

Антибиотический потенциал защитных пептидов семян сорного злака — ежовника обыкновенного (*Echinochloa crusgalli* L.)

Е. А. РОГОЖИН^{1,2}, А. Н. СМИРНОВ³

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

² Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва

³ Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва

Antibiotic Potential of Defense Peptides Derived from the Seeds of a Wild Grass — Barnyard Grass (*Echinochloa crusgalli* L.)

E. A. ROGOZHIN^{1,2}, A. N. SMIRNOV³

¹ M. M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

² G. F. Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

³ Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow

Проведена работа по оценке ингибирующего действия комплексов пептидов семян ежовника обыкновенного (*Echinochloa crusgalli* L.), принадлежащих к различным семействам PR-белков растений (дефензинов, липид-переносящих белков, ингибиторов протеиназ типа Боуман-Бирка и бифункциональных ингибиторов трипсина/альфа-амилазы злаков) и харпиноподобных пептидов (альфа-харпининов), на ряд условно-патогенных мицелиальных грибов рода *Aspergillus* «луночным» методом, а также бактерицидного эффекта по отношению к грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* с помощью лазерной проточной цитофотометрии. Был показан преимущественный антифунгальный эффект в отношении к коллекционных культур грибов-микромикетов из рода *Aspergillus* (*A.oryzae*, *A.niger*, *A.terreus*, *A.nutans*), что выражалось в количественном подавлении степени прорастания конидий и скорости нарастания гиф. Статистически достоверным бактерицидным действием обладал только представитель семейства липид-переносящих белков. Полученные данные, с одной стороны, позволяют рассматривать данный дикий злак как потенциальный донор высокоактивных полипептидов для защиты культурных Однодольных от болезней, вызываемых специфичными грибными патогенами, а с другой стороны, как источник природных пептидных антибиотиков нового поколения.

Ключевые слова: ежовник обыкновенный, *Echinochloa crusgalli*, дикий злак, антифунгальная активность, бактерицидная активность, пептидные антибиотики.

The article evaluates the inhibitory effect of peptide complexes derived from barnyard grass (*Echinochloa crusgalli* L.) seeds belonging to various families of plant RP proteins (defensins, lipidtransfer proteins, protease inhibitors of Bowman-Birktype, and bifunctional inhibitors of trypsin/alpha-amylase derived from grasses) and harpino-like peptides (alpha-harpinins) on a number of opportunistic mycelial fungi of the *Aspergillus* genus by the «alveolar» method, as well as bactericidal effect towards Gram-Positive bacterium *Staphylococcus aureus* with the use of flow cytometry and photometry. The primary antifungal effect was observed with respect to the culture collection of fungi-micromycetes of *Aspergillus* spp. (*A.oryzae*, *A.niger*, *A.terreus*, *A.nutans*), which was expressed in quantitative suppression of hyphal growth and conidia germination. Only the EcLTP peptide had a statistically significant bactericidal action. The data obtained, on the one hand, allow us to consider this wild grass as a potential donor of highly active polypeptides used for protection of cultivated monocotyledonous plants from diseases caused by specific fungal pathogens, and, on the other hand, as a source of next-generation natural peptide antibiotics.

Keywords: barnyard grass, *Echinochloa crusgalli*, weed grass, antifungal activity, bactericidal activity, peptide antibiotics.

Введение

Проблема поиска новых источников получения антибиотиков в последние годы является актуальной, особенно на фоне получивших достаточно широкое распространение случаев резистентности бактериальных и грибных патогенов — возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных. В качестве таких «доноров» но-

вых антибиотических соединений традиционно рассматриваются новые виды и штаммы бактерий (представители родов *Streptomyces*, *Bacillus* и др.) и почвенных грибов (*Trichoderma* spp., *Emericellopsis* spp. и др.) [1—6], обладающих в естественных ареалах своего обитания ярко выраженной антагонистической активностью по отношению к менее конкурентоспособным формам микроорганизмов (грибам, бактериям, актиномицетам), а также те из них (*Cordyceps* spp., *Beauveria* spp., *Paecilomyces* spp. и др.), которые используют в качестве пищевого субстрата разнооб-

© Е. А. Рогожин, А. Н. Смирнов 2018

Адрес для корреспонденции: 119021 Москва, Б.Пироговская, 11, стр. 1. НИИИНА им. Г.Ф.Гаузе

Антифунгальная активность защитных пептидов семян ежовника против условно-патогенных грибов рода *Aspergillus* «луночным» методом, ИК₅₀, мкМ.

Пептид/гриб	<i>A.oryzae</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.terreus</i>	<i>A.nutans</i>
Ec-AMP-D1/2	4,0	4,0	8,0	16,0
EcAMP1/3	16,0	16,0	>32	>32
EcLTP	<4,0	<4,0	8,0	8,0
EcBBTI	16,0	16,0	>32	>32
EcBFTI	32,0	>32	>32	>32

разных беспозвоночных (насекомых, клещей, нематод) [7—10]. Однако в подавляющем большинстве случаев такие антимикробные соединения обладают целым рядом побочных эффектов, наиболее распространённый из которых — цитотоксичность для эукариотических клеток, что накладывает существенные ограничения на дальнейшие перспективы их потенциального применения в медицине, ветеринарии и животноводстве. На этом фоне растения представляют собой более привлекательные источники новых и разнообразных по структуре и функции полипептидов с антимикробными свойствами (АМП). Ранее в серии предыдущих исследований был детально исследован состав защитных пептидов (антимикробных и ингибиторов гидролаз насекомых) в семенах ежовника с целью выявления степени их вклада в повышенную устойчивость дикорастущих злаков к комплексу биотических стрессовых факторов окружающей среды [11—15].

Цель данной работы заключалась в изучении антимикробного потенциала ряда защитных пептидов семян ежовника на комплекс условно-патогенных мицелиальных грибов из рода *Aspergillus*, а также бактерицидного эффекта по отношению к грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus*.

Материал и методы

Биологический материал. Семена. Использовались семена ежовника (*E. crusgalli* L.), собранные в Краснодарском крае летом 2004 г. Семена хранились в сухом проветриваемом помещении при температуре 16—18°C.

Микроорганизмы. Культуры мицелиальных грибов — *A.oryzae* штамм VKM F-55, *A.niger* штамм VKM F-33, *A.terreus* штамм VKM F-65, *A.nutans* штамм VKM F-3910 были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г. К. Скрыбина РАН, в работе по определению бактерицидной активности был использован штамм *Staphylococcus aureus* Cowan I, полученный из ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л. А. Тарасевича) и меченый флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) (Molecular Probes, США).

Выделение защитных пептидов из семян ежовника проводили в точном соответствии с методиками, описанными в работах [11, 13, 14].

Оценку антифунгального действия защитных пептидов осуществляли «луночным» микрометодом, представляющим собой модификацию диско-диффузионного способа испытаний антибиотических соединений *in vitro*, согласно [16]. Были использованы четыре действующих концентрации полипептидов в диапазоне 4—32 мкМ. Измерение диаметра колоний грибов проводили по истечении 120 ч инкубирования в трёх повторностях, ИК₅₀ рассчитывали путём соотнесения

среднего диаметра (в мм) как половину или менее от отрицательного контроля (добавление дистиллированной воды). В качестве контрольного варианта использовали коммерческий антимикотический препарат — амфотерицин Б (40 мкг/мл).

Изучение бактерицидного действия АМП ежовника методом лазерной проточной цитометрии и фотометрического метода проводили в точном соответствии с методикой, описанной в работах [17, 18]. Использовали четыре действующих концентрации пептидов, полученных методом двукратного разведения — 9—72 мкМ. В качестве контрольного варианта использовали коммерческий антибиотик — ванкомицин (50 мкг/мл).

Результаты и обсуждение

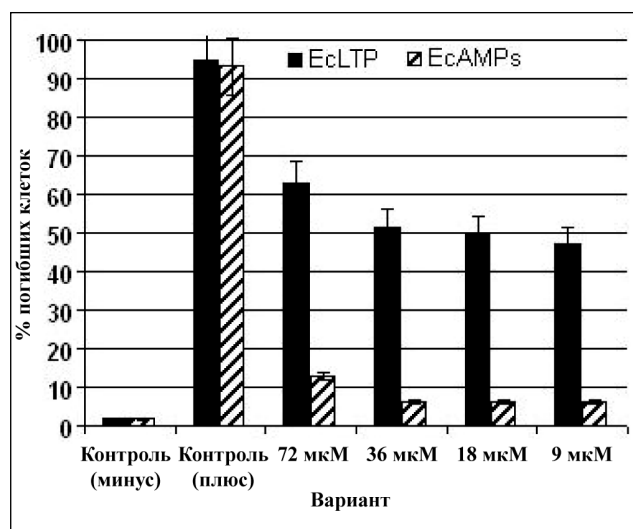
Исследование антифунгальной активности защитных пептидов семян ежовника «луночным» методом. Используемая в настоящей работе адаптация микологической методики позволяет эффективно оценивать антифунгальную (фунгистатическую) активность веществ (в частности, антимикробных белков и пептидов), как правило, доступных в малых количествах. Данное тестирование позволяет выявить различие между действием разных АМП преимущественно на скорость роста колоний грибов из разных таксономических групп, вызывающих опасные болезни с.-х. культур, а также условно-патогенных форм, представляющих опасность для человека и теплокровных животных. Для оценки антибиотической активности был использован ряд защитных пептидов, ранее выделенных из семян ежовника с антимикробными свойствами против фитопатогенных микроорганизмов — смесь высокомолекулярных дефензинов Ec-AMP-D1/2 [11], смесь харпино-подобных пептидов группы EcAMP (формы «1» и «3») [13, 14], липид-переносящий белок EcLTP [15], а также два представителя ингибиторов гидролитических ферментов (EcBBTI и EcBFTI) [13]. Были использованы четыре действующих концентрации полипептидов в диапазоне 4—32 мкМ. Результаты (ИК₅₀, мкМ) приведены в таблице.

По данным тестирования антифунгальной активности, можно заключить, что все тестируемые молекулы обладали биологическим действием на выбранный спектр грибных патогенов, однако специфичность была отличной, что выразилось по разнице в количественном аспекте степени ингибирования: так, наиболее устойчив к действию данных молекул оказался вид *A.nutans*, в том время как для *A.oryzae* и *A.niger* отмечена наибольшая степень восприимчивости. Что касается спектра действия, то липид-переносящий белок EcLTP и

смесь высокомолекулярных дефензинов Ec-AMP-D1/2 показали максимальный эффект и отсутствие явно выраженной внутривидовой специфичности действия, что подтверждается полученными ранее данными по их активности на фитопатогенные грибы и оомицеты, в том числе при совместном действии [11, 13, 15, 19], а также, согласно литературным данным, для некоторых их гомологов [20, 21]. Для двух представителей ингибиторов гидролаз был отмечен достаточно низкий уровень активности на выбранные виды, несмотря на полученные данные по их влиянию на супрессию развития возбудителя фитофтороза — оомицет *Phytophthora infestans* — на растительной ткани (искусственно инокулированные патогеном клубни картофеля) [13], как и ряда сообщений об участии ингибиторов протеиназ злаков в реализации иммунитета растений к болезням [22–24].

Изучение бактерицидного действия АМП семян ежовника с помощью проточной цитофотометрии. Результаты оценки уровня бактерицидного действия исследуемого комплекса пептидов семян ежовника, для которых в рамках проведённых ранее исследований было отмечено наличие антифунгальной активности [12, 15], позволили установить, что только инкубация бактериальных клеток с EcLTP в диапазоне действующих концентраций более 18 мкМ приводили к более чем 50% цитолитическому эффекту (ИК₅₀ определена на уровне 18 мкМ) (рисунок).

При этом стоит упомянуть, что дальнейшее снижение содержания данного пептида путём двукратного разведения до уровня 4,5 мкМ не приводило к значимому уменьшению количества бактерий *S.aureus* с повреждённой оболочкой (42% от их общего числа). Полученные данные, с одной стороны, согласуются с эффектом количественного действия данного АМП на оомицет *P.infestans in vitro*, а с другой стороны, позволяют рассматривать эту молекулу в качестве единственного цитолитика в исследуемом комплексе эффекторных молекул семян этого вида злаков. В качестве сравнения можно упомянуть, что смесь харпино-подобных пептидов EcAMP1/3 продемонстрировала слабый уровень активности по отношению к *S.aureus* в данном тесте вплоть до концентрации 72 мкМ, несмотря на то, что в проведённых ранее тестах диско-диффузионного метода был отмечен их супрессивный эффект по отношению к ряду как грамположительных, так и грамотрицательных фитопатогенных бактерий (*Pseudomonas syringe*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*) на уровне 12–24 мкМ [13, 14], что, однако, может являться следствием проявления данной молекулой бактериостатического действия наряду с фунгистатическим [12, 25]. Интересно, что для ближайшего структурного гомолога (по аминокислот-



Бактерицидная активность АМП семян ежовника против *S.aureus* методом проточной цитофотометрии: контроль (минус) — без добавления пептида, контроль (плюс) — инкубирование в присутствии ванкомицина (50 мкг/мл).

ной последовательности) EcAMP1 — АМП из семян кукурузы (*Zea mays* L.) MBP-1 было продемонстрировано как бактерицидное (на примере *Escherichia coli*), так и бактериостатическое действие (на примере *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*) [26], при этом активность по отношению к *E.coli* прямым образом зависела от фолдинга данной молекулы [27].

Заключение

Таким образом, были получены новые данные касательно степени ингибирующего действия комплексов пептидов семян ежовника обыкновенного (*Echinochloa crusgalli* L.), принадлежащих к различным семействам PR-белков растений и харпино-подобных пептидов (альфа-харпининов) на ряд условно-патогенных мицелиальных грибов рода *Aspergillus*, а также бактерицидного эффекта по отношению к грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus*. Был показан антифунгальный эффект по отношению к коллекционным культурам грибов-микромитозов из рода *Aspergillus* (*A.oryzae*, *A.niger*, *A.terreus*, *A.nutans*), что выразилось в количественном подавлении степени прорастания конидий и скорости нарастания гиф. Бактерицидным действием обладал только представитель семейства липидпереносящих белков. Полученные в результате проведённой работы результаты позволяют рассматривать данный дикий злак как потенциальный донор высокоактивных полипептидов для защиты культурных Однодольных от болезней, вызываемых специфичными грибными патогенами, а также как источник природных пептидных антибиотиков нового поколения.

Благодарности

Настоящая работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 16-34-60217-мол_а_дк) (раздел «Исследование антифунгальной активности защитных пептидов семян ежовника «луночным» методом), Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности» в рамках научного проекта РФФИ № 16-44-240509-р_а (раздел «Изучение бактерицидного действия АМП семян ежовника с помощью проточной цитофотометрии»).

ЛИТЕРАТУРА

1. Садыкова В.С., Кураков А.В., Куварина А.Е., Турун А.П., Рогожин Е.А., Коршун В.А. Образование штаммом *Trichoderma citrinoviride* ТУVI 4/11 антибиотиков – пептабиолов. Проблемы медицинской микологии. – 2015. – № 17(1). – С. 41–46. / Sadykova V.S., Kurakov A.V., Kuvarina A.E., Tyurin A.P., Rogozhin E.A., Korshun V.A. Obrazovanie shtammom *Trichoderma citrinoviride* ТУVI 4/11 antibiotikov – peptaibolov. Problemy medicinskoj mikologii 2015; 17(1): 41–46. [in Russian]
2. Садыкова В.С., Кураков А.В., Коршун В.А., Рогожин Е.А., Громовых Т.И., Куварина А.Е., Баранова А.А. Антимикробная активность веществ, продуцируемых штаммом *Trichoderma citrinoviride* ВКПМ-1228: оптимизация лабораторного культивирования и спектр действия индивидуальных пептабиолов. Антибиотики и химиотер. – 2015. – Т. 60. – № 11–12. – С. 3–8. / Sadykova V.S., Kurakov A.V., Korshun V.A., Rogozhin E.A., Gromovykh T.I., Kuvarina A.E., Baranova A.A. Antimikrobnaya aktivnost' veshchestv, produciруемых shtammom *Trichoderma citrinoviride* ВКПМ-1228: optimizatsiya laboratornogo kul'tivirovaniya i spektr dejstviya individual'nyh peptaibolov. Antibiotiki i khimioter 2015; 60(11–12): 3–8. [in Russian]
3. Bloudoff K., Schmeing T.M. Structural and functional aspects of the non-ribosomal peptide synthetase condensation domain superfamily: discovery, dissection and diversity. *Biochim Biophys Acta* 2017; 1865(11 Pt B): 1587–1604.
4. Inostroza A., Lara L., Paz C., Perez A., Galleguillos F., Hernandez V., Becerra J., González-Rocha G., Silva M. Antibiotic activity of Emerimicin IV isolated from *Emericellopsis minima* from Talcahuano Bay, Chile. *Nat Prod Res* 2017; 3: 1–4.
5. Daniel J.F., Filho E.R. Peptaibols of trichoderma. *Nat Prod Rep* 2007; 24 (5): 1128–41.
6. Szekeres A., Leitgeb B., Kredics L., Antal Z., Hatvani L., Manczinger L., Vbgyulgyi C. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2005; 52 (2): 137–68.
7. Chirivn J., Danies G., Sierra R., Schauer N., Trenkamp S., Restrepo S., Sanjuan T. Metabolomic profile and nucleoside composition of *Cordyceps nidus* sp. nov. (Cordycipitaceae): A new source of active compounds. *PLoS One* 2017; 12(6): e0179428.
8. Sharma S.K., Gautam N., Atri N.S. Optimized extraction, composition, antioxidant and antimicrobial activities of exo and intracellular polysaccharides from submerged culture of *Cordyceps cicadae*. *BMC Complement Altern Med* 2015; 15: 446.
9. Liu J., Li F., Kim E.L., Li J.L., Hong J., Bae K.S., Chung H.Y., Kim H.S., Jung J.H. Antibacterial polyketides from the jellyfish-derived fungus *Paeclomyces variotii*. *J Nat Prod* 2011; 74(8): 1826–9.
10. Lira S.P., Vita-Marques A.M., Selegim M.H., Bugni T.S., LaBarbera D.V., Sette L.D., Sponchiado S.R., Ireland C.M., Berlinck R.G. New destruxins from the marine-derived fungus *Beauveria felina*. *J Antibiot* (Tokyo) 2006; 59 (9): 553–63.
11. Odintsova T.I., Rogozhin E.A., Baranov Yu.V., Musolyamov A.Kh., Yalpani N., Egorov Ts.A., Grishin E.V. Seed defensins of barnyard grass *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. *Biochimie* 2008; 90: 1667–1673.
12. Nolde S.B., Vassilevski A.A., Rogozhin E.A., Barinov N.A., Balashova T.A., Samsonova O.V., Baranov Y.V., Feofanov A.V., Egorov T.A., Arseniev A.S., Grishin E.V. Disulfide-stabilized helical hairpin structure of a novel antifungal peptide EcAMP1 from seeds of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*). *J Biol Chem* 2011; 286 (28): 25145–25153.
13. Rogozhin E.A., Ryazantsev D.Y., Grishin E.V., Egorov T.A., Zavriev S.K. Defense peptides from barnyard grass (*Echinochloa crusgalli* L.) seeds // *Peptides*, 2012, V. 38 (1), P. 33–40.
14. Ryazantsev D.Yu., Rogozhin E.A., Dimitrieva T.V., Drobyazina P.E., Khadeeva N.V., Egorov T.A., Grishin E.V., Zavriev S.K. A novel hairpin-

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Рогожин Евгений Александрович — к.х.н, н.с. лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Авторы выражают благодарность заведующему лабораторией №92 клинической иммунологии ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, д.м.н., профессору Пинегину Б.В. за помощь в проведении испытаний бактерицидной активности АМП, а также научному сотруднику лаборатории биотехнологии отдела иммунологии ЦНИИ Туберкулеза к.б.н. Николаеву А.А. за помощь в интерпретации результатов оценки бактерицидной активности АМП.

- like antimicrobial peptide from barnyard grass (*Echinochloa crusgalli* L.) seeds: Structure-functional and molecular-genetics characterization. *Biochimie* 2014; 99: 63–70.
15. Рогожин Е.А., Одицова Т.И., Мусолюмов А.Х., Смирнов А.Н., Бабаков А.В., Егоров Ц.А., Гришин Е.В. Выделение и характеристика нового липид-переносящего белка из зерновок ежовника обыкновенного (*Echinochloa crusgalli*). Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45. – № 4. – С. 403–409. / Rogozhin E.A., Odincova T.I., Musolyamov A.Kh., Smirnov A.N., Babakov A.V., Egorov C.A., Grishin E.V. Vydelenie i kharakteristika novogo lipid-perenosyashchego belka iz zernovok ezhovnika obyknovennogo (*Echinochloa crusgalli*). *Prkladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* 2009; 45 (4): 403–409. [in Russian]
 16. Рогожин Е.А., Зайцев Д.В., Смирнов А.Н. Микрометод определения фунгистатической активности белков растительного происхождения. Известия Тимирязевской с-х академии. – 2011. – № 5. – С. 79–84. / Rogozhin E.A., Zajcev D.V., Smirnov A.N. Mikrometod opredeleniya fungistaticheskoj aktivnosti belkov rastitel'nogo proiskhozhdeniya. *Izvestiya Timiryazevskoj s.-kh. Akademii* 2011; 5: 79–84. [in Russian]
 17. Будихина А.С., Михайлова Н.А., Буткова Е.Е., Хватов В.Б., Пинегин Б.В. Изучение бактерицидной и ингибирующей активности сыворотки крови с помощью проточной цитометрии и фотометрического метода. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии – 2007. – № 2. – С. 53–57. / Budikhina A.S., Mikhajlova N.A., Bitkova E.E., Khvatov V.B., Pinegin B.V. Izuchenie baktericidnoj i ingibiruyushchej aktivnosti syvorotki krvi s pomoshch'yu protochnoj citometrii i fotometricheskogo metoda. *Zhurnal mikrobiologii, ephidemiologii i immunobiologii*. 2007; 2: 53–57. [in Russian]
 18. Будихина А.С., Олиферук Н.С., Пинегин Б.В. Оценка бактерицидной активности сыворотки крови с помощью лазерной проточной цитофлюорометрии. Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – № 10. – С. 48–49. / Budikhina A.S., Olfjeruk N.S., Pinegin B.V. Ocenka baktericidnoj aktivnosti syvorotki krvi s pomoshch'yu lazernoj protochnoj citofluorometrii. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2006; 10: 48–49. [in Russian]
 19. Rogozhin E., Zaytsev D. A synergistic effect of two plant antimicrobial peptides from defensin and lipid-transfer protein families towards *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 2016; 106 (S4): 156.
 20. Malaguti M., Dinelli G., Leoncini E., Bregola V., Bosi S., Cicero A.F., Hrelia S. Bioactive peptides in cereals and legumes: agronomical, biochemical and clinical aspects. *Int J Mol Sci* 2014; 15 (11): 21120–35.
 21. Kitts D.D., Weiler K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des* 2003; 9 (16): 1309–23.
 22. Schuppan D., Zevallos V. Wheat amylase trypsin inhibitors as nutritional activators of innate immunity. *Dig Dis* 2015; 33 (2): 260–3.
 23. Srikanth S., Chen Z. Plant Protease Inhibitors in Therapeutics-Focus on Cancer Therapy. *Front Pharmacol* 2016; 8 (7): 470.
 24. Bateman K.S., James M.N. Plant protein proteinase inhibitors: structure and mechanism of inhibition. *Curr Protein Pept Sci* 2011; 12 (5): 340–7.
 25. Vasilchenko A.S., Yuryev M., Ryazantsev D.Yu., Zavriev S.K., Feofanov A.V., Grishin E.V., Rogozhin E.A. Studying of cellular interaction of hairpin-like peptide EcAMP1 from barnyard grass (*Echinochloa crusgalli* L.) seeds with plant pathogenic fungus *Fusarium solani* using microscopy techniques. *Scanning* 2016; 38 (6): 591–598.
 26. Duvick J.P., Rood T., Rao A.G., Marshak D.R. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *J Biol Chem* 1992; 267 (26): 18814–20.
 27. Sousa D.A., Porto W.F., Silva M.Z., da Silva T.R., Franco O.L. Influence of Cysteine and Tryptophan Substitution on DNA-Binding Activity on Maize α -Hairpin Antimicrobial Peptide. *Molecules* 2016; 21(8): E1062.

Смирнов Алексей Николаевич — д.б.н., профессор кафедры защиты растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К. А. Тимирязева», Москва