокислотная последовательность которых обладает общими характерными чертами [15]. Большинство из них содержат более 15% глицина, который часто представлен в виде компактных, богатых глицином участков; около 10% серина; одиночные остатки цистеина, которые встречаются только у некоторых белков; и несколько остатков ароматических аминокислот. Вторичная структура харпинов отличается наличием нескольких участков α -спиралей. Размер харпинов составляет примерно 300–400 аминокислот, однако харпины бактерий рода *Xanthomonas* spp. имеют значительно меньшие размеры (от 114 до 139 а. о.). Среди изученных харпинов часть белков, например, HrpN_{Ea}, HrpZ1_{Pst}, HrpZ_{Ps}, Hra1_{Xcc}, состоят из единственного канонического домена, в то время как ряд харпинов несут дополнительный домен на С-конце, который представляет собой литическую трансгликозилазу (LT, lytic transglycosylase), как, например, у харпинов HrpP1_{Pst}, HrpH_{Xcv}, Hra2_{Xoo}; либо пектатлиазу (PL, pectate lyase) – HrpW_{Ea}, PopW_{Rs}, [15–17]. Домен LT участвует в контролируемом разрушении пептидогликанового слоя, тем самым способствуя процессу окончательной сборки аппарата ССТТ [17]. В свою очередь харпины, обладающие PL доменом, необходимы при прохождении пилуса сквозь стенку растительной клетки [17]. С-концевой домен этих харпинов является характерным представителем пектатлиаз семейства PL3 (от англ. polysaccharide

lyase family 3). Показано, что PL3 фрагмент способен связываться с пектатом кальция, ключевой составляющей клеточной стенки растений [18], однако как для данного фрагмента, так и для большинства PL-харпинов, за редким исключением [19, 20], не было выявлено наличие пектинразрушающей активности. По всей видимости, вспомогательные свойства харпинов реализуются за счет участия в формировании эффектор-специфичных транслокационных комплексов, пор в плазматической мембране, а также эффективном прикреплении патогена к поверхности растительной клетки [15, 17, 21].

К настоящему времени имеется множество примеров использования харпинов для индукции защитного ответа растений [22–33]. Реакция растений на белки ССТТ, к которым также относятся харпины, как правило, приводит к развитию системной приобретенной устойчивости, которая распространяется не только на фитопатогены бактериального происхождения, но и на грибы, вирусы и насекомых [15]. Также при обработке харпинами отмечается ускоренное развитие растений [23, 27].

Цель исследования – создание ряда генетических конструкций, несущих гены *hrpN*, *hrpW*, *xopF1* и *hpaI* фитопатогенных бактерий родов *Pectobacterium* и *Xanthomonas*, и использование в дальнейшем полученных плазмид для сверхэкспрессии целевых белков, что позволит изучить свойства соответствующих харпинов и их влияние на иммунный статус модельных растений, а также создать на их основе фитопротекторные средства.

Материалы и методы. Характеристики использованных в работе бактериальных штаммов и плазмид приведены в табл. 1.

Бактериальные культуры фитопатогенных бактерий и *E. coli* выращивали соответственно при 28 и 37 °С. Бактерии культивировали в жидкой питательной среде LB-Miller («Conda», #1551) или на агаризованной питательной среде LB-Lennox («Conda», #1083).

Коммерческие препараты антибиотиков использовали в концентрациях (мкг/мл): ампициллин 50; канамицин 15.

Выделение тотальной ДНК осуществляли с помощью набора Bacteria DNA Preparation Kit («Jena Bioscience», PP-206S).

Таблица 1. Штаммы и плазмиды, использованные в работе

Штамм/Плазида	Характеристика	Источник
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	F ⁺ <i>proAB lacI^f lacZΔM15 Tn10(Tet^r)/ recA1 endA1 gyrA96(Nal^r) thi-1 hsdR17(r⁻ m⁺ k⁺) supE44 relA1 lac</i>	[34]
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>dcm ompT hsdSB(r_B⁻, m_B⁻) gal lon λ(DE3)</i>	[35]
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> 21A	Природный штамм, изолирован из клубня картофеля	Коллекция Евтушенкова А. Н.
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> 36A	Природный штамм, изолирован из клубня картофеля	Коллекция Евтушенкова А. Н.
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> 3-2	Природный штамм, изолирован из клубня картофеля	Коллекция Лысака В. В.
<i>Pectobacterium carotovorum</i> 20.1	Природный штамм, изолирован из томата сорта Раиса	Коллекция Мямина В. Е.
<i>Pectobacterium carotovorum</i> 25.1	Природный штамм, изолирован из томата сорта Барселона	Коллекция Мямина В. Е.
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> 2.5	Природный штамм, изолирован из белокочанной капусты сорта Белорусская	Коллекция Мямина В. Е.
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> 5.1	Природный штамм, изолирован из белокочанной капусты сорта Мара	Коллекция Мямина В. Е.
pJET1.2/blunt	Ap ^r P _{lacUV5} <i>eco47IR</i> oriV _{ColE1} 2974 н.п.	Thermo Scientific (#K1231, #K1232)
pET-42a(+)	Km ^R <i>lacI</i> oriV _{ColE1} P _{T7} <i>flori</i> GST-Tag, His-Tag, S-Tag 5930 н. п.	Novagen (70561)
pFLAG-CTC	P _{lac} -RBS-MCS-FLAG <i>lacI^f</i> Ap ^r oriV _{ColE1} <i>flori</i> 5345 н. п.	Sigma (E8408)
pJhrpN3-2:7	pJET1.2 со вставкой гена <i>hrpN</i> штамма <i>P. atrosepticum</i> 3-2	Получена в этой работе
pJ20.1N:26	pJET1.2 со вставкой гена <i>hrpN</i> штамма <i>P. carotovorum</i> 20.1	Получена в этой работе
pJ25.1N:2	pJET1.2 со вставкой гена <i>hrpN</i> штамма <i>P. carotovorum</i> 25.1	Получена в этой работе
pJ5.1N:3	pJET1.2 со вставкой гена <i>hrpN</i> штамма <i>X. c. pv. campestris</i> 5.1	Получена в этой работе
pJhrpN2.5:2	pJET1.2 со вставкой гена <i>hrpN</i> штамма <i>X. c. pv. campestris</i> 2.5	Получена в этой работе

Штамм/Плазмида	Характеристика	Источник
pJ2.16W:2	pJET1.2 со вставкой гена <i>hrpW</i> штамма <i>P. carotovorum</i> 2.16	Получена в этой работе
pJ2.18W:1	pJET1.2 со вставкой гена <i>hrpW</i> штамма <i>P. carotovorum</i> 2.18	Получена в этой работе
pJ20.1W:6	pJET1.2 со вставкой гена <i>hrpW</i> штамма <i>P. carotovorum</i> 20.1	Получена в этой работе
pJ25.1W:1	pJET1.2 со вставкой гена <i>hrpW</i> штамма <i>P. carotovorum</i> 25.1	Получена в этой работе
pJ5.1W:103	pJET1.2 со вставкой гена <i>hrpW</i> штамма <i>X. c. pv. campestris</i> 5.1	Получена в этой работе
pJ2.5W:3	pJET1.2 со вставкой гена <i>hrpW</i> штамма <i>X. c. pv. campestris</i> 2.5	Получена в этой работе
pJhpa1_5.1:26	pJET1.2 со вставкой гена <i>hpaI</i> штамма <i>X. c. pv. campestris</i> 5.1	Получена в этой работе
pJhpa1_2.5:17	pJET1.2 со вставкой гена <i>hpaI</i> штамма <i>X. c. pv. campestris</i> 2.5	Получена в этой работе
pEThrpN21A	pET42a(+) со вставкой гена <i>hrpN</i> штамма <i>P. atrosepticum</i> 21A	Получена в этой работе
pEThrpN36A	pET42a(+) со вставкой гена <i>hrpN</i> штамма <i>P. atrosepticum</i> 36A	Получена в этой работе
pEThrpN3-2-1	pET42a(+) со вставкой гена <i>hrpN</i> штамма <i>P. atrosepticum</i> 3-2	Получена в этой работе
pEThrpN20.1(26)-3	pET42a(+) со вставкой гена <i>hrpN</i> штамма <i>P. carotovorum</i> 20.1	Получена в этой работе
pEThrpN5.1(3)-4	pET42a(+) со вставкой гена <i>xopF1</i> штамма <i>X. c. pv. campestris</i> 5.1	Получена в этой работе
pEThrpN2.5(2)	pET42a(+) со вставкой гена <i>xopF1</i> штамма <i>X. c. pv. campestris</i> 2.5	Получена в этой работе
pEThrpW25.1(1)-11	pET42a(+) со вставкой гена <i>hrpW</i> штамма <i>P. carotovorum</i> 25.1	Получена в этой работе
pEThrpW2.5(3)-55	pET42a(+) со вставкой гена <i>hrpW</i> штамма <i>X. c. pv. campestris</i> 2.5	Получена в этой работе
pEThpaI _{xcc}	pET42a(+) со вставкой гена <i>hpaI</i> штамма <i>X. c. pv. campestris</i> 5.1	Получена в этой работе
pFLhrpN3-2-3.10	pFLAG-CTC со вставкой гена <i>hrpN</i> штамма <i>P. atrosepticum</i> 3-2	Получена в этой работе

Штамм/Плазмида	Характеристика	Источник
pFLhrpN20.1(26)-1	pFLAG-CTC со вставкой гена <i>hrpN</i> штамма <i>P. carotovorum</i> 20.1	Получена в этой работе
pFLhrpN5.1(3)-3	pFLAG-CTC со вставкой гена <i>xopFI</i> штамма <i>X. c. pv. campestris</i> 5.1	Получена в этой работе
pFLhrpN2.5(100)-1	pFLAG-CTC со вставкой гена <i>xopFI</i> штамма <i>X. c. pv. campestris</i> 2.5	Получена в этой работе
pFLhrpW25.1(1)-1	pFLAG-CTC со вставкой гена <i>hrpW</i> штамма <i>P. carotovorum</i> 25.1	Получена в этой работе
pFLhrpW2.5(3)-1	pFLAG-CTC со вставкой гена <i>hrpW</i> штамма <i>X. c. pv. campestris</i> 2.5	Получена в этой работе
pFLhpa1-1	pFLAG-CTC со вставкой гена <i>hpaI</i> штамма <i>X. c. pv. campestris</i> 5.1	Получена в этой работе

Выделение плазмидной ДНК осуществляли по методике, описанной в работе Бирнбойма [36] с модификациями. Выделение плазмидной ДНК для последующего секвенирования выполнялось с использованием набора Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep («Jena Bioscience», PP204-L).

Определение концентрации ДНК выполняли по стандартной методике производителя на спектрофотометре «NanoPhotometer® P330» («Implen»).

Подбор праймеров для проведения ПЦР осуществляли с использованием известных и полученных нами ранее данных о первичной структуре ДНК [37, 38]. Расчет температур плавления и возможности образования шпилечных структур в олигонуклеотидных праймерах осуществлялся с помощью программы «Олиго-Кальк» [39]. Проверку специфичности олигонуклеотидных праймеров осуществляли с помощью программы PrimerBlast [40]. Последовательности использованных праймеров приведены в табл. 2.

ПЦР проводили в объеме 15 мкл, который включал десятую часть конечного объема реакционной смеси 10-кратного АМ-буфера (650 ммоль Трис-НCl, 166 ммоль (NH₄)₂SO₄, 20 ммоль MgCl₂, 0,2% Твин 20, pH 8,8), смесь четырех дезоксирибонуклеозид-

трифосфатов (концентрация каждого 0,8 ммоль), по 0,25 мкмоль каждого из праймеров, 30–60 нг матричной ДНК и 2 ед. активности *Pfu*-полимеразы. Параметры амплификации задавали следующие: 5 мин при 96 °С; 10 с при 96 °С, 20 с при 50–60 °С, 30 с при 72 °С – 35 циклов; 3 мин при 72 °С. Векторные конструкции рЕТhrpN21А и рЕТhrpN36А получали с помощью «перекрывающейся ПЦП» [41], параметры которой были следующими: 5 мин при 98 °С; 5 с при 98 °С, 5 с при 60 °С, 4,5 мин при 72 °С – 20 циклов; 3 мин при 72 °С. В реакционную смесь объемом 10 мкл добавляли по 30 фмоль ДНК матрицы, 1 мкл 10-кратного АМ-буфера, 0,8 ммоль смеси четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов и 2 ед. активности *Pfu*-полимеразы.

Таблица 2. Характеристика использованных праймеров

Праймер	Последовательность нуклеотидов (5'→3')	Температура отжига, °С	Сайт рестрикции	Назначение
21A-N-F _p	ttaagaaggagatatacatatgcttaattctcttggtg	53	–	пПЦП
21A-N-R _p	tggtgatggtgactgctcactggcagcttttcagcc	53	–	<i>hrpN_{Pa}</i>
PC21-W-F	gatCATATGctgatatgacgatcac	53	NdeI	<i>hrpW_{Pc}</i>
PC21-W-R	atcGTTCGACtacttcacctgtaagttg	53	SalI	
21A-N-F	acgCATATGcttaattctcttggtg	55	NdeI	<i>hrpN_{Pa3-2}</i> , <i>hrpN_{Pc}</i>
PC21-N-R	atcGTTCGACgctggagagcttttgc	55	SalI	<i>hrpN_{Pc}</i>
3-2-N-R	atcGTTCGACtagctggagagcttctcaac	45	SalI	<i>hrpN_{Pa3-2}</i>
B100-W-F	atgCATATGctgacgtactgcatgc	55	NdeI	<i>hrpW_{Xcc}</i>
B100-W-R	atcGTTCGACtcagccgctgtagggctg	55	SalI	
B100-1-F	tcaCATATGcatccagttcaaccac	58	NdeI	<i>hpa1_{Xcc}</i>
B100-1-R	atcGTTCGACtcagcttggccggtgatg	58	SalI	
B100-N-F	tgcCATATGatcgactgggacagc	59	NdeI	<i>xopF1_{Xcc}</i>
B100-N-R	atcGTTCGACtcacggccgcccattctc	59	SalI	
pET42linF	catatgtatatctccttctaaagttaacaaaatta tttctagag	60	–	пПЦП
pET42linR	gagcatcaccatcaccaccaccactaattg	60	–	
pJET-F	cgactcactatagggagagcggc	51	–	Секвенирование

Праймер	Последовательность нуклеотидов (5'→3')	Температура отжига, °С	Сайт рестрикции	Назначение
pJET-R	aagaacatcgattttccatggcag	51	–	Секвенирование
T7-Pro-Seq	taatacgaactcactataggg	49	–	Секвенирование
T7-Ter-Seq	gctagtattgctcagcgg	49	–	Секвенирование
N26	catcataacggttctgccaatattc	52	–	Секвенирование
C24	ctgtatcaggctgaaaattcttc	52	–	Секвенирование

Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 0,8%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0,05 мкг/мл. Результаты электрофоретического разделения нуклеиновых кислот фиксировали с помощью системы гель-документации ChemiDoc MP System («Bio-Rad»).

Трансформацию *E. coli* плазмидной ДНК осуществляли методом электропорации с использованием прибора «MicroPulser» («Bio-Rad», США) и кюветы с расстоянием между электродами 1 мм при следующем режиме: напряжение 1,8 кВ в течение 5 мс.

Планирование генно-инженерных манипуляций выполняли с помощью программы-редактора последовательностей ДНК SQ [42].

Рестрикция и лигирование проводились согласно протоколам фирм производителей ферментов («Thermo Scientific» и «NEB»).

Для секвенирующей реакции использовали набор реактивов DNA Cycle Sequencing Kit («Jena Bioscience», PCR-401S) и меченые Cy5.5 праймеры pJET-F, pJET-R, T7-Pro-Seq, T7-Ter-Seq, N26 и C24 («Праймтех»). Детекцию продуктов секвенирующей реакции осуществляли с помощью автоматического ДНК-анализатора «4300 DNA Analyzer» («LI-COR Biosciences»). Результаты анализировали с использованием программного пакета

eSeq V.3.1.10 («LI-COR Biosciences»). Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с доступными последовательностями из базы данных ГенБанк проводили с помощью программы BLASTN 2.3.1 [43].

Сверхэкспрессию генов, полученных в составе векторов pET42a(+) и pFLAG-CTC, проводили в коммерческих штаммах *E. coli* BL21(DE3) и *E. coli* XL1-Blue соответственно. Ночные культуры трансформированных клеток выращивали до $OD_{600} \approx 0,6-1$, затем добавляли индуктор (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид в конечной концентрации 0,4 ммоль) и продолжали инкубировать в течение 3–4 ч при +37 °C и 160 об/мин. Полученную после центрифугирования клеточную массу отмывали в K/Na-фосфатном буфере (pH 7,4), подвергали ультразвуковой дезинтеграции с помощью «Sonifier 450» («Branson») в режиме: 2 мин с амплитудой 60% и мощностью 10 Вт (повторение 3 раза), при этом все манипуляции проводились на льду. Об успешном прохождении лизиса клеток судили по просветлению суспензий. Далее образцы подвергали центрифугированию 10 000 g в течение 3 мин. Осадок представлял собой клеточный дебрис, тельца включения и нерастворимые белки; супернатант – фракцию растворимых белков. Полученные суспензии анализировали после проведения вертикального электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПАГЭ) и окрашивания Кумасси бриллиантовым синим G-250. Результаты электрофоретического разделения белков документировали с помощью ChemiDoc MP System («Bio-Rad»). Полученное изображение обрабатывалось и оцифровывалось с помощью программы Image Lab Software V. 5.0 («Bio-Rad»). Общую концентрацию белка измеряли при длине волны 280 нм с помощью «NanoPhotometer® P330» («Implen»).

Фитозащитное действие харпинов в отношении гриба *Fusarium oxysporum*, возбудителя корневых гнилей, изучали на проростках томата (*Solanum lycopersicum*) сорта Беркут во влажных камерах в чашках Петри. Для этого семена обрабатывали в течение 3 мин споровой суспензией фитопатогенного гриба *Fusarium oxysporum* 2КГ (10^6 спор/мл), после чего помещали в чашки Петри и оставляли на 1 ч при комнатной температуре. Затем

семена замачивали в течение 3 мин в 1%-ном растворе препаратов харпинов и проращивали 14 сут при комнатной температуре. В контрольном варианте для замачивания семян использовали воду. Степень пораженности проростков оценивали по пятибалльной шкале, где 1 балл – отсутствие симптомов болезни, 5 баллов – полная гибель проростков.

Фитозащитное действие харпинов в отношении гриба *Colletotrichum lupini* – возбудителя антракноза люпина, изучали на проростках люпина желтого (*Lupinus luteus*). Для этого естественно инфицированные семена замачивали в течение 1 мин в 1%-ном водном растворе харпинов. Набухшие семена высевали в сосуды с почвой и проращивали при комнатной температуре. Учет пораженных проростков проводили на стадии одной пары настоящих листьев. В качестве контроля использовали семена, замоченные в водопроводной воде. Степень поражения проростков болезнью оценивали по 9-балльной шкале: 1 – поражение отсутствует; 3 – на проростке коричневые в виде штрихов некрозы; 5 – на проростке а) язва без разрыва, охватывающая до 1/2 окружности проростка, б) на семядоле маслянистое пятно, впоследствии оно приобретает коричневую окраску, в) увядание развивающихся настоящих листьев; 7 – на проростке язва с разрывом, охватывающая 2/3 окружности проростка; 9 – а) язва охватывает всю окружность проростка, б) мацерация проростка; в) гибель проростка.

Развитие болезни вычисляли по формуле (1):

$$R = (\sum ab \times 100) / (N \times k), \quad (1)$$

где R – развитие болезни, %; ab – произведение числа растений (a) на соответствующий им балл поражения (b); N – количество взятых для учета растений; k – наивысший балл шкалы, по которой делалась оценка поражения в опыте.

Биологическую эффективность рассчитывали по показателю развития болезни или степени поражения по формуле (2):

$$Б. \text{ э.} = (Пк - По) \times 100 / Пк, \quad (2)$$

где Б. э. – биологическая эффективность, %; $Пк$ – процент развития или степень поражения растений в контроле; $По$ – процент развития или степень поражения на опытном участке.

Результаты и обсуждение. В работе использовались штаммы грамотрицательных фитопатогенных бактерий, обладающих ССТТ, которые в разные годы были выделены на территории Республики Беларусь. Эти штаммы были генотипированы нами ранее путем секвенирования произвольных участков геномной ДНК [38], совпадение нуклеотидных последовательностей которых с последовательностями депонированными в базе данных ГенБанк составило 92–99%. Последовательности ДНК штаммов *P. atrosepticum* 21A [37] и 36A (неопубликованные данные) были определены с помощью полногеномного секвенирования, вследствие чего для генов харпинов *hrpN*_{Pa21A} и *hrpN*_{Pa36A} были разработаны праймеры (в табл. 2 они отмечены символом «р» в нижнем индексе), позволяющие проводить «перекрывающуюся ПЦР» (пПЦР) с линейаризованным вектором рЕТ-42a(+). Таким образом, данные генотипирования использованных в работе штаммов позволили разработать высокоспецифичные праймеры для амплификации генов харпинов. В результате их применения были получены ампликоны генов *hrpN*_{Pa21A}, *hrpN*_{Pa36A}, *hrpN*_{Pa3-2}, *hrpN*_{Pc20.1}, *hrpN*_{Pc25.1}, *xopF1*_{Xcc2.5}, *xopF1*_{Xcc5.1}, *hrpW*_{Pc2.16}, *hrpW*_{Pc2.18}, *hrpW*_{Pc20.1}, *hrpW*_{Pc25.1}, *hrpW*_{Xcc2.5}, *hrpW*_{Xcc5.1}, *hpaI*_{Xcc2.5} и *hpaI*_{Xcc5.1} из соответствующих штаммов. Данные гены были выбраны в качестве потенциально эффективных элиситоров защитных реакций растений на основании анализа литературных источников, где описывается изучение фитозащитных свойств продуктов экспрессии гомологичных генов харпинов. Несмотря на то, что выбранные гены харпинов одного типа принадлежат близкородственным штаммам, согласно результатам секвенирования они содержат от одной до нескольких отличающих их друг от друга аминокислотных замен, что предоставляет возможность исследовать влияние состава первичной структуры белка на эффект, оказываемый данным белком на растение.

После амплификации последовательностей ДНК с помощью высокоточной *Pfu*-полимеразы их клонировали по тупым концам в составе коммерческого вектора рJET1.2/Blunt в штамме *E. coli* XL1-Blue. Выделенную из трансформированных бактерий плазмидную ДНК проверяли на наличие вставки необходимого размера с помощью обработки эндонуклеазой рестрикции BglII.

В случае наличия вставки ДНК ожидаемого размера, генетические конструкции секвенировали с помощью праймеров рJET-F и рJET-R. Было показано, что степень идентичности с последовательностями ДНК, кодирующими харпины, из базы данных ГенБанк составила 99–100%.

Последовательности генов, которые были прочитаны с минимальным количеством ошибок и не содержали нехарактерных однонуклеотидных замен, были выбраны для последующего клонирования в экспрессионных векторах. С этой целью плазмидную ДНК конструкций на основе вектора рJET1.2 (см. табл. 2) обрабатывали с помощью рестриктаз NdeI и SalI и проводили лигирование по липким концам с линейаризованными векторами рЕТ-42a(+) и рFLAG-СТС. Клетки штаммов бактерий *E. coli* BL21(DE3) и *E. coli* XL1-Blue трансформировали продуктами лигазной реакции и высевали на селективную среду с канамицином или ампициллином соответственно. Секвенирование полученных генетических конструкций показало полное отсутствие нуклеотидных замен в целевых генах и правильное их расположение относительно регуляторных элементов экспрессионной кассеты.

Векторные системы рЕТ-42a(+) и рFLAG-СТС были выбраны нами, поскольку являются основой для многих высокоэффективных экспрессионных конструкций и обладают некоторыми важными отличиями. В составе плазмиды рFLAG-СТС клонированные нами гены находятся под контролем гибридного *tac*-промотора, использование которого не требует специальной полимеразы и экспрессионного штамма [44], в отличие от конструкций на основе фагмиды рЕТ-42a(+), в которых экспрессионная кассета содержит T7-промотор и может быть экспрессирована только в штаммах, рекомбинантных по гену T7-РНК-полимеразы, например, *E. coli* BL21(DE3) [45].

Как уже упоминалось выше, нам была известна точная последовательность ДНК штаммов *P. atrosepticum* 21A и 36A. Это позволило разработать праймеры для пПЦР, обеспечивающие при клонировании включение в состав генов харпинов октагистидинового фрагмента плазмиды рЕТ-42a(+), что делает воз-

возможным очистку получаемых белков методом аффинной хроматографии (рис. 1).

По этой причине для проведения аналитической и затем препаративной экспрессии нами были выбраны генетические конструкции, полученные с помощью пПЦР, а также рЕТhrpN3–2–1, полученная рестриктазно-лигазным методом. В результате была продемонстрирована экспрессия двух белковых продуктов с приблизительным размером около 38 кДа и одного размером около 35 кДа (рис. 2). Размеры этих белков схожи с расчетными размерами предполагаемых продуктов генов *hrpN_{Pa21A}*, *hrpN_{Pa36A}* и *hrpN_{Pa3-2}*, с учетом включения в последовательность белков октагистидинового ярлыка. Стоит отметить, что на электрофореграмме заметна повышенная подвижность экспрессированных белков в полиакриламидном геле, что может быть объяснено типично высоким для харпинов содержанием аминокислоты глицина.

Для проверки влияния полученных растворов белков на растения было приготовлено 4 препарата с различным содержанием белка HrpN: № 1 – клетки штамма *E. coli* BL21(DE3); № 2 – клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) [pET-42a(+)]; № 3 – клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) [pEThrpN21A]; № 4 – клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) [pEThrpN36A]. Препараты представляли собой лизаты клеточного осадка, подвергнутого ультразвуковой дезинтеграции. Общая концентрация белка в полученных препаратах составила 23 мг/мл в объеме 40–50 мл, содержание целевого белка – около 50% на основании анализа электрофореграммы готовых препаратов (рис. 3). Затем была дана оценка эффективности использования растворов харпинов в качестве фитопротекторных средств с помощью слепого метода. Рабочая концентрация препаратов была выбрана по средним значениям в соответствии с литературными данными [46–48] и составила 100 мкг/мл.



Рис. 1. Изображение экспрессионной кассеты в плазмиде рЕТhrpN21А

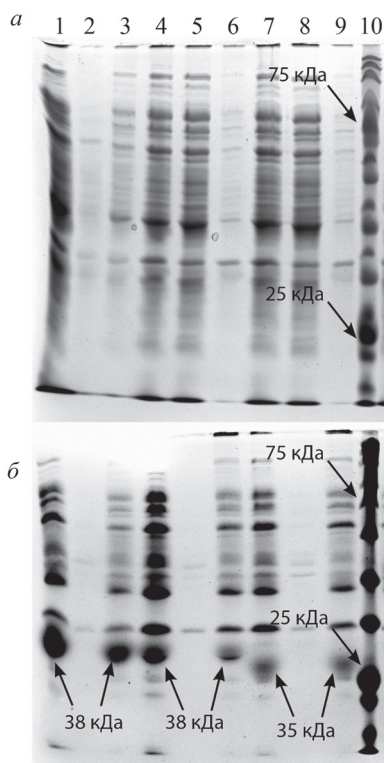
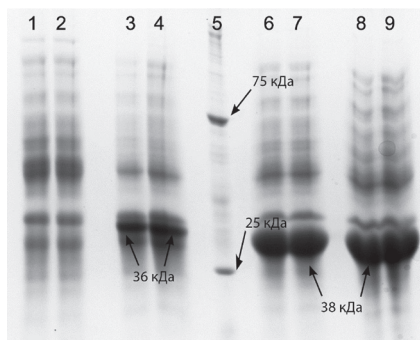


Рис. 2. Электрофоретическое разделение внутриклеточных белков бактерий *E. coli* BL21(DE3) с помощью ДСН-ПАГЭ: *a* – без добавления индуктора; *б* – с добавленным индуктором; 1, 4, 7 – лизат клеток, не подвергавшихся ультразвуковой дезинтеграции; 2, 5, 8 – супернатант клеточного лизата, полученного в результате ультразвуковой дезинтеграции; 3, 6, 9 – белки из осадка клеточного лизата, полученного в результате ультразвуковой дезинтеграции; 1, 2, 3 – штамм *E. coli* BL21(DE3) [pEThrpN21A]; 4, 5, 6 – штамм *E. coli* BL21(DE3) [pEThrpN36A]; 7, 8, 9 – штамм *E. coli* BL21(DE3) [pEThrpN3-2-1]; 10 – маркер молекулярного веса Blue Wide Range Protein Ladder (CSL-BBL, «Cleaver Scientific»)

Согласно полученным данным наибольшим фитозащитным эффектом в отношении антракноза люпина обладал препарат № 1, в результате действия которого развитие антракноза на проростках снизилось в 2,2 раза (рис. 4), а биологическая эффективность достигла 54%. Фитозащитное действие препаратов № 3 и № 4 было невысоким: развитие болезни уменьшилось в 1,1–1,2 раза, а биологическая эффективность составила 13–18%. Препарат № 2 не оказывал ингибирующего действия на развитие антракноза (табл. 3).

Фитозащитное действие белков-харпинов в отношении гриба *Fusarium oxysporum*, возбудителя корневых гнилей, изучали на проростках томата (сорт Беркут) во влажных камерах в чашках Петри. Согласно полученным данным всхожесть семян, обрабо-

Рис. 3. Электрофоретическое разделение препаратов харпинов с помощью ДСН-ПАГЭ: 1, 3, 6, 8 – лизат клеток, не подвергавшихся ультразвуковой дезинтеграции; 2, 4, 7, 9 – лизат клеток, подвергавшихся ультразвуковой дезинтеграции; 1, 2 – препарат № 1; 3, 4 – препарат № 2; 6, 7 – препарат № 4; 8, 9 – препарат № 3; 5 – маркер молекулярного веса Blue Wide Range Protein Ladder («Clever Scientific»)



а



б

Рис. 4. Развитие антракноза на проростках люпина желтого: а – проростки, сформировавшиеся из семян *Lupinus luteus*, инфицированных грибом *Colletotrichum lupini* (контроль); б – проростки, сформировавшиеся из семян *L. luteus*, инфицированных грибом *C. lupini*, и обработанные в течение 1 мин в 1%-ном водном растворе препарата № 1

таных белками-харпинами, превышала таковую зараженного *F. oxysporum* 2КГ контроля в 1,2–1,4 раза, а длина проростков – в 4–6 раз. Наибольшим фитозащитным эффектом обладали препараты № 1 и № 4, под действием которых развитие болезни снизилось в 1,8–1,9 раз. Биологическая эффективность составила 46 и 44% соответственно. Развитие болезни при обработке препаратами № 2 и № 3 составило 60 и 63% соответственно, что только в 1,4 и 1,3 раза ниже контрольных показателей, а биологическая эффективность составила 29 и 25% соответственно (табл. 4).

Таблица 3. Развитие антракноза на проростках *Lupinus luteus* под влиянием препаратов харпинов

Вариант	Развитие антракноза, %
Контроль (необработанные семена)	68
Семена, обработанные препаратом № 1	31
Семена, обработанные препаратом № 2	68
Семена, обработанные препаратом № 3	59
Семена, обработанные препаратом № 4	56

Таблица 4. Влияние белков-харпинов на всхожесть семян, развитие проростков томата и поражаемость их фузариозом

Вариант обработки семян	Всхожесть семян, %	Длина проростков, см	Развитие болезни, %
Контроль (H ₂ O)	80	69,1	40
Контроль (<i>F. oxysporum</i> 2КГ)	66	12,3	84
препарат № 1 + <i>F. oxysporum</i> 2КГ	80	48,6	45
препарат № 2 + <i>F. oxysporum</i> 2КГ	86	76,4	60
препарат № 3 + <i>F. oxysporum</i> 2КГ	86	78,9	63
препарат № 4 + <i>F. oxysporum</i> 2КГ	73	51,3	47

Сравнимое по эффективности действие препаратов, не содержащих в своем составе харпины, наиболее вероятно вызвано наличием там определенного количества собственных белков и других соединений экспрессионного штамма *E. coli* BL21(DE3), например флагеллина. Данные «посторонние» компоненты способны вызывать иммунный ответ, однако по характеру действия он будет отличаться от иммунного ответа, вызываемого попаданием на поверхность мембраны растительной клетки харпинов. В первом случае мы наблюдаем развитие неспецифического иммунного ответа, характерной реакции на вещества, присущие всем бактериальным клеткам, которые не обязательно являются фитопатогенными. Распознавание харпинов, в свою очередь, явно сигнализирует растению, что оно имеет дело с компонентом ССТТ фитопатогенных бактерий, которые представляют гораздо более серьезную угрозу, чем кишечная палочка.

Заключение. Создана библиотека генетических конструкций на основе плазмид pJET1.2, pET42a(+) и pFLAG-CTC, несущих

щих гены *hrpN*, *hrpW*, *xopF1* и *hpa1* фитопатогенных бактерий родов *Pectobacterium* и *Xanthomonas*, показана возможность сверхэкспрессии некоторых целевых генов и осуществлены предварительные эксперименты по проверке действия харпинов на растения. Полученные данные демонстрируют потенциал использования фитозащитных препаратов на основе белков харпинов. Лабораторные образцы показали высокую способность активировать иммунитет растений по отношению к фитопатогенным грибам. Таким образом, созданная библиотека ДНК, кодирующая субстраты секреторных систем фитопатогенных бактерий, пригодна для последующей разработки фитопротекторных средств нового поколения.

Работа выполнена в рамках Межгосударственной целевой программы ЕвразЭС «Инновационные биотехнологии в Республике Беларусь» на 2011–2015 гг. Выражаем благодарность А. Н. Евтушенкову, В. В. Лысаку и В. Е. Мямину за любезно предоставленные бактериальные штаммы.

Литература

1. Han, S. W. Secretion, modification, and regulation of Ax21 / S. W. Han, S. W. Lee, P. C. Ronald // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2011. – Vol. 14, № 1. – P. 62–67.
2. Immune receptor complexes at the plant cell surface. / H. Böhm [et al.] // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2014. – Vol. 20C. – P. 47–54.
3. Alfano, J. R. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense / J. R. Alfano, A. Collmer // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2004. – Vol. 42. – P. 385–414.
4. Mechanism of plant-microbe interaction and its utilization in disease-resistance breeding for modern agriculture / Y. Li [et al.] // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 2013. – Vol. 83. – P. 51–58.
5. Molecular plant immunity / ed. by G. Sessa. – Ames (Iowa): Wiley-Blackwell, 2013. – 283 p.
6. Boller, T. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors / T. Boller, G. Felix // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2009. – Vol. 60. – P. 379–406.
7. Systemic Acquired Resistance / J. A. Ryals [et al.] // *Plant Cell.* – 1996. – Vol. 8, N 10. – P. 1809–1819.
8. Pieterse, C. M. J. Induced Disease Resistance / C. M. J. Pieterse, S. C. M. Van Wees // *Principles of Plant-Microbe Interactions* / ed. by B. Lugtenberg. – Springer International Publishing, 2015. – P. 123–133.

9. Spoel, S. H. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells / S. H. Spoel, X. Dong // Nature Publishing Group. – 2012. – Vol. 12, N 2. – P. 89–100.

10. Shah, J. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance / J. Shah, J. Zeier // Front. Plant Sci. – 2013. – Vol. 4. – P. 1–15.

11. Chang, J. H. The ABCs and 123s of bacterial secretion systems in plant pathogenesis / J. H. Chang, D. Desveaux, A. L. Creason // Annu. Rev. Phytopathol. – 2014. – Vol. 52, N 5. – P. 317–45.

12. Beeckman, D. S. Bacterial secretion systems with an emphasis on the chlamydial Type III secretion system / D. S. Beeckman, D. C. Vanrompay // Curr. Issues Mol. Biol. – 2010. – Vol. 12, N 1. – P. 17–41.

13. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria / A. J. Bogdanove [et al.] // Mol. Microbiol. – 1996. – Vol. 20, N 3. – P. 681–683.

14. Playing the «Harp»: evolution of our understanding of *hrp/hrc* genes / A. P. Tampakaki [et al.] // Annu. Rev. Phytopathol. – 2010. – Vol. 48, N 73. – P. 347–370.

15. Harpins, multifunctional proteins secreted by gram-negative plant-pathogenic bacteria / M. Choi [et al.] // Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI. – 2013. – Vol. 26. – P. 1115–1122.

16. Евтушенко, А. Н. Внеклеточные пектатлиазы бактерий рода *Erwinia*: Автореферат / А. Н. Евтушенко. – Минск: БГУ, 1997. – 35 с.

17. Ji, H. Key steps in type III secretion system (T3SS) towards translocon assembly with potential sensor at plant plasma membrane: Type III translocon and plasma membrane sensor / H. Ji, H. Dong // Mol. Plant Pathol. – 2015. – Vol. 16, N 7. – P. 762–773.

18. The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate / A. O. Charkowski [et al.] // J. Bacteriol. – 1998. – Vol. 180, N 19. – P. 5211–5217.

19. *Rhizobium etli* HrpW is a pectin-degrading enzyme and differs from phytopathogenic homologues in enzymically crucial tryptophan and glycine residues / M. Fauvart [et al.] // Microbiology. – 2009. – Vol. 155, N 9. – P. 3045–3054.

20. The HrpW protein of *Lonsdalea quercina* N-5-1 has pectate lyase activity and is required for full bacterial virulence: a pathogenic factor of a bacterium (*Lonsdalea quercina*) / L. Yang [et al.] // J. Basic Microbiol. – 2014. – Vol. 54, N 10. – P. 1126–1135.

21. Harpin mediates cell aggregation in *Erwinia chrysanthemi* 3937 / M. N. Yap [et al.] // J. Bacteriol. – 2006. – Vol. 188, N 6. – P. 2280–2284.

22. Overexpression of a harpin-encoding gene *popW* from *Ralstonia solanacearum* primed antioxidant defenses with enhanced drought tolerance in tobacco plants / H. Liu [et al.] // Plant Cell Rep. – 2016.

23. Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIMI gene / H. Dong [et al.] // Plant J. – 1999. – Vol. 20, N 2. – P. 207–215.

24. Fontanilla, M. Effects of the foliar-applied protein «Harpin(Ea)» (messenger) on tomatoes infected with *Phytophthora infestans* / M. Fontanilla, M. Montes, R. De Prado // Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. – 2005. – Vol. 70, N 3. – P. 41–45.

25. Fontanilla, J. M. Induction of resistance to the pathogenic agent *Botrytis cinerea* in the cultivation of the tomato by means of the application of the protein «Harpin»(Messenger). / J. M. Fontanilla, M. Montes, R. De Prado // Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. – 2005. – Vol. 70, N 3. – P. 35–40.
26. Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated *Arabidopsis* growth and insect defense / H.-P. Dong [et al.] // Plant Physiol. – 2004. – Vol. 136, N 11. – P. 3628–3638.
27. Chuang, H. Harpin Protein, an Elicitor of Disease Resistance, Acts as a Growth Promoter in *Phalaenopsis* Orchids / H. Chuang, P.-Y. Chang, Y. Syu // J. Plant Growth Regul. – 2014. – Vol. 33, N 4. – P. 788–797.
28. Transgenic expression of a functional fragment of harpin protein Hpa1 in wheat induces the phloem-based defence against english grain aphid / M. Fu [et al.] // J. Exp. Bot. – 2014. – Vol. 65, N 6. – P. 1439–1453.
29. Jang, Y. S. The hrpN gene of *Erwinia amylovora* stimulates tobacco growth and enhances resistance to *Botrytis cinerea* / Y. S. Jang, S. I. Sohn, M. H. Wang // Planta. – 2006. – Vol. 223, N 3. – P. 449–456.
30. Expression of harpin(xoo) in transgenic tobacco induces pathogen defense in the absence of hypersensitive cell death / J.-L. Peng [et al.] // Phytopathology. – 2004. – Vol. 94, N 10. – P. 1048–1055.
31. Сюй, Г. Индуцированная устойчивость против листовой пятнистости, вызываемой альтернарией, и ускоренное развитие трангенных растений хри-антемы, несущих ген харпина hraG / Г. Сюй, С. Чен, Ф. Чэнь // Физиология растений. – 2010. – Т. 57, № 4. – С. 589–594.
32. A local accumulation of the *Ralstonia solanacearum* PopA protein in transgenic tobacco renders a compatible plant-pathogen interaction incompatible / L. Belbahri [et al.] // Plant J. – 2001. – Vol. 28, N 4. – P. 419–430.
33. Анализ действия харпинов на растения томата / Ч. Янь [и др.] // Вестн. БГУ. – 2010. – Т. 1, № 2. – С. 44–51.
34. Bullock, W. O. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection / W. O. Bullock, J. M. Fernandez, J. M. Short // Biotechniques. – 1987. – Vol. 5. – P. 376–379.
35. Studier, F. W. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes / F. W. Studier, B. A. Moffatt // J. Mol. Biol. – 1986. – Vol. 189, N 1. – P. 113–130.
36. Birnboim, H. C. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA / H. C. Birnboim // Methods Enzymol. – 1983. – Vol. 100. – P. 243–255.
37. Genome Sequence of *Pectobacterium atrosepticum* Strain 21A / Y. Nikolaichik [et al.] // Genome Announc. – 2014. – Vol. 2, N 5. – P. 1–2.
38. Чеботарёв, Л. Ю. Идентификация и анализ ключевых особенностей фитопатогенов, характерных для Республики Беларусь, на основе данных общедоступных последовательностей бактериальных ДНК / Л. Ю. Чеботарёв, Л. Л. Лагоненко, Л. Н. Валентович // Материалы Междунар. науч. конф. «Мо-лодежь в науке – 2014». – Минск, 2014. – С. 116–117.

39. Олигокалькулятор (OligoCalc) – Кафедра молекулярной биологии Биологического факультета БГУ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>. – Дата доступа: 22.12.2014.

40. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction / J. Ye [et al.] // BMC Bioinformatics. – 2012. – Vol. 13. – P. 134.

41. Bryksin, A. V. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids / A. V. Bryksin, I. Matsumura // BioTechniques. – 2010. – Vol. 48, N 6. – P. 463–465.

42. Николайчик, Е. А. SQ – Компьютерная программа для редактирования и анализа биологических последовательностей / Е. А. Николайчик, Л. Н. Валентович // Труды БГУ. – 2010. – Т. 5, № 1. – С. 154–162.

43. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. – Дата доступа: 10.08.2015.

44. Sigma Flag® *E. Coli* Expression System Manual [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/flcbul.pdf>. – Дата доступа: 10.08.2015.

45. Novagen pET System Manual [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://richsingiser.com/4402/Novagen%20pET%20system%20manual.pdf>. – Дата доступа: 10.08.2015.

46. Boro, M. C. Induced resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in passion fruit plants / M. C. Boro, L. O. S. Beriam, S. D. Guzzo // Trop. Plant Pathol. – 2011. – Vol. 36, N 2. – P. 74–80.

47. Harpin induces local and systemic resistance against *Trichothecium roseum* in harvested Hami melons / B. Yang [et al.] // Postharvest Biol. Technol. – 2005. – Vol. 38, N 2. – P. 183–187.

48. Mutations in the N-terminal coding region of the harpin protein Hpa1 from *Xanthomonas oryzae* cause loss of hypersensitive reaction induction in tobacco / X. Wang [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 81, N 2. – P. 359–369.

L. Y. TCHEBOTAREV¹, S. V. CHUBANAVA¹, V. N. KUPTSOV¹,
M. N. MANDRIK-LITVINKOVITCH¹, L. N. VALETOVICH¹, Y. A. NIKOLAICHIK²

CREATION OF LIBRARIES OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA HARPIN GENES FOR NEW GENERATION PLANT PROTECTION AGENT DEVELOPMENT

¹*Institute of Microbiology, National Academy of Sciences,
Minsk, Belarus, lev.chebotarev@gmail.com*

²*Belarusian State University, Minsk, Belarus, nikolaichik@bio.bsu.by*

The library of harpin-coding genes of several phytopathogenic *Pectobacterium* and *Xanthomonas* strains was created. Genes were inserted into pJET1.2 vector, than cloned with pET42a(+) and pFLAG-CTC plasmids in *E. coli* XL1-Blue cells. The expression of several cloned genes was performed later. The protective proper-

ties of harpin containing preparations were tested against anthracnose of *Lupinus luteus* and fusarium wilt on tomato seeds. The results obtained demonstrate the perspective of harpin containing preparations utilization for plant protection.

Поступила 25.04.2016 г.

УДК 579.222+577.152.531+601.4+602.6

*Н. А. ШАРЕЙКО¹, А. Г. ЛОБАНОК², А. В. ЖАЛНЕРОВСКАЯ¹,
А. В. ШИПУЛЯ¹, С. А. КУЛИШ², Л. И. САПУНОВА²,
А. Г. АРХИПЕНКО³*

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА ФИТАЗЫ «ИНКРИФОС/INCRIFOS» В РАЦИОНАХ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

¹*Витебская государственная ордена «Знак Почета» академия ветеринарной медицины, Витебск, Беларусь, sharejko@mail.ru*

²*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, microbio@mbio.bas-net.by, enzume@mbio.bas-net.by*

³*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Наработана опытная партия ферментного препарата «ИНКРИФОС/INCRIFOS®», проведены испытания его токсичности, переносимости и эффективности использования в рационах цыплят-бройлеров. На основании полученных результатов разработана инструкция по применению препарата фитазы «ИНКРИФОС/INCRIFOS®» в птицеводстве.

Введение. Современное кормопроизводство – это наукоемкий сектор индустрии, которая обеспечивает животноводство полноценными сбалансированными кормами и кормовыми добавками, влияет на его рентабельность. Традиционно в приготовлении кормов используют ферменты, катализирующие гидролиз целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина, фитата и других так называемых антипитательных веществ [1–6]. При этом особенно востребованной в последнее десятилетие оказалась фитаза, участвующая в расщеплении фитата – одного из наиболее трудно перевариваемых структурных компонентов растительного сырья.