



БЕЛОРУССКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

EXPERIMENTAL BIOLOGY and BIOTECHNOLOGY

Издается с января 1969 г.

(с 1969 по 2016 г. – под названием

«Вестник БГУ. Серия 2, Химия. Биология. География»),

с 2017 по 2021 г. – под названием

«Журнал Белорусского государственного университета. Биология»)

Выходит три раза в год

2

2022

МИНСК
БГУ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор **ДЕМИДЧИК В. В.** – член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, доцент; декан биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: dzemidchyk@bsu.by

**Заместитель
главного редактора** **СИДОРОВ А. В.** – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: sidorov@bsu.by

**Ответственный
секретарь** **ПШИБЫТКО Н. Л.** – кандидат биологических наук; заместитель декана по научной работе биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: elena_khramtsova@inbox.ru

- Адамович Б. В.* Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Валентович Л. Н. Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Гельтман Д. В. Ботанический институт им. В. Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия.
Гурин А. В. Университетский колледж Лондона, Лондон, Великобритания.
Кильчевский А. В. Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.
Костюк В. А. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Кульчицкий В. А. Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Лермонтова И. Н. Институт генетики и исследования сельскохозяйственных растений им. Г. В. Лейбница, Гатерслебен, Германия.
Медведев С. С. Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.
Мороз Л. Л. Флоридский университет, Гейнсвилл, США.
Семак И. В. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Стржалка К. Ягеллонский университет, Краков, Польша.
Тихомиров В. Н. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Усанов С. А. Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.
Чубанов В. С. Институт фармакологии и токсикологии им. Вальтера Штрауба Мюнхенского университета им. Людвига и Максимилиана, Мюнхен, Германия.
Шабала С. Н. Университет Тасмании, Хобарт, Австралия.
Ю Мин Международный исследовательский центр экологической биологии мембран Фошаньского университета, Фошань, Китай.

EDITORIAL BOARD

Editor-in-chief **DEMIDCHIK V. V.**, corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (biology), docent; dean of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: dzemidchyk@bsu.by

Deputy editor-in-chief **SIDOROV A. V.**, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of human and animal physiology of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: sidorov@bsu.by

Executive secretary **PSHYBYTKO N. L.**, PhD (biology); deputy dean for research, faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: elena_khramtsova@inbox.ru

- Adamovich B. V.* Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Chubanov V. S. Walther Straub Institute of Pharmacology and Toxicology, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Germany.
Geltman D. V. V. L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia.
Gourine A. V. University College of London, London, United Kingdom.
Kilchevsky A. V. National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Kostyuk V. A. Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Kulchitsky V. A. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Lermontova I. N. Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany.
Medvedev S. S. Saint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia.
Moroz L. L. University of Florida, Gainesville, USA.
Semak I. V. Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Shabala S. N. University of Tasmania, Hobart, Australia.
Strzalka K. Jagiellonian University, Kraków, Poland.
Tikhomirov V. N. Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Usanov S. A. National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Valentovich L. N. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Yu Min International Research Centre for Environmental Membrane Biology, Foshan University, Foshan, China.

УДК 577.352.46

СТРЕСС-ИНДУЦИРУЕМАЯ ПОТЕРЯ ЭЛЕКТРОЛИТОВ КЛЕТКАМИ КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ: ИСТОРИЯ ВОПРОСА, МЕХАНИЗМ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

П. В. ГРИУСЕВИЧ¹⁾, В. В. САМОХИНА¹⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Утечка (отток) электролитов из тканей является одной из центральных реакций растительного организма на стресс. Она наблюдается практически при любом виде стрессового воздействия как абиотической, так и биотической природы, приводя к потере ключевых электролитов, перестройке метаболизма и в некоторых случаях к гибели клеток и организма. Долгое время считалось, что утечка электролитов связана с нарушением целостности клеток и плазматических мембран и является нерегулируемым процессом. Тем не менее в последние годы получено множество данных, свидетельствующих о том, что в большинстве случаев утечка электролитов ингибируется блокаторами ионных каналов, т. е. связана с переносом ионов через белковые транспортные системы. Имеются экспериментальные доказательства того, что выходящий поток электролитов у растений при засолении, засухе, атаке патогенных организмов, воздействии тяжелых металлов, гипо- и гипертермии, а также окислительном стрессе

Образец цитирования:

Гриусевич ПВ, Самохина ВВ, Демидчик ВВ. Стресс-индуцируемая потеря электролитов клетками корня высших растений: история вопроса, механизм и физиологическая роль. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022; 2:4–18.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-4-18>

For citation:

Hryvusevich PV, Samokhina VV, Demidchik VV. Stress-induced electrolyte leakage from root cells of higher plants: background, mechanism and physiological role. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;2:4–18. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-4-18>

Авторы:

Полина Вацлавовна Гриусевич – старший преподаватель кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета, младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений.

Вероника Валерьевна Самохина – старший преподаватель кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета, научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений.

Вадим Викторович Демидчик – член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, доцент; декан биологического факультета.

Authors:

Palina V. Hryvusevich, senior lecturer at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology, and junior researcher at the laboratory of physiology and biotechnology of plants.

hryvusevich@bsu.by

Veranika V. Samokhina, senior lecturer at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology, and researcher at the laboratory of physiology and biotechnology of plants.

samokhina@bsu.by

Vadim V. Demidchik, corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (biology), docent; dean of the faculty of biology.

dzemidchik@bsu.by

опосредован несколькими типами ионных каналов, включая K^+ -селективные каналы, анионные каналы и неселективные катионные каналы как минимум трех семейств. Продемонстрировано, что первичными реакциями, которые индуцируют утечку электролитов, являются деполяризация плазматической мембраны и генерация активных форм кислорода, приводящие к активации редокс-регулируемых K^+ -каналов наружного выпрямления, таких как SKOR и GORK. Выход K^+ стимулирует отток противоионов (анионов) через конститутивные анионные каналы, которые, вероятно, кодируются генами семейства ALMT. Регуляция утечки электролитов на уровне ионных каналов и соответствующая селекция по свойствам ионных каналов могут стать важным звеном направленного управления стрессоустойчивостью высших растений. Это может быть применено на практике при выведении новых линий и сортов растений, а также разработке современных агрометеорологических приемов.

Ключевые слова: утечка электролитов; стресс; калий; ионный канал; активные формы кислорода; стрессоустойчивость растений.

Благодарность. Работа выполнена в рамках заданий государственной программы «Научно-технические технологии и техника» на 2021–2025 гг. (№ гос. регистрации 20213563), а также государственных программ научных исследований (№ гос. регистрации 20211734, 20211222, 20220676).

Вклад авторов. Материал, затрагивающий биофизические аспекты утечки электролитов и электрофизиологические эксперименты с каналами GORK, написан П. В. Гриусевич. Материал, описывающий работу сенсора Цис-151 и физиолого-биохимические аспекты функционирования каналов GORK в условиях стресса, подготовлен В. В. Самохиной. Руководство подготовкой статьи и экспериментов, а также написание материала, связанного с концепцией метаболической перестройки и индукции запрограммированной клеточной гибели вследствие оттока электролитов, осуществлены В. В. Демидчиком.

STRESS-INDUCED ELECTROLYTE LEAKAGE FROM ROOT CELLS OF HIGHER PLANTS: BACKGROUND, MECHANISM AND PHYSIOLOGICAL ROLE

P. V. HRYVUSEVICH^a, V. V. SAMOKHINA^a, V. V. DEMIDCHIK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: V. V. Demidchik (dzemidchik@bsu.by)

Electrolyte leakage from tissues is one of the central reactions of the plant organism to stress. It is observed under almost any type of stresses, both abiotic and biotic. The loss of key electrolytes can lead to significant changes in metabolism and, in some cases, to the death of cells or the whole organism. For a long time, it was believed, that electrolyte leakage is associated with disruption of cell integrity and plasma membranes degradation, and that it is an unregulated process. However, in recent years, a lot of evidence has been received that, in most cases, electrolyte leakage is inhibited by ion channel blockers and reversible. It means that it is associated with the transfer of ions through the membrane by transport proteins, such as ion channels. Recently, the experimental evidence has been obtained, that under salinity, drought, pathogen attack, excessive levels of heavy metals, hypo- and hyperthermia, as well as oxidative stress, the electrolyte leakage in plant cells is mediated by several types of cation and anion channels, including K^+ -selective channels (SKOR and GORK), anion channels (such as ALMT1) and a number of non-selective cation channels. It has been demonstrated that the primary reactions that induce electrolyte leakage are plasma membrane depolarisation and generation of reactive oxygen species, leading to the activation of redox-regulated outwardly rectifying K^+ channels, such as SKOR and GORK. Potassium efflux is up-stream and stimulates the counterion flow (transport of anions) through the anion channels. The regulation of electrolyte leakage at the ion channel level and the corresponding selection for ion channel properties can become an important link in the directed control of stress resistance in higher plants. This can be applied in agriculture via breeding of stress-tolerant plant varieties, as well as developing modern amelioration techniques.

Keywords: electrolyte leakage; stress; potassium; ion channel; reactive oxygen species; plant stress tolerance.

Acknowledgements. This study was supported by grants of the state program «Science-intensive technologies and equipment» for 2021–2025 (No. 20213563), as well as state programs of scientific research (No. 20211734, 20211222, 20220676).

Author's contribution. The material on the biophysical aspects of electrolyte leakage and electrophysiological experiments with GORK channels was written by P. V. Hryvusevich. The material describing the operation of the Cys-151 sensor and the physiological and biochemical aspects of GORK channel functioning under stress was prepared by V. V. Samokhina. Preparation of the article and experiments management, as well as writing of material related to the concept of metabolic restructuring and induction of programmed cell death due to electrolyte leakage, were carried out by V. V. Demidchik.

Введение

Утечка (отток) электролитов – это потеря клетками корней растений ионов (K^+ , Cl^- , HPO_4^{2-} , NO_3^- , мала²⁻, цитрат³⁻ и др.) при стрессе или в ходе некоторых физиологических реакций, таких как рост и развитие, гравитропический ответ и т. д. [1]. На протяжении почти 100 лет феномен утечки электролитов использовался в качестве теста на повреждение растений при стрессе, а также как один из параметров стрессоустойчивости [2]. Отток электролитов является универсальной реакцией у разных видов растений, тканей и клеточных типов и индуцируется при стрессовых воздействиях различной природы (засоление, воздействие тяжелых металлов, окислительный стресс и др.) [3]. Отток электролитов развивается практически мгновенно после добавления стрессора и длится от нескольких минут до нескольких часов или дней [1]. Качественно отток электролитов определяется прежде всего выходящим потоком K^+ и выходящими потоками противоионов (Cl^- , HPO_4^{2-} , NO_3^- , мала²⁻, цитрат³⁻), уравнивающими выход K^+ [4]. Некоторые стрессы вызывают очень сильную потерю K^+ растениями, что приводит к снижению химической активности K^+ в клетках от 70–200 до 10–30 ммоль/л [5]. Данный эффект является ключевым в физиологии стресса, в особенности для корня, так как отток K^+ может приводить к необратимой потере K^+ и летальному повреждению ионного баланса, влекущему за собой запуск автофагии и запрограммированной клеточной гибели (ЗКГ) [6].

Ионы калия присутствуют во всех живых клетках в большом количестве [6; 7]. В цитоплазме и вакуолях поддерживается постоянная высокая активность K^+ (от 50 до 200 ммоль/л), в то же время содержание K^+ снаружи клеток варьируется от 0,01 до 1,00 ммоль/л [7]. Плазматическая мембрана (ПМ) заряжена отрицательно, вследствие чего K^+ удерживается внутри клетки. При стрессовом воздействии происходит деполяризация ПМ, что активирует отток K^+ через деполяризационно-активируемые K^+ -каналы и потенциалнезависимые неселективные катионные каналы (НКК) [1]. Анионы присутствуют в клетках в неорганической и органической форме. Клетки растений могут синтезировать и накапливать большое количество органических анионов, таких как мала²⁻, цитрат, фумарат, оксалоацетат и др., этим они значительно отличаются от клеток животных, которые «используют» в основном неорганические анионы. Органические анионы в клетке испытывают электростатическое воздействие отрицательного потенциала ПМ, «энергизирующего» их пассивный выходящий поток. Другими словами, градиент электрохимического потенциала на ПМ для анионов практически всегда способствует их пассивному выходу во внешнюю среду (апопласт). При активации деполяризационно-активируемых анионных каналов, повышающих проницаемость мембраны к анионам, происходит массивный отток электролитов по направлению уменьшения градиента электрохимического потенциала [8].

Впервые утечка электролитов была зарегистрирована в конце XIX в., однако наиболее ранними опубликованными свидетельствами данного явления принято считать работы 1920-х гг., выполненные на растениях, подвергнутых воздействию низких температур и раневому стрессу [2; 9]. В указанных работах обнаружен значительный выход электролитов, включая K^+ и органические вещества, и высказано предположение, что утечка электролитов опосредована разрушением ПМ и клеточной гибелью. В течение последующих 30–40 лет установлено, что, помимо гибели клеток, при резком и продолжительном снижении температуры у многих растений отмечается утечка электролитов, которая происходит без снижения жизнеспособности клеток и нарушения проницаемости ПМ для воды [6]. Было предположено, что в условиях гипотермии у растительной ткани увеличивается проводимость ПМ для K^+ , но не нарушается ее целостность [10].

Сходные с воздействием низких температур эффекты описаны для растений, подвергнутых воздействию высоких температур и водного стресса (засухи) [11; 12]. Группой ученых во главе с М. Аткинсоном было впервые показано, что отток K^+ при патогенных атаках снижается в присутствии блокаторов катионных каналов (La^{3+} , Gd^{3+} и Co^{2+}), а также высказано предположение, что утечка K^+ опосредуется Ca^{2+} -проницаемыми каналами [13]. В 1980–90-х гг. в лаборатории А. Мерфи [14] установлено, что тяжелые металлы, такие как медь, активируют значительный отток K^+ в корнях *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., который снижается в присутствии ТЭА⁺ (блокатор K^+ -каналов). В начале 2000-х гг. получены доказательства вовлечения наружувыпрямляющих K^+ -каналов в отток K^+ при засолении в клетках корня и листьев *A. thaliana* (L.) Heynh. [15; 16], а также в корнях *Hordeum vulgare* L. [17]. Впервые описаны полиаминчувствительные наружувыпрямляющие K^+ -каналы в клетках листьев *Pisum sativum* L., опосредующие утечку K^+ при засолении [18]. Продемонстрировано, что утечка K^+ при воздействии HO° , засоления и патогенных элиситоров в клетках корня *A. thaliana* (L.) Heynh. снижается в присутствии ТЭА⁺ и опосредуется функционированием наружувыпрямляющих каналов GORK (*guard cell outward-rectifying K^+ channel*) [16; 19]. У *P. sativum* L. обнаружены наружувыпрямляющие катионные каналы, характеризующиеся низкой селективностью и пропускающие катионы и анионы [17]. Группой исследователей во главе с Дж. Дэвис было показано, что аннексины в присутствии HO° формируют НКК,

активирующиеся при стрессе и обеспечивающие отток катионов из клеток корня [20]. Также отмечено, что пурины активируют отток K^+ в корнях *A. thaliana* (L.) Heynh. через НКК [21]. В лаборатории С. Шабалы установлено, что растения, у которых отсутствует функциональный канал GORK, способны сдерживать утечку K^+ и обладают высокой устойчивостью к гипоксии (стресс, вызванный недостатком кислорода) [22]. Таким образом, литературные данные свидетельствуют о том, что утечка электролитов обусловлена функциональной активностью ионных каналов GORK и НКК и в большом количестве случаев не связана с нарушением целостности мембраны.

В литературе также описан сходный процесс потери клетками анионных электролитов (экссудация). Однако, в отличие от утечки электролитов, экссудация происходит постоянно и, возможно, частично имеет активную природу в отношении энергетических затрат [23]. Состав корневых экссудатов включает широкий перечень первичных и вторичных метаболитов, многие из которых не способны проникать через ионные каналы [24]. Важно отметить, что в процесс экссудации, кроме облегченной диффузии, вовлечены везикулярный транспорт, а также активный транспорт с участием переносчиков ABC (*ATP-binding cassette*), MATE (*multidrug and toxic compounds exrtusion*) и др. [23].

Утечка K^+ и других электролитов под действием засоления

Засоление – один из важнейших абиотических стрессов, который поражает около 50 % орошаемых земель и приводит к значительному снижению продуктивности высших растений [25]. Основными токсическими ионами в засоленных почвах являются Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , HCO_3^- и др. [26]. У большинства видов растений наблюдаются задержка роста и развития в присутствии 40–50 ммоль/л NaCl в почвенном растворе и гибель при наличии 150–200 ммоль/л NaCl [27]. Некоторые виды растений – галофиты – обладают высокой устойчивостью к засолению и способны выживать при содержании 300–400 ммоль/л NaCl в почвенном растворе [28] за счет эволюционно выработанной стратегии. Однако большинство растений относятся к так называемым гликофитам, т. е. являются малоустойчивыми к высоким уровням NaCl. Отмечено негативное влияние засоления на многие физиологические процессы у растений – поглощение и экссудацию минеральных веществ, электрический и метаболический баланс, фотосинтез, дыхание, водный обмен, старение, половое размножение и др. [26; 29]. Засоление является сложным, многокомпонентным явлением, тем не менее можно выделить две основные фазы этого феномена [30; 31]. В течение первой фазы, имеющей продолжительность от нескольких минут до нескольких дней, наблюдаются процессы утечки электролитов и ранней Ca^{2+} - и редокс-сигнализации, а также включение первичных защитных реакций в корневой системе, связанных с водным и ионным стрессом [32]. Вторая фаза засоления развивается через несколько недель и связана главным образом с повышением уровня Na^+ в фотосинтетических тканях, что в конечном итоге угнетает рост и развитие растений вследствие энергетического дисбаланса [29]. В целом общепризнано, что токсичность Na^+ и Cl^- у высших растений связана с длительным нарушением электрического, осмотического, ионного и метаболического баланса клеток растений, равно как и устойчивость опосредуется успешным противодействием данным явлениям [1; 15]. Механистической основой солевого стресса являются вход Na^+ в клетки корня, вызывающий деполяризацию ПМ, вход Ca^{2+} , выход K^+ , анионов-электролитов и потеря воды [15; 33].

Нарушение калиевого обмена и значительная потеря калия при солевом стрессе известны с 1950-х гг. [34]. Одно из первых детальных исследований этого феномена проведено в 1960-х гг. группой ученых во главе с Дж. Левиттом [35]. Отток калия при солевом стрессе первоначально был отнесен к неспецифическому повреждению ПМ и так называемой потере ее целостности [35]. Однако в дальнейшем в ряде работ [36; 37] показано, что обработка корней 50–100 ммоль/л NaCl приводит к селективной утечке K^+ , но не вызывает оттока других катионов. В исследованиях, выполненных на корнях пшеницы, ячменя, фасоли и гороха, продемонстрировано, что обусловленная засолением утечка K^+ ингибируется Ca^{2+} и не вызывается эквивалентным осмотическим стрессом (уровнями осмотиков, которые соответствуют по осмоляльности ионной компоненте протестированных растворов NaCl) [36; 37]. Эти исследования послужили основой для дальнейшего глубокого изучения выхода электролитов при засолении и вообще при стрессе, что отразилось в серии работ, детально проанализировавших данное явление [15; 19; 33; 38; 39].

В 2002 г. установлено, что вход Na^+ в клетки корня *A. thaliana* (L.) Heynh. осуществляется через НКК, так как ионные каналы, которые его катализируют, отличаются крайне низкой селективностью для катионов [33]. В 2006 г. было четко показано, что деполяризация ПМ, которая вызывается входом Na^+ , способна активировать наружувыпрямляющие K^+ -каналы, через которые K^+ покидает клетки корня [15]. Как вход Na^+ через НКК, так и выход K^+ могут блокироваться внеклеточным кальцием (Ca^{2+}), что снижает токсичность NaCl [33; 40]. Для нескольких видов растений отмечено, что концентрация Ca^{2+} снаружи выше 1–3 ммоль/л более чем на 50 % блокирует Na^+ -индуцированный выход K^+ (через наружувыпрямляющие K^+ -каналы) [15; 33; 40].

Прямое вовлечение K^+ -каналов в утечку K^+ , индуцированную засолением, продемонстрировано для листьев и корней *A. thaliana* (L.) Heynh. и *P. sativum* L. [15; 16; 18], клеток корня *H. vulgare* L. [41], *Brassica napus* L. [42], *Triticum aestivum* L. [16] и *Capsicum annuum* L. [28; 43]. При этом активность K^+ -каналов, обеспечивающих данное явление, вероятно, можно контролировать экзогенными полиаминами [18] и салициловой кислотой [43], снижая выход K^+ при засолении [28]. В последние годы с использованием техники локальной фиксации потенциала (ЛФП, пэтч-кламп) установлено, что NaCl-индуцируемый выход K^+ из клеток корня высших растений происходит главным образом через наружувывпрямляющие K^+ -каналы, кодируемые геном *GORK*, и НКК, которые, однако, пока не идентифицированы на генетическом уровне [15; 16].

Утечка электролитов из клеток корня высших растений при воздействии стрессоров биотической природы

Повреждение растительных тканей патогенными организмами в большом количестве случаев сопровождается утечкой электролитов [44]. При взаимодействии с патогенными грибами и бактериями утечка K^+ и органических анионов, выражающаяся в росте проводимости среды, часто используется как маркерная реакция на атаку патогенных бактерий, грибов и вирусов [45]. Наиболее ранние работы, посвященные потере электролитов при биотическом стрессе, появились в 1960-х гг. [1]. В данных исследованиях показано, что при инфицировании растений патогенными вирусами [46], бактериями [47] и грибами [48] индуцируется массивный отток электролитов из тканей.

В 1980-х гг. группой ученых во главе с М. Аткинсоном продемонстрировано, что при воздействии патогенных элиситоров наблюдается отток K^+ и органических анионов из клеток суспензионной культуры табака и сои, который ингибируется блокаторами катионных каналов La^{3+} , Gd^{3+} и Co^{2+} [49; 50]. В дальнейшем было установлено, что утечка электролитов (часто блокируемая антагонистами катионных каналов) индуцируется у растений рода *Sorghum*, зараженных *Periconia circinata* (L. Mangin) Sacc. [51], растений вида *Vigna unguiculata* (L.) Walp, инфицированных *Tobacco mosaic virus* [52], растений вида *Daucus carota* L., обработанных *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary [53], растений рода *Vitis*, зараженных *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn и *Agrobacterium vitis* Ophel & Kerr [54], растений вида *Oryza sativa* L., инфицированных *Rhizoctonia solani* J. G. Kuhn [55], растений вида *T. aestivum* L., обработанных *Puccinia recondita* Dietel & Holw [56], растений вида *Saccharum officinarum* L., зараженных *Colletotrichum falcatum* Went [57], растений видов *Euphorbia coerulescens* Haw. и *Orbea gigantea* N. E. Br., инфицированных фитоплазмой [58], суспензионной культуры *A. thaliana* (L.) Heynh., обработанной *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson [59] и др. [1]. Показано, что отток электролитов при биотическом стрессе включает одновременно катионную и анионную составляющие [59]. Утечка электролитов общепризнанно считается одним из самых быстрых ответов растения на стрессирование патогенами [60].

Недавно продемонстрирована ключевая роль быстрых (R-тип) и медленных (S-тип) анионных каналов в анионной утечке из листьев *A. thaliana* (L.) Heynh. при добавлении в среду бактериального элиситора flg22 [61]. Это указывает на то, что утечка электролитов при патогенном стрессе связана не только с механическим повреждением тканей, а также на то, что она может вовлекать контролируемый механизм – активацию ионных каналов.

Одним из важнейших процессов, наблюдаемых у многих групп растений при воздействии патогенов, является так называемая реакция гиперчувствительности [62–64], которая представляет собой быструю редокс-зависимую локализованную гибель клеток в месте взаимодействия патогена и тканей растения, приводящую к подавлению развития заболевания [65]. Реакция гиперчувствительности – широко распространенный феномен, известный более 100 лет [66]. Она описана практически для всех основных модельных видов высших растений и вызывается большим количеством фитопатогенов (грибы, оомицеты, бактерии, вирусы, насекомые и нематоды) [64; 67; 68]. Также реакция гиперчувствительности развивается при взаимодействии растения-паразита и растения-хозяина [69; 70]. В целом данная реакция всегда сопровождается массивной утечкой электролитов из тканей растений, которая чувствительна к лантанидам и другим блокаторам ионных каналов [64].

В последние годы установлено, что образование активных форм кислорода (АФК) и вход Ca^{2+} выступают основными причинами ЗКГ на заключительных стадиях реакции гиперчувствительности [5]. Вероятно, отток K^+ индуцируется синтезом АФК и также вовлечен в ЗКГ [16]. Выходящий поток K^+ , сопровождающийся синтезом HO^{\bullet} , был зарегистрирован у растений, обработанных патогенными элиситорами, полученными из *Alternaria alternate* (Fr.) Keissl. [71], *Botrytis cinerea* Pers. [72], *Cladosporium fulvum* Cooke [73] и *Magnaporthe grisea* (T. T. Hebert) M. E. Barr [74]. Элиситоры, полученные из *C. fulvum* Cooke, активировали наружунаправленную K^+ -проводимость ПМ устьичных клеток *Nicotiana tabacum* L. [73]. При обработке клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. элиситором, выделенным из *Trichoderma viride* Pers., был зарегистрирован наружунаправленный K^+ -поток, который снижался при добавлении

ТЭА⁺ [16]. Показано, что при обработке клубней картофеля *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary параллельно с утечкой электролитов развивается синтез O₂^{•-} и других АФК [75]. Сейчас общепризнано, что синтез практически всех важнейших АФК (O₂^{•-}, H₂O₂, HO[•] и др.) вовлечен в развитие реакции гиперчувствительности [5].

В ряде публикаций последних лет продемонстрировано, что ответная реакция растения на патогены, включающая утечку K⁺ и других электролитов, может быть предотвращена или значительно снижена при добавлении в среду веществ-скавенджеров («тушителей») АФК, блокаторов катионных каналов, а также при направленном повышении уровня экспрессии антиоксидантных систем и защитных белков [5; 16; 76]. Недавно были описаны HO[•]-активируемые наружувыпрямляющие K⁺-каналы в клетках корня *A. thaliana* (L.) Heynh., работа которых показывает прямую связь между синтезом АФК и утечкой K⁺ [16; 19]. Данные системы реагируют на присутствие в среде АФК выбросом K⁺ при деполяризации ПМ [16; 19]. Генетическая природа АФК-активируемых K⁺-каналов связана с функционированием канала, кодируемого геном *GORK*, так как в нокаутных растениях по этому гену не обнаруживалась АФК-активируемая наружунаправленная K⁺-проводимость [16].

Несмотря на большое количество фактов регистрации оттока K⁺ при биотическом стрессе, утечка K⁺ при атаке патогенов не является универсальной реакцией [1]. Например, показано, что такстомин А, полученный из поражающей корни бактерии *Streptomyces scabie* Lambert & Loria, вызывал симптомы ЗКТ в культуре клеток *A. thaliana* (L.) Heynh., активируя вход Ca²⁺, при этом данное соединение блокировало наружувыпрямляющие K⁺-каналы и снижало отток K⁺ из корня [77]. Схожие результаты были получены для устьичных клеток *A. thaliana* (L.) Heynh., обработанных бактериальным элиситором flg22 [78]. Входящий и выходящий потоки K⁺ ингибировались flg22, при этом реакция не наблюдалась у растений линии *gra-1*, лишенной α-субъединицы G-белка [78]. Таким образом, существуют примеры ингибирования оттока K⁺ из растительных клеток под воздействием элиситоров при патогенном стрессе, что, вероятно, определяется особенностями взаимодействия конкретного растения и патогена. Тем не менее важно отметить, что система транспорта K⁺ так или иначе затрагивается и в случае блокирования его оттока.

Утечка электролитов из клеток высших растений в ответ на воздействие тяжелых металлов

Воздействие тяжелых металлов приводит к массивному оттоку электролитов из клеток корня растений [1; 79]. Впервые данное явление обнаружено в 1980-х гг. при исследовании воздействия Cu²⁺ на корни растений [80]. В дальнейшем было отмечено, что растения, обладающие устойчивостью к тяжелым металлам, в частности к меди, отличаются более низкой утечкой электролитов, чем обычные растения [79]. В 1990-х гг. предполагалось, что утечка K⁺, индуцируемая медью и другими тяжелыми металлами, связана с разрушением ПМ из-за перекисного окисления липидов [81]. Однако впоследствии были получены данные, указывающие на вовлечение наружувыпрямляющих K⁺-каналов в индуцируемую ионами меди утечку электролитов из корня [82]. Анализ экотипов растений *A. thaliana* (L.) Heynh. с различной устойчивостью к Cu²⁺ показал, что у тех из них, которые более чувствительны к Cu²⁺, наблюдается большая утечка K⁺ [82]. Тесты с радиоизотопом ⁸⁶Rb⁺ (трейсер калия) подтвердили, что при воздействии Cu²⁺ действительно наблюдается отток K⁺ [82]. Параллельно с утечкой K⁺ при воздействии Cu²⁺ наблюдался выход из клеток корня органического аниона цитрата, вероятно, для балансировки заряда на ПМ [82].

Начиная со второй половины 1990-х гг. были детально охарактеризованы Cu²⁺-индуцируемые токи ПМ и соответствующая утечка K⁺ в клетках харовой водоросли *Nitella flexilis* (L.) C. Agardh и клетках корня *A. thaliana* (L.) Heynh. [16; 19; 83–85]. С помощью метода ЛФП проведен анализ токов ПМ клеток *N. flexilis* (L.) C. Agardh, показавший, что Cu²⁺ и комбинация Cu²⁺ с L-аскорбатом активируют внутринаправленную Ca²⁺-проводимость и наружунаправленную K⁺-проводимость [5]. При добавлении Cu²⁺ и L-аскорбиновой кислоты (смесь, генерирующая HO[•]) к корням *A. thaliana* (L.) Heynh. наблюдалась утечка K⁺ через K⁺-проницаемые каналы [19]. Продолжительное воздействие смеси Cu²⁺ и L-аскорбата приводило к активации аннексинов – особых белков, способных встраиваться в ПМ и катализировать входящий поток Ca²⁺ и выходящий поток K⁺ [20; 86].

Утечка электролитов из тканей растений при температурном стрессе

При воздействии экстремальных (чрезмерно высоких или чрезмерно низких положительных и отрицательных) температур [87] наблюдается значительный отток электролитов из тканей растений [1]. Наиболее ранние работы, описавшие утечку электролитов из тканей растений при температурном воздействии, опубликованы еще в 1930-х гг. [2]. Например, в лаборатории С. Декстера показано, что степень

повреждения растительных тканей при гипотермии положительно коррелирует с утечкой электролитов [2]. Было сделано предположение, что утечка электролитов происходит из-за разрушения ПМ и гибели клеток. В дальнейшем утечка электролитов при гипо- и гипертермии была обнаружена у большого количества видов растений, различных тканей и типов клеток [1; 6; 88]. На сегодня установлено, что при температурном стрессе индуцируется утечка электролитов из тканей *Solanum nigrum* L. [89], *Helianthus annuus* L. [90], *Pinus sylvestris* L. [91], *Zea mays* L., *Cucumis sativus* L., *O. sativa* L. [92; 93], *B. napus* L. [94], *V. unguiculata* (L.) Walp. [95], *Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub. [96], *Picea glauca* (Moench) Voss, *Picea mariana* (Mill.) Britton, Sterns & Poggenb., *Pinus banksiana* Lamb. [97], *Coffea dewevrei* De Wild & Durand [98], *A. thaliana* (L.) Heynh. [99], *T. aestivum* L., *H. vulgare* L. [100], *Punica granatum* L. [101], *Solanum lycopersicum* L. [102] и др.

В последние годы обнаружены воздействия, способствующие снижению утечки электролитов при температурном стрессе [1; 6]. Например, добавление салициловой кислоты к проросткам *Z. mays* L., *C. sativus* L. и *O. sativa* L. [92; 93], плодам *P. granatum* L. [101] при воздействии низких температур и к проросткам *A. thaliana* (L.) Heynh. при воздействии высоких температур [99] снижало выходящий поток электролитов. Добавление униконазола (синтетический регулятор роста) при замораживании уменьшало отток электролитов из тканей *B. napus* L. [94]. Было сделано предположение, что данные соединения способны уменьшать повреждение ПМ при гипотермии в результате подавления окисления мембранных липидов. Также продемонстрирована роль белка дегидрина в устойчивости растений (на примере *N. tabacum* L.) к замораживанию [103]. У растений, экспрессирующих дегидрин, выходящий поток электролитов был ниже, чем у растений контрольной группы [103]. В итоге выдвинута гипотеза, согласно которой дегидрин выступает в роли сквенджера свободных радикалов, благодаря чему он способен предотвращать перекисное окисление липидов ПМ.

В последние годы опубликованы данные, указывающие на вовлечение Ca^{2+} -проницаемых каналов в распознавание сигналов температурного стресса [104]. Показано, что каналы семейства CNGC (*cyclic nucleotide-gated ion channel*), чувствительные к изменению температуры, опосредуют вход Ca^{2+} в клетку у *Physcomitrium patens* (Hedw.) Mitt. и *A. thaliana* (L.) Heynh. при температурном стрессе [105; 106]. Продемонстрировано, что активность каналов CNGC14 и CNGC16 в клетках листьев *O. sativa* L. обеспечивает устойчивость растений к высоким и низким температурам [107]. Таким образом, каналы CNGC14 и CNGC16 выступают в роли модуляторов Ca^{2+} -сигнализации при температурном стрессе. Примечательно, что генетическое нокаутирование *AtCNGC14* или *AtCNGC16* приводило к подавлению Ca^{2+} -сигналов, вызываемых пониженными температурами, и одновременно влекло за собой снижение устойчивости растений к пониженным температурам [107]. Недавно продемонстрировано, что аквапорины PIP1;4 и PIP2;5 (PIP – *plasma membrane intrinsic protein*) участвуют в обеспечении устойчивости *A. thaliana* (L.) Heynh. к низким температурам и заморозкам [108].

Утечка электролитов из тканей растений при осмотическом стрессе

Отток электролитов при осмотическом стрессе из корней и других вегетативных тканей высших растений впервые описан в 1970-х гг. [11; 109]. В ранних работах по данному вопросу отток ионов из растительных тканей рассматривался как результат нарушения целостности ПМ. Также предполагалось, что устойчивость растений к засухе коррелирует со скоростью повреждения ПМ при воздействии водного стресса и ростом утечки электролитов [11]. В дальнейшем анализ оттока электролитов использовался как маркер повреждающего воздействия водного стресса [11]. В ранних работах по изучению осмотического стресса особый акцент также делался на утечку электролитов из семян при их высушивании и набухании, как, например, это было показано для *Lotus corniculatus* L. [110], *Avena fatua* L. [111], *Acer saccharinum* L., *Chrysalidocarpus lutescens* H. Wendl. [112] и *Glycine max* L. [113]. В последние годы отток электролитов при водном стрессе исследован у *H. vulgare* L. [114], *Triticum durum* L. [4], *T. aestivum* L., *Z. mays* L. [115], *P. sativum* L. [116], *O. sativa* L. [117], *Lycopersicon esculentum* Mill. [118], *N. tabacum* L. [119], *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh., *M. hupehensis* (Pamp.) Rehder [120], *Brassica rapa* L. [121], *Sorghum bicolor* (L.) Moench [122] и у других видов растений. В указанных работах установлено, что выходящий поток электролитов из тканей растений при осмотическом стрессе в основном опосредован деполяризацией ПМ, выходом K^+ и органических анионов [1; 4]. В современных публикациях показано, что повышение содержания в клетках растений антиоксидантов способствует снижению утечки электролитов и повышению их устойчивости к воздействию засухи [115]. Например, повышение экспрессии Mn-супероксиддисмутазы в листьях *P. sativum* L. [116], а также Cu/Zn-супероксиддисмутазы и аскорбатпероксидазы в листьях *N. tabacum* L. [119] приводило к значительному снижению выходящего потока электролитов. Была выдвинута гипотеза, согласно которой высокая антиоксидантная активность предотвращает развитие окислительного стресса и повреждение ПМ [115].

Недавно выявлен ряд механизмов, которые участвуют в формировании устойчивости растений к осмотическому стрессу на уровне ионных каналов ПМ [123–126]. Показано, что анионный канал *ZmSLAC1* (SLAC – slow anion channel) экспрессируется в ПМ устьичных клеток и обеспечивает закрытие устьиц при снижении водного потенциала среды [127]. При воздействии засухи в клетке запускается каскад сигнальных реакций, активирующих SLAC1 посредством фосфорилирования, и происходит отток Cl^- , NO_3^- из устьичных клеток [123]. Кроме того, продемонстрировано, что повышенная экспрессия генов внутривыпрямляющих K^+ -каналов АКТ1 (*Arabidopsis K⁺ transporter-1*) и высокоаффинного K^+ -транспортера НАК1 (*high affinity K⁺ transporter-1*) повышает устойчивость *H. vulgare* L. к засухе [124; 125]. Согласно предположению авторов это может быть связано с повышением поглощения K^+ каналами АКТ1 и транспортерами НАК1. Также зарегистрировано повышение экспрессии генов аквапоринов *PIP1;3*, *PIP2;5*, *TIP2;1* и *NIP2;1* у *O. sativa* L. при осмотическом стрессе [126]. Повышение экспрессии аквапоринов положительно коррелировало с устойчивостью растений к засухе.

Влияние АФК и других редокс-активных соединений на потоки электролитов в тканях высших растений

Образование АФК – наиболее часто регистрируемая реакция, сопровождающая утечку K^+ при стрессе [1]. Во многих случаях образование супероксида ($\text{O}_2^{\bullet-}$) за счет восстановления триплетного кислорода (O_2) является начальной реакцией синтеза АФК, окислительного стресса и редокс-регуляции в живых системах, включая высшие растения [8; 128]. При дальнейшем протонировании $\text{O}_2^{\bullet-}$ формируется гидропероксильный радикал HO_2^{\bullet} , который может дисмутировать до перекиси водорода (H_2O_2) [128]. Последняя может принимать электроны от восстановленных ионов переходных металлов или их комплексов (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} и др.) и давать гидроксильный радикал (HO^{\bullet}) [129]. Гидроксильный радикал является наиболее сильным окислителем в биологических системах и может вступать в реакцию окисления с большинством органических молекул клетки.

АФК синтезируются во внеклеточном пространстве хлоропластов и митохондрий, в пероксисомах и апопласте за счет активности НАДФН-оксидаз ПМ, внеклеточных пероксидаз класса III, полиаминоксидаз и оксалаатоксидаз [1]. При умеренном стрессе продукция АФК преимущественно действует в качестве регуляторного механизма, стимулирующего иммунитет растений и защитные реакции [130]. В случае сильного стрессового воздействия генерация АФК возрастает и приводит к окислительному стрессу, т. е. накоплению недетоксицированных окисленных продуктов.

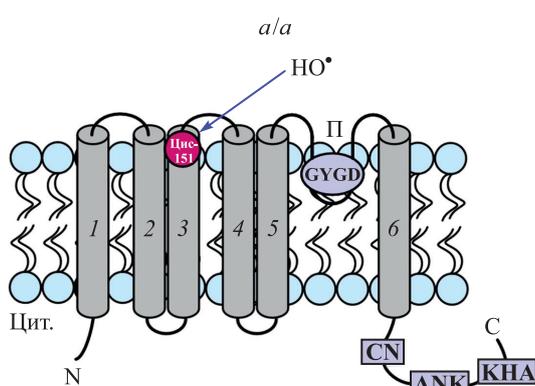
На сегодняшний день продемонстрировано, что растения генерируют $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 и HO^{\bullet} в ответ на засоление [16; 19], атаку патогенных организмов [19], засуху, гипертермию [131], гипотермию [132], воздействие тяжелых металлов [133], гербицидов [134] и другие стресс-факторы [1]. В большом количестве работ показано, что стресс-индуцированное образование АФК по временным характеристикам схоже с активацией выхода K^+ , которая возникает в ответ на стресс-факторы. Таким образом, можно предположить наличие взаимосвязи между образованием АФК и утечкой K^+ [16].

В последние годы хорошо изучена взаимосвязь утечки K^+ и образования АФК в ответе растения на воздействие патогенных организмов. Образование HO^{\bullet} и выход K^+ наблюдались вместе у растений, подверженных влиянию элиситоров, выделяемых *C. fulvum* Cooke [135], *A. alternate* (Fr.) Keissl. [71], *B. cinerea* Pers. [72] и *M. grisea* (T. T. Hebert) M. E. Barr [74]. Например, появление в среде инкубации протопластов, изолированных из устьичных клеток *N. tabacum* L., элиситоров *C. fulvum* Cooke приводило к очень быстро развивающемуся синтезу АФК и активации выхода K^+ [73]. Элиситоры *T. viride* Pers. вызывали взрыв продукции HO^{\bullet} , чувствительную к блокаторам калиевых каналов утечку K^+ у растений *A. thaliana* (L.) Heynh., вероятно, за счет активации K^+ -каналов [16]. Вещества-скавенджеры АФК и ингибиторы ферментов, синтезирующих АФК, так же как и дополнительная усиленная экспрессия антиоксидантных систем и защитных белков, предотвращали или значительно задерживали ответ на патогены, выражающийся в синтезе АФК и активации выходящего потока K^+ [16; 76].

Открытие в 2003 г. АФК-активируемых K^+ -каналов экспериментально подтвердило существование связи между образованием АФК и утечкой K^+ [19]. Более ранней реакцией при стрессе является синтез АФК, который приводит к дальнейшей активации Ca^{2+} - и K^+ -проницаемых катионных каналов, входу Ca^{2+} в цитоплазму и активации оттока K^+ из клеток и тканей. Недавно с использованием подходов спектроскопии электронного парамагнитного резонанса показано, что при солевом стрессе наблюдалось образование HO^{\bullet} , активирующего K^+ -каналы наружного выпрямления в клетках корня арабидопсиса [16].

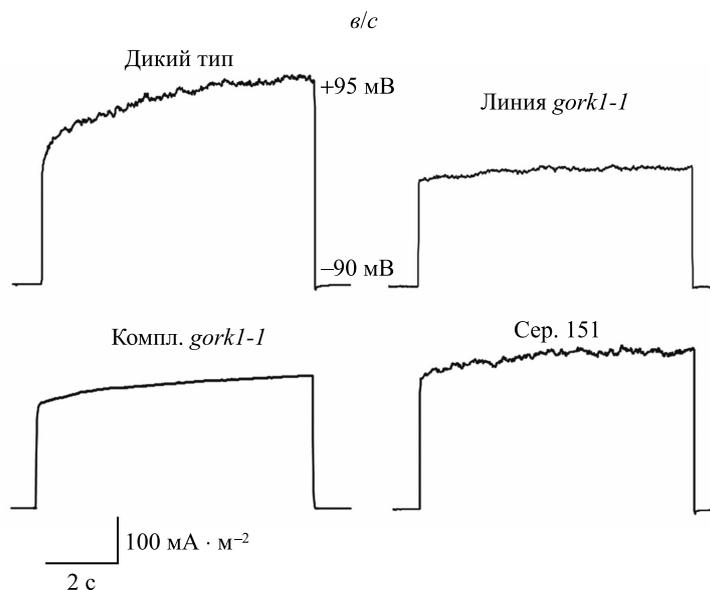
Тестирование редокс-чувствительного центра K⁺-канала GORK *A. thaliana* (L.) Heynh., ответственного за его активацию под действием окислительного стресса

На сегодняшний день молекулярный механизм активации наружувыврямляющего K⁺-канала GORK, являющегося доминирующей транспортной системой, ответственной за АФК-активируемый выход калия при стрессе, точно не известен. Тем не менее в последние годы в лаборатории профессора М. Блатта была установлена мишень АФК в молекулярном комплексе наружувыврямляющего K⁺-канала SKOR (*stelar K⁺ outward-rectifying channel*) [136] – ближайшего гомолога канала GORK. При экспрессии канала SKOR в гетерологической системе (НЕК293) продемонстрировано, что необходимым условием для активации данного канала в присутствии АФК (H₂O₂) является наличие консервативного аминокислотного остатка Цис-168 в домене 3, обладающем потенциалзависимостью [136]. Ранее сотрудниками научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета БГУ совместно с профессором И. Дреером из Технического университета Мадрида (Испания) было сделано предположение, что в канале GORK имеется гомологичная аминокислота (цистеин), которая может выступать в роли мишени АФК [137]. Биоинформационный анализ, выполненный путем выравнивания последовательности гена *GORK*, показал наличие сходного по составу кодируемых аминокислот участка у многих высших растений, геномы которых аннотированы в базе данных EMBL-EBI (см. рисунок). Было установлено, что остатку Цис-168 канала SKOR у *A. thaliana* (L.) Heynh. в канале GORK соответствует аминокислота Цис-151, которая, следовательно, может выполнять функцию АФК-сенсора. Остаток цистеина высококонсервативен и имеется у других видов растений, включая *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt., *B. rapa* L., *Noccaea caerulescens* (J. Presl & C. Presl) F. K. Mey., *Camelina sativa* (L.) Crantz, *Raphanus sativus* L., *Tarenaya hassleriana* (Chodat) Iltis и др. В результате совместного исследования в лаборатории профессора И. Дреера были получены трансгенные растения *A. thaliana* (L.) Heynh. с модификацией канала GORK: *gork1-1* (отсутствует ген, кодирующий наружувыврямляющий K⁺-канал); *gork1-1* с возвращенным K⁺-каналом GORK (Компл. *gork1-1*); *gork1-1* с заменой аминокислоты цистеин на серин по положению 151 в предполагаемом АФК-чувствительном сайте канала GORK (Сер. 151). Семена мутантных линий были предоставлены научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений для проведения электрофизиологического анализа и подтверждения гипотезы о роли Цис-151 в восприятии АФК-сигнала.



Ген	Аминокислотная последовательность	Положение аминокислоты
<i>AtSKOR</i>	K S T F I I D L L A C M P W D I I Y K A A	168
<i>AtGORK</i>	K S H F L M D F I G C F P W D L I Y K A S	151
<i>BpGORK</i>	K S H F F L D L V S C F P W D L I Y K A S	150
<i>BrGORK</i>	K S H F F L D L V S C F P W D L I Y K A S	150
<i>NcGORK</i>	K S H F F L D F V S C F P W D L I Y K V S	151
<i>CsGORK</i>	K S H F L M D F I S C F P W D L I Y K A S	154
<i>RsGORK</i>	K S H F F L D L V S C F P W D L I Y K A S	151
<i>ThGORK</i>	K S D F I V D L L S C L P W D L I F K A S	156

Анализ редокс-сенсора в наружувыврямляющем K⁺-канале GORK (начало):
 a – расположение Цис-151 в канале GORK (Π – пора, цит. – цитоплазма);
 б – консервативный остаток цистеина у высших растений, геномы которых аннотированы в базе данных EMBL-EBI (*Bp* – *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt., *Br* – *Brassica rapa* L., *Nc* – *Noccaea caerulescens* (J. Presl & C. Presl) F. K. Mey., *Cs* – *Camelina sativa* (L.) Crantz, *Rs* – *Raphanus sativus* L., *Th* – *Tarenaya hassleriana* (Chodat) Iltis)
 Analysis of the redox sensor in the outwardly-rectifying K⁺ channel GORK (beginning):
 a – location of Cys-151 in the GORK channel (Π – pore, цит. – cytoplasm);
 b – a conserved cysteine residue in higher plants whose genomes are annotated with EMBL-EBI (*Bp* – *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt., *Br* – *Brassica rapa* L., *Nc* – *Noccaea caerulescens* (J. Presl & C. Presl) F. K. Mey., *Cs* – *Camelina sativa* (L.) Crantz, *Rs* – *Raphanus sativus* L., *Th* – *Tarenaya hassleriana* (Chodat) Iltis)



Анализ редокс-сенсора в наружувыпрямляющем K^+ -канале GORK (окончание):
 v – наружунаправленные K^+ -токи в ответ на воздействие смеси, генерирующей гидроксильные радикалы (1 ммоль/л Cu^{2+} , 1 ммоль/л L-аскорбиновой кислоты, 1 ммоль/л H_2O_2). Описание генетических модификаций приводится в тексте.

Использованные методические подходы, экспериментальные растворы и техника получения протопластов ранее описаны в работах [16; 40; 138]

Analysis of the redox sensor in the outwardly-rectifying K^+ channel GORK (ending):
 c – outwardly-directed K^+ currents in response to a hydroxyl radical-generating mixture (1 mmol/L Cu^{2+} , 1 mmol/L L-ascorbic acid, 1 mmol/L H_2O_2).

Genetic modifications are described in the text. Techniques are previously described elsewhere [16; 40; 138]

С помощью техники ЛФП был проведен первичный анализ модификации наружунаправленной проводимости ПМ у арабидопсиса дикого типа и мутантных линий. На рисунке представлены типичные токовые кривые через ПМ клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. при максимальной деполяризации ПМ (+95 мВ). Показано, что у растений дикого типа при введении в наружный раствор смеси, генерирующей гидроксильные радикалы (1 ммоль/л Cu^{2+} , 1 ммоль/л L-аскорбиновой кислоты, 1 ммоль/л H_2O_2), наблюдается высокая наружунаправленная K^+ -проводимость, включающая мгновенную (быструю) и времязависимую (медленную) компоненты тока. Согласно литературным данным мгновенная проводимость обусловлена работой НКК, времязависимая – функционированием каналов GORK [1]. Нокаутирование канала GORK (линия *gork1-1*) приводило к снижению наружунаправленных K^+ -токов при действии HO^\bullet . Важно отметить, что у данной линии не была зарегистрирована медленная компонента наружунаправленных калиевых токов ПМ. Линии арабидопсиса, экспрессирующие канал GORK с замещением Цис-151 на серин, демонстрировали снижение их чувствительности к HO^\bullet по сравнению с диким типом. В целом характер проводимости ПМ у данной линии был схожим с таковым у линий *A. thaliana* (L.) Heynh. *gork1-1*. Возмещение нативного канала GORK (Компл. *gork1-1*) приводило к восстановлению медленной компоненты тока и повышению наружунаправленной проводимости ПМ при воздействии HO^\bullet . Полученные данные указывают на то, что Цис-151 с высокой долей вероятности является редокс-сенсором в канале GORK и обеспечивает активацию данного канала в ответ на генерацию АФК в среде. Согласно работе [6] в присутствии АФК канал GORK катализирует массивный отток K^+ из клеток корня, запуская метаболические перестройки адаптивного характера и индукцию ЗКГ. Эти данные согласуются с результатами исследований, указывающими на редокс-регуляцию у сходного с каналом GORK канала SKOR [136], и дополняют их.

Заключение

Отток электролитов из тканей растений относится к наиболее ранним процессам, наблюдающимся при стрессовом воздействии различной природы (засоление, атака патогенных организмов, воздействие тяжелых металлов, окислительный стресс и др.). Утечка электролитов является одним из важнейших маркеров жизнеспособности клеток, а также индикатором стрессоустойчивости видов растений. Данное явление развивается мгновенно после стрессового воздействия и продолжается несколько часов. Стресс-индуцируемый выходящий поток электролитов опосредуется оттоком K^+ и органических

(малат²⁻, цитрат³⁻ и др.) и неорганических (Cl⁻, HPO₄²⁻, NO₃⁻ и др.) анионов. Наружунаправленные потоки анионов компенсируют заряд ввиду массивного оттока K⁺ из клеток. При сильном стрессе клетки растений могут высвободить большое количество K⁺ и его химическая активность может снижаться до 10–30 ммоль/л. Потеря K⁺ клетками корня имеет важное значение, так как в этом случае K⁺ необратимо утрачивается. В последние годы показано, что утечка электролитов при стрессе является контролируемым процессом и обеспечивается функционированием ионных каналов ПМ. Однако механизм данного явления до конца не известен. В работе представлены пилотные данные, демонстрирующие роль аминокислотного остатка Цис-151 в АФК-индуцируемой активации каналов GORK. Показано, что Цис-151 выполняет функцию редокс-чувствительного сайта канала GORK, ответственного за отток калия и индукцию выхода других электролитов из тканей растений при стрессе.

Библиографические ссылки / References

1. Demidchik V, Straltsova D, Medvedev SS, Pozhvanov GA, Sokolik A, Yurin V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of Experimental Botany*. 2015;65(5):1259–1270. DOI: 10.1093/jxb/eru004.
2. Dexter ST, Tottingham WE, Graber LF. Investigation of the hardness of plants by measurement of electrical conductivity. *Plant Physiology*. 1932;7(1):63–78. DOI: 10.1104/pp.7.1.63.
3. Demidchik V. Reactive oxygen species and their role in plant oxidative stress. In: Shabala S, editor. *Plant stress physiology*. Wallingford: CABI; 2017. p. 64–96. DOI: 10.1079/9781780647296.0064.
4. Bajji M, Kinet J-M, Lutts S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*. 2002;36(1):61–70. DOI: 10.1023/A:1014732714549.
5. Demidchik V. Mechanisms and physiological roles of K⁺ efflux from root cells. *Journal of Plant Physiology*. 2014;171(9):696–707. DOI: 10.1016/j.jplph.2014.01.015.
6. Demidchik V, Tyutereva EV, Voitsekhovskaja OV. The role of ion disequilibrium in induction of root cell death and autophagy by environmental stresses. *Functional Plant Biology*. 2018;45(2):28–46. DOI: 10.1071/FP16380.
7. Leigh RA, Jones RGW. A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and function of this ion in the plant cell. *New Phytologist*. 1984;97(1):1–13. DOI: 10.1111/J.1469-8137.1984.TB04103.X.
8. Demidchik V. Characterisation of root plasma membrane Ca²⁺-permeable cation channels: techniques and basic concepts. In: Volkov AG, editor. *Plant electrophysiology: signaling and responses*. Berlin: Springer-Verlag; 2012. p. 339–369.
9. Osterhaut WJV. *Injury, recovery, and death, in relation to conductivity and permeability*. Philadelphia: J. B. Lippincott Company; 1922. 259 p.
10. Palta JP, Levitt J, Stadelmann EJ. Freezing injury in onion bulb cells. I. Evaluation of the conductivity method and analysis of ion and sugar efflux from injured cells. *Plant Physiology*. 1977;60(3):393–397. DOI: 10.1104/pp.60.3.393.
11. Blum A, Ebercon A. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Science*. 1981;21(1):43–47. DOI: 10.2135/CROPSCI1981.0011183X002100010013X.
12. Leopold CA, Musgrave ME, Williams KM. Solute leakage resulting from leaf desiccation. *Plant Physiology*. 1981;68(6):1222–1225. DOI: 10.1104/pp.68.6.1222.
13. Atkinson MM, Midland SL, Sims JJ, Keen NT. Syringolide 1 triggers Ca²⁺ influx, K⁺ efflux, and extracellular alkalinisation in soybean cells carrying the disease-resistance gene *Rpg4*. *Plant Physiology*. 1996;112(1):297–302. DOI: 10.1104/pp.112.1.297.
14. Murphy AS, Eisinger WR, Shaff JE, Kochian LV, Taiz L. Early copper-induced leakage of K⁺ from *Arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. *Plant Physiology*. 1999;121(4):1375–1382. DOI: 10.1104/pp.121.4.1375.
15. Shabala S, Demidchik V, Shabala L, Cuin TA, Smith SJ, Miller AJ, et al. Extracellular Ca²⁺ ameliorates NaCl-induced K⁺ loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K⁺-permeable channels. *Plant Physiology*. 2006;141(4):1653–1665. DOI: 10.1104/pp.106.082388.
16. Demidchik V, Cuin TA, Svistunenko D, Smith SJ, Miller AJ, Shabala S, et al. *Arabidopsis* root K⁺ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science*. 2010;123(9):1468–1479. DOI: 10.1242/jcs.064352.
17. Zepeda-Jazo I, Shabala S, Chen Z, Pottosin II. Na⁺ – K⁺ transport in roots under salt stress. *Plant Signaling and Behavior*. 2008;3(6):401–403. DOI: 10.4161/psb.3.6.5429.
18. Shabala S, Cuin TA, Pottosin I. Polyamines prevent NaCl-induced K⁺ efflux from pea mesophyll by blocking non-selective cation channels. *FEBS Letters*. 2007;581(10):1993–1999. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.04.032.
19. Demidchik V, Shabala SN, Coutts KB, Tester MA, Davies JM. Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca²⁺- and K⁺-permeable channels in plant root cells. *Journal of Cell Science*. 2003;116(1):81–88. DOI: 10.1242/jcs.00201.
20. Laohavisit A, Mortimer JC, Demidchik V, Coxon KM, Stancombe MA, Macpherson N, et al. *Zea mays* annexins modulate cytosolic free Ca²⁺ form a Ca²⁺-permeable conductance and have peroxidase activity. *The Plant Cell*. 2009;21(2):479–493. DOI: 10.1105/tpc.108.059550.
21. Demidchik V, Shang Z, Shin R, Colaço R, Laohavisit A, Shabala S, et al. Receptor-like activity evoked by extracellular ADP in *Arabidopsis thaliana* root epidermal plasma membrane. *Plant Physiology*. 2011;156(3):1375–1385. DOI: 10.1104/pp.111.174722.
22. Shabala S. *Plant stress physiology*. Wallingford: CABI; 2017. 376 p.
23. Badri DV, Quintana N, El Kassis EG, Kim HK, Choi YH, Sugiyama A, et al. An ABC transporter mutation alters root exudation of phytochemicals that provoke an overhaul of natural soil microbiota. *Plant Physiology*. 2009;151(4):2006–2017. DOI: 10.1104/pp.109.147462.
24. Jones DL, Nguyen C, Finlay RD. Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil-root interface. *Plant and Soil*. 2009;321(1):5–33. DOI: 10.1007/s11104-009-9925-0.

25. Flowers TJ, Colmer TD. Plant salt tolerance: adaptations in halophytes. *Annals of Botany*. 2015;115(3):327–331. DOI: 10.1093/aob/mcu267.
26. Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 2008;59:651–681. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.
27. Zvanarou S, Vágnerová R, Mackievic V, Usnich S, Smolich I, Sokolik A, et al. Salt stress triggers generation of oxygen free radicals and DNA breaks in *Physcomitrella patens* protonema. *Environmental and Experimental Botany*. 2020;180:104236. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2020.104236.
28. Shabala S. Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Annals of Botany*. 2013;112(7):1209–1221. DOI: 10.1093/aob/mct205.
29. Negrão S, Schmöckel SM, Tester M. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany*. 2017;119(1):1–11. DOI: 10.1093/aob/mcw191.
30. Gilroy S, Suzuki N, Miller G, Choi W-G, Toyota M, Devireddy AR, et al. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Agricultural Advances*. 2014;19(10):623–630. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.06.013.
31. Roy SJ, Negrão S, Tester M. Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014;26:115–124. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.12.004.
32. Munns R, Termaat A. Whole-plant responses to salinity. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1986;13(1):143–160. DOI: 10.1071/PP9860143.
33. Demidchik V, Tester M. Sodium fluxes through non-selective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Physiology*. 2002;128(2):379–387. DOI: 10.1104/pp.010524.
34. Levitt J. *Responses of plant to environmental stress: water, radiation, salt and other stresses*. New York: Academic Press; 1980. 607 p.
35. Levitt J. *Responses of plants to environmental stresses*. London: Academic Press; 1972. 697 p.
36. Nassery H. The effects of salt and osmotic stress on the retention of potassium by excised barley and bean roots. *New Phytologist*. 1975;75(1):63–67. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1975.tb01371.x.
37. Nassery H. Salt induced loss of potassium from plant roots. *New Phytologist*. 1979;83(1):23–27. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1979.tb00722.x.
38. Maathuis FJM, Amtmann A. K^+ nutrition and Na^+ toxicity: the basis of cellular K^+/Na^+ ratios. *Annals of Botany*. 1999;84(2):123–133. DOI: 10.1006/anbo.1999.0912.
39. Cuin TA, Betts SA, Chalmandrier R, Shabala S. A root's ability to retain K^+ correlates with salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*. 2008;59(10):2697–2706. DOI: 10.1093/jxb/ern128.
40. Hryvusevich P, Navaselsky I, Talkachova Yu, Straltsova D, Keisham M, Viatoshkin A, et al. Sodium influx and potassium efflux currents in sunflower root cells under high salinity. *Frontiers in Plant Science*. 2021;11:613936. DOI: 10.3389/fpls.2020.613936.
41. Chen Z, Pottosin II, Cuin TA, Fuglsang AT, Tester M, Jha D, et al. Root plasma membrane transporters controlling K^+/Na^+ homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiology*. 2007;145(4):1714–1725. DOI: 10.1104/pp.107.110262.
42. Hanin M, Ebel C, Ngom M, Laplaze L, Masmoudi K. New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:1787. DOI: 10.3389/fpls.2016.01787.
43. Ahmed W, Imran M, Yaseen M, ul Haq T, Jamshaid MU, Rukh S, et al. Role of salicylic acid in regulating ethylene and physiological characteristics for alleviating salinity stress on germination, growth and yield of sweet pepper. *PeerJ*. 2020;27(8):e8475. DOI: 10.7717/peerj.8475.
44. Ebel J, Mithöfer A. Early events in the elicitation of plant defence. *Planta*. 1998;206:335–348. DOI: 10.1007/s004250050409.
45. Zimmermann S, Nürnberger T, Frachisse J-M, Wirtz W, Guern J, Hedrich R, et al. Receptor-mediated activation of a plant Ca^{2+} -permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(6):2751–2755. DOI: 10.1073/pnas.94.6.2751.
46. Kato T, Ueda T, Flijimoto K. New insecticidally active chrysanthemates. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1964;28(12):914–915. DOI: 10.1080/00021369.1964.10858319.
47. Cook A, Stall R. Effect of *Xanthomonas vesicatoria* on loss of electrolytes from leaves of *Capsicum annuum*. *Phytopathology*. 1968;58:617–619.
48. Pellizzari ED, Kuc J, Williams EB. The hypersensitive reaction in *Malus* species: changes in the leakage of electrolytes from apple leaves after inoculation with *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*. 1970;60:373–376. DOI: 10.1094/Phyto-60-373.
49. Atkinson MM, Huang J-S, Knopp JA. The hypersensitive reaction of tobacco to *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*: activation of a plasmalemma K^+/H^+ exchange mechanism. *Plant Physiology*. 1985;79(3):843–847. DOI: 10.1104/pp.79.3.843.
50. Atkinson MM, Keppler LD, Orlandi EW, Baker CJ, Mischke CF. Involvement of plasma membrane calcium influx in bacterial induction of the K^+/H^+ and hypersensitive responses in tobacco. *Plant Physiology*. 1990;92(1):215–221. DOI: 10.1104/pp.92.1.215.
51. Dunkle LD, Wolpert TJ. Independence of milo disease symptoms and electrolyte leakage induced by the host-specific toxin from *Periconia circinata*. *Physiological Plant Pathology*. 1981;18(3):315–323. DOI: 10.1016/S0048-4059(81)80082-3.
52. Pennazio S, Sapetti C. Electrolyte leakage in relation to viral and abiotic stresses inducing necrosis in cowpea leaves. *Biologia Plantarum*. 1982;24(3):218–225. DOI: 10.1007/BF02883667.
53. Finlayson JE, Pritchard MK, Rimmer SR. Electrolyte leakage and storage decay of five carrot cultivars in response to infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1989;11(3):313–316. DOI: 10.1080/07060668909501119.
54. Stover EW, Swartz HJ, Burr TJ. Crown gall formation in a diverse collection of *Vitis* genotypes inoculated with *Agrobacterium vitis*. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1997;48:26–32.
55. Sriram S, Raguchander T, Babu S, Nandakumar R, Shanmugam V, Vidhyasekaran P, et al. Inactivation of phytotoxin produced by the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Microbiology*. 2000;46(6):520–524. DOI: 10.1139/w00-018.
56. Ádám AL, Galal AA, Manninger K, Barna B. Inhibition of the development of leaf rust (*Puccinia recondita*) by treatment of wheat with allopurinol and production of a hypersensitive-like reaction in a compatible host. *Plant Pathology*. 2000;49(3):317–323. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2000.00455.x.
57. Mohanraj D, Padmanaban P, Karunakaran M. Effect of phytotoxin of *Colletotrichum falcatum* Went. (*Phylospora tucumanensis*) on sugarcane in tissue culture. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. 2003;38(1–2):21–28. DOI: 10.1556/APhyt.38.2003.1-2.4.
58. Dewir YH, El Mahrouk ME, Hafez YM, Rihan HZ, Sáez CA, Fuller MP. Antioxidative capacity and electrolyte leakage in healthy versus phytoplasma infected tissues of *Euphorbia coerulescens* and *Orbea gigantea*. *Journal of Plant Physiology & Pathology*. 2015;3(1):1–6. DOI: 10.4172/2329-955X.1000139.

59. Colcombet J, Mathieu Y, Peyronnet R, Agier N, Lelièvre F, Barbier-Brygoo H, et al. R-type anion channel activation is an essential step for ROS-dependent innate immune response in *Arabidopsis* suspension cells. *Functional Plant Biology*. 2009;36(9):832–843. DOI: 10.1071/FP09096.
60. Roelfsema MRG, Hedrich R, Geiger D. Anion channels: master switches of stress responses. *Trends in Plant Science*. 2012;17(4):221–229. DOI: 10.1016/j.tplants.2012.01.009.
61. Wei Guo, Chengcheng Wang, Zhangli Zuo, Jin-Long Qiu. The roles of anion channels in *Arabidopsis* immunity. *Plant Signaling and Behavior*. 2014;9(7):e29230. DOI: 10.4161/psb.29230.
62. Chester KS. The problem of acquired physiological immunity in plants. *Quarterly Review of Biology*. 1933;8(2):129–154.
63. Klement Z, Goodman RN. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 1967;5:17–44. DOI: 10.1146/annurev.py.05.090167.000313.
64. Balint-Kurti P. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology*. 2019;20(8):1163–1178. DOI: 10.1111/mpp.12821.
65. Goodman RN, Novacky AJ. *The hypersensitive reaction in plants to pathogens: a resistance phenomenon*. Chicago: American Phytopathological Society; 1994. 244 p.
66. Ward HM. On the relations between host and parasite in the bromes and their brown rust, *Puccinia dispersa* (Erikss.). *Annals of Botany*. 1902;os-16(2):233–316. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a088874.
67. Rossi M, Goggin FL, Milligan SB, Kaloshian I, Ullman DE, Williamson VM. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(17):9750–9754. DOI: 10.1073/pnas.95.17.9750.
68. Dropkin VH. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. *Phytopathology*. 1969;59:1632–1637.
69. Mohamed A, Ellicott A, Housley TL, Ejeta G. Hypersensitive response to *Striga* infection in *Sorghum*. *Crop Science*. 2003;43(4):1320–1324. DOI: 10.2135/cropsci2003.1320.
70. Swarbrick PJ, Huang K, Liu G, Slate J, Press MC, Scholes JD. Global patterns of gene expression in rice cultivars undergoing a susceptible or resistant interaction with the parasitic plant *Striga hermonthica*. *New Phytologist*. 2008;179(2):515–529. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02484.x.
71. Jennings DB, Daub ME, Pharr DM, Williamson JD. Constitutive expression of a celery mannitol dehydrogenase in tobacco enhances resistance to the mannitol-secreting fungal pathogen *Alternaria alternata*. *The Plant Journal*. 2002;32(1):41–49. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2001.01399.x.
72. Govrin EM, Rachmilevitch S, Tiwari BS, Solomon M, Levine A. An elicitor from *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana* and other plants and promotes the gray mold disease. *Phytopathology*. 2006;96(3):299–307. DOI: 10.1094/PHYTO-96-0299.
73. Blatt MR, Grabov A, Brearley J, Hammond-Kosack K, Jones JDG. K⁺ channels of Cf-9-transgenic tobacco guard cells as targets for *Cladosporium fulvum* Avr9. *The Plant Journal*. 1999;19(4):453–462. DOI: 10.1046/j.1365-313x.1999.00534.x.
74. Pasechnik T, Aver'yanov AA, Lapikova VP, Kovalenko ED, Kolomietz TM. The involvement of activated oxygen in the expression of the vertical and horizontal resistance of rice to blast disease. *Russian Journal of Plant Physiology*. 1998;45(3):371–378.
75. Doke N. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiological Plant Pathology*. 1983;23(3):345–357. DOI: 10.1016/0048-4059(83)90019-X.
76. De Gara L, de Pinto MC, Tommasi F. The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2003;41(10):863–870. DOI: 10.1016/S0981-9428(03)00135-9.
77. Errakhi R, Dauphin A, Meimoun P, Lehner A, Reboutier D, Vatsa P, et al. An early Ca²⁺ influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* cells. *Journal of Experimental Botany*. 2008;59(15):4259–4270. DOI: 10.1093/jxb/ern267.
78. Zhang W-H, Ryan PR, Sasaki T, Yamamoto Y, Sullivan W, Tyerman SD. Characterization of the TaALMT1 protein as an Al³⁺-activated anion channel in transformed tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells. *Plant and Cell Physiology*. 2008;49(9):1316–1330. DOI: 10.1093/pcp/pcn107.
79. De Vos CHR, Schat H, De Waal MAM, Vooijs R, Ernst WHO. Increased resistance to copper induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Physiologia Plantarum*. 1991;82(4):523–528. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1991.tb02942.x.
80. De Vos CHR, Schat H, Vooijs R, Ernst WHO. Copper induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. *Journal of Plant Physiology*. 1989;135(2):164–165. DOI: 10.1016/S0176-1617(89)80171-3.
81. De Vos CHR, Ten Bookum WM, Vooijs R, Schat H, De Kok LJ. Effect of copper on fatty acid composition and peroxidation of lipids in the roots of copper tolerant and sensitive *Silene cucubalus*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 1993;31(2):151–158.
82. Murphy A, Taiz L. Correlation between potassium efflux and copper sensitivity in ten *Arabidopsis* ecotypes. *New Phytologist*. 1997;136(2):211–222.
83. Demidchik V, Sokolik A, Yurin V. The effect of Cu²⁺ on ion transport systems of the plant cell plasmalemma. *Plant Physiology*. 1997;114(4):1313–1325. DOI: 10.1104/pp.114.4.1313.
84. Demidchik V, Sokolik A, Yurin V. Characteristics of non-specific permeability and H⁺-ATPase inhibition induced in the plasma membrane of *Nitella flexilis* by excessive Cu²⁺. *Planta*. 2001;212:583–590. DOI: 10.1007/s004250000422.
85. Demidchik V, Maathuis FJM. Physiological roles of non-selective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*. 2007;175(3):387–405. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x.
86. Laohavisit A, Shang Z, Rubio L, Cuin TA, Véry AA, Wang A, et al. *Arabidopsis* annexin1 mediates the radical-activated plasma membrane Ca²⁺- and K⁺-permeable conductance in root cells. *The Plant Cell*. 2012;24(4):1522–1533. DOI: 10.1105/tpc.112.097881.
87. Kai H, Iba K. Temperature stress in plants. *eLS* [Internet]. 2014 [cited 2022 February 1]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/9780470015902.a0001320.pub2>. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001320.pub2.
88. Meryman HT. Freezing injury and its prevention in living cells. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*. 1974;3:341–363. DOI: 10.1146/annurev.bb.03.060174.002013.
89. Givelberg A, Horowitz M, Poljakoff-Mayber A. Solute leakage from *Solanum nigrum* L. seeds exposed to high temperatures during imbibition. *Journal of Experimental Botany*. 1984;35(12):1754–1763. DOI: 10.1093/jxb/35.12.1754.

90. Gay C, Corbineau F, Côme D. Effects of temperature and oxygen on seed germination and seedling growth in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Environmental and Experimental Botany*. 1991;31(2):193–200. DOI: 10.1016/0098-8472(91)90070-5.
91. Leinonen I, Hänninen H, Repo T. Testing of frost hardiness models for *Pinus sylvestris* in natural conditions and in elevated temperature. *Silva Fennica*. 1996;30(2–3):5583. DOI: 10.14214/sf.a9228.
92. Janda T, Szalai G, Ducruet J-M, Páldi E. Changes in photosynthesis in inbred maize lines with different degrees of chilling tolerance grown at optimum and suboptimum temperatures. *Photosynthetica*. 1998;35:205–212. DOI: 10.1023/A:1006954605631.
93. Kang HM, Saltveit ME. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiologia Plantarum*. 2002;115(4):571–576. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2002.1150411.x.
94. Zhou W, Leul M. Uniconazole-induced alleviation of freezing injury in relation to changes in hormonal balance, enzyme activities and lipid peroxidation in winter rape. *Plant Growth Regulation*. 1998;26(1):41–47. DOI: 10.1023/A:1006004921265.
95. Ismail AM, Hall AE. Reproductive-stage heat tolerance, leaf membrane thermostability and plant morphology in cowpea. *Crop Physiology & Metabolism*. 1999;39(6):1762–1768. DOI: 10.2135/cropsci1999.3961762x.
96. Saelim S, Zwiazek JJ. Preservation of thermal stability of cell membranes and gas exchange in high temperature acclimated *Xylia xylocarpa* seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 2000;156(3):380–385. DOI: 10.1016/S0176-1617(00)80077-2.
97. Coursolle C, Bigras FJ, Margolis HA. Assessment of root freezing damage of two-year-old white spruce, black spruce and jack pine seedlings. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 2000;15(3):343–353. DOI: 10.1080/028275800447977.
98. Campos PS, Quartin V, Ramalho JC, Nunes MA. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of Plant Physiology*. 2003;160(3):283–292. DOI: 10.1078/0176-1617-00833.
99. Clarke SM, Mur LAJ, Wood JE, Scott IM. Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 2004;38(3):432–447. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.02054.x.
100. Wahid A, Shabbir A. Induction of heat stress tolerance in barley seedlings by pre-sowing seed treatment with glycinebetaine. *Plant Growth Regulation*. 2005;46(2):133–141. DOI: 10.1007/s10725-005-8379-5.
101. Sayyari M, Babalar M, Kalantari S, Serrano M, Valero D. Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in stored pomegranates. *Postharvest Biology and Technology*. 2009;53(3):152–154. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2009.03.005.
102. Biswas SK, Pandey NK, Rajik M. Inductions of defense response in tomato against *Fusarium* wilt through inorganic chemicals as inducers. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*. 2012;3(4):128–135. DOI: 10.4172/2157-7471.1000128.
103. Hara M, Terashima S, Fukaya T, Kuboi T. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*. 2003;217(2):290–298. DOI: 10.1007/s00425-003-0986-7.
104. Hayes S, Schachtschabel J, Mishkind M, Munnik T, Arisz SA. Hot topic: thermosensing in plants. *Plant Cell and Environment*. 2021;44(7):2018–2033. DOI: 10.1111/pce.13979.
105. Finka A, Cuendet AFH, Maathuis FJM, Saidi Y, Goloubinoff P. Plasma membrane cyclic nucleotide gated calcium channels control land plant thermal sensing and acquired thermotolerance. *Plant Cell*. 2012;24(8):3333–3348. DOI: 10.1105/tpc.112.095844.
106. Saidi Y, Finka A, Muriset M, Bromberg Z, Weiss YG, Maathuis FJ, et al. The heat shock response in moss plants is regulated by specific calcium-permeable channels in the plasma membrane. *Plant Cell*. 2009;21(9):2829–2843. DOI: 10.1105/tpc.108.065318.
107. Yongmei Cui, Shan Lu, Zhan Li, Jiawen Cheng, Peng Hu, Tianquan Zhu, et al. Cyclic nucleotide-gated ion channels 14 and 16 promote tolerance to heat and chilling in rice. *Plant Physiology*. 2020;183(4):1794–1808. DOI: 10.1104/pp.20.00591.
108. Rahman Ar, Kawamura Y, Maeshima M, Rahman Ab, Uemura M. Plasma membrane aquaporin members PIPs act in concert to regulate cold acclimation and freezing tolerance responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. 2020;61(4):787–802. DOI: 10.1093/pcp/pcaa005.
109. Bewley JD. Physiological aspects of desiccation tolerance. *Annual Review of Plant Physiology*. 1979;30:195–238. DOI: 10.1146/annurev.pp.30.060179.001211.
110. McKersie BD, Stinson RH. Effect of dehydration on leakage and membrane structure in *Lotus corniculatus* L. seeds. *Plant Physiology*. 1980;66(2):316–320.
111. McKersie BD, Tomes DT. Effects of dehydration treatments on germination, seedling vigour, and cytoplasmic leakage in wild oats and birdsfoot trefoil. *Canadian Journal of Botany*. 1980;58(4):471–476. DOI: 10.1139/b80-056.
112. Becwar MR, Stanwood PC, Roos EE. Dehydration effects on imbibitional leakage from desiccation-sensitive seeds. *Plant Physiology*. 1982;69(5):1132–1135. DOI: 10.1104/pp.69.5.1132.
113. Senaratna T, McKersie BD. Dehydration injury in germinating soybean (*Glycine max* L. Merr.) seeds. *Plant Physiology*. 1983;72(3):620–624. DOI: 10.1104/pp.72.3.620.
114. Yongchao Liang, Qin Chen, Qian Liu, Wenhua Zhang, Ruixing Ding. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Physiology*. 2003;160(10):1157–1164. DOI: 10.1078/0176-1617-01065.
115. Nayyar H, Gupta D. Differential sensitivity of C₃ and C₄ plants to water deficit stress: association with oxidative stress and antioxidants. *Environmental and Experimental Botany*. 2006;58(1–3):106–113. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2005.06.021.
116. Fang-Zheng Wang, Qing-Bin Wang, Suk-Yoon Kwon, Sang-Soo Kwak, Wei-Ai Su. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *Journal of Plant Physiology*. 2005;162(4):465–472. DOI: 10.1016/j.jplph.2004.09.009.
117. Guo Z, Ou W, Lu S, Zhong Q. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2006;44(11–12):828–836. DOI: 10.1016/j.plaphy.2006.10.024.
118. Hayat S, Hasan SA, Fariduddin Q, Ahmad A. Growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in response to salicylic acid under water stress. *Journal of Plant Interactions*. 2008;3(4):297–304. DOI: 10.1080/17429140802320797.
119. Faize M, Burgos L, Faize L, Piqueras A, Nicolas E, Barba-Espin G, et al. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *Journal of Experimental Botany*. 2011;62(8):2599–2613. DOI: 10.1093/jxb/erq432.
120. Chao Li, Dun-Xian Tan, Dong Liang, Cong Chang, Dongfeng Jia, Fengwang Ma. Melatonin mediates the regulation of ABA metabolism, free-radical scavenging, and stomatal behaviour in two *Malus* species under drought stress. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66(3):669–680. DOI: 10.1093/jxb/eru476.
121. Guadagno CR, Ewers BE, Speckman HN, Aston TL, Huhn BJ, DeVore SB, et al. Dead or alive? Using membrane failure and chlorophyll *a* fluorescence to predict plant mortality from drought. *Plant Physiology*. 2017;175(1):223–234. DOI: 10.1104/pp.16.00581.

122. Kamali S, Mehraban A. Effects of nitroxin and arbuscular mycorrhizal fungi on the agro-physiological traits and grain yield of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) under drought stress conditions. *PLoS One*. 2020;15(12):e0243824. DOI: 10.1371/journal.pone.0243824.
123. Kashtoh H, Baek KH. Structural and functional insights into the role of guard cell ion channels in abiotic stress-induced stomatal closure. *Plants*. 2021;10(12):2774. DOI: 10.3390/plants10122774.
124. Xue Feng, Wenxing Liu, Cheng-Wei Qiu, Fanrong Zeng, Yizhou Wang, Guoping Zhang, et al. HvAKT2 and HvHAK1 confer drought tolerance in barley through enhanced leaf mesophyll H⁺ homeostasis. *Plant Biotechnology Journal*. 2020;18(8):1683–1696. DOI: 10.1111/pbi.13332.
125. Xue Feng, Wenxing Liu, Fangbin Cao, Yizhou Wang, Guoping Zhang, Zhong-Hua Chen. Overexpression of *HvAKT1* improves drought tolerance in barley by regulating root ion homeostasis and ROS and NO signaling. *Journal of Experimental Botany*. 2020;71(20):6587–6600. DOI: 10.1093/jxb/eraa354.
126. Verma H, Devi K, Baruah AR, Sarma RN. Relationship of root aquaporin genes, *OsPIP1;3*, *OsPIP2;4*, *OsPIP2;5*, *OsTIP2;1* and *OsNIP2;1* expression with drought tolerance in rice. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2020;80(1):50–57. DOI: 10.31742/IJGPB.80.1.6.
127. Xi-Dong Li, Yong-Qiang Gao, Wei-Hua Wu, Li-Mei Chen, Yi Wang. Two calcium-dependent protein kinases enhance maize drought tolerance by activating anion channel ZmSLAC1 in guard cells. *Plant Biotechnology Journal*. 2022;20(1):143–157. DOI: 10.1111/pbi.13701.
128. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 5th edition. New York: Oxford University Press; 2015. 944 p. DOI: 10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001.
129. Koppenol WH. The centennial of the Fenton reaction. *Free Radical Biology and Medicine*. 1993;15(6):645–651. DOI: 10.1016/0891-5849(93)90168-t.
130. Lee DH, Lal NK, Lin Z-JD, Ma S, Liu J, Castro B, et al. Regulation of reactive oxygen species during plant immunity through phosphorylation and ubiquitination of RBOHD. *Nature Communications*. 2020;11(1):1838. DOI: 10.1038/s41467-020-15601-5.
131. Byeong-ha Lee, Hojung Lee, Liming Xiong, Jian-Kang Zhu. A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression. *The Plant Cell*. 2002;14(6):1235–1251. DOI: 10.1105/tpc.010433.
132. Edreva A, Yordanov I, Kardjieva R, Gesheva E. Heat shock responses of bean plants: involvement of free radicals, antioxidants and free radical/active oxygen scavenging systems. *Biologia Plantarum*. 1998;41:185–191. DOI: 10.1023/A:1001846009471.
133. Chengrun Wang, Xiaorong Wang, Yuan Tian, Yingang Xue, Xianghua Xu, Yunxia Sui, et al. Oxidative stress and potential biomarkers in tomato seedlings subjected to soil lead contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2008;71(3):685–691. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.01.002.
134. Ning Hui Song, Xiao Le Yin, Guo Feng Chen, Hong Yang. Biological responses of wheat (*Triticum aestivum*) plants to the herbicide chlorotoluron in soils. *Chemosphere*. 2007;68(9):1779–1787. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.03.023.
135. Vera-Estrella R, Blumwald E, Higgins VJ. Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells 1: evidence for the involvement of active oxygen species. *Plant Physiology*. 1992;99(3):1208–1215. DOI: 10.1104/pp.99.3.1208.
136. Garcia-Mata C, Wang J, Gajdanowicz P, Gonzalez W, Hills A, Donald N, et al. A minimal cysteine motif required to activate the SKOR K channel of *Arabidopsis* by the reactive oxygen species H₂O₂. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285(38):29286–29294. DOI: 10.1074/jbc.M110.141176.
137. Demidchik V. Cation channels are sensors of ROS and oxidative stress in plants. In: *Proceedings of 4th International symposium on plant signaling and behaviour; 2016 June 19–24; Saint Petersburg, Russia*. Saint Petersburg: SINEL Co. Ltd.; 2016. p. 55–56.
138. Makavitskaya M, Svistunenko D, Navaselsky I, Hryvusevich P, Mackievic V, Rabadanova C, et al. Novel roles of ascorbate in plants: induction of cytosolic Ca²⁺ signals and efflux from cells via anion channels. *Journal of Experimental Botany*. 2018;69(14):3477–3489. DOI: 10.1093/jxb/ery056.

Получена 17.06.2022 / исправлена 20.06.2022 / принята 23.06.2022.
Received 17.06.2022 / revised 20.06.2022 / accepted 23.06.2022.

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 612.112.94+616-097.1]:575.11]:602.6

НОКАУТ ГЕНОВ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА И HLA КЛАССА I В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9

Е. В. КУШНЕРОВА¹⁾, А. А. МИГАС¹⁾, А. В. КЛЫЧ¹⁾, Е. А. ЛАСЮКОВ¹⁾, А. Н. МЕЛЕШКО¹⁾

¹⁾Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский район, Беларусь

Система геномного редактирования CRISPR/Cas9, как инструмент для нокаута генов, нашла широкое применение в клеточной биологии для получения клеток определенного фенотипа. В частности, она используется для создания универсальных донорских CAR-T-лимфоцитов путем нокаута генов *TRAC*, *TRBC1* и *TRBC2* Т-клеточного

Образец цитирования:

Кушнерова ЕВ, Мигас АА, Клыч АВ, Ласюков ЕА, Мелешко АН. Нокаут генов Т-клеточного рецептора и HLA класса I в клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;2:19–26.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-19-26>

For citation:

Kushniarova LV, Migas AA, Klych HV, Lasiukov YA, Meleshko AN. Knockout of the T-cell receptor and HLA class I genes in human cells using the CRISPR/Cas9 system. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;2:19–26. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-19-26>

Авторы:

Елизавета Викторовна Кушнерова – младший научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий.
Александр Александрович Мигас – старший научный сотрудник лаборатории иммунологии.
Анна Васильевна Клыч – младший научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий.
Евгений Анатольевич Ласюков – младший научный сотрудник лаборатории иммунологии.
Александр Николаевич Мелешко – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией генетических биотехнологий.

Authors:

Lizaveta V. Kushniarova, junior researcher at the laboratory of genetic biotechnologies.
elizaveta.kushnerova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-2092-1590>
Alexandr A. Migas, senior researcher at the laboratory of immunology.
alexandr.migas@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7013-9847>
Hanna V. Klych, junior researcher at the laboratory of genetic biotechnologies.
hannaklych@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-2898-2419>
Yauheni A. Lasiukov, junior researcher at the laboratory of immunology.
zhenya_lasyukov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4183-0134>
Alexander N. Meleshko, PhD (biology); head of the laboratory of genetic biotechnologies.
meleshko@tut.by
<https://orcid.org/0000-0001-6964-3635>

рецептора и гена *B2M*, входящего в состав HLA класса I. Для получения большого количества клеток нужного фенотипа необходимо оптимизировать систему геномного редактирования, эффективность которой определяется используемой sgRNA. В настоящей работе экспериментально определены последовательности, позволяющие получить до 60,3 % клеток, негативных по экспрессии белка B2M, и до 71,8 % клеток, негативных по экспрессии T-клеточного рецептора. Также показано, что одновременное использование двух sgRNA для нокаута гена демонстрирует более низкую эффективность по сравнению с использованием данных sgRNA по отдельности.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9; sgRNA; T-клеточный рецептор; B2M; нокаут гена.

KNOCKOUT OF THE T-CELL RECEPTOR AND HLA CLASS I GENES IN HUMAN CELLS USING THE CRISPR/Cas9 SYSTEM

L. V. KUSHNIAROVA^a, A. A. MIGAS^a, H. V. KLYCH^a, Y. A. LASIUKOV^a, A. N. MELESHKO^a

^aBelarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
43 Frunzienskaja Street, Baraŭliany 223053, Minsk District, Belarus

Corresponding author: L. V. Kushniarova (elizaveta.kushnerova@gmail.com)

The CRISPR/Cas9 system has found a wide application in cell biology as a tool for gene knockout. In particular, the CRISPR/Cas9 system is used to create allogeneic CAR-T lymphocytes by knocking out the genes *TRAC*, *TRBC1*, *TRBC2* and *B2M*. To obtain a large number of cells of the desired phenotype, it is necessary to optimise the process of genomic editing, the effectiveness of which is determined by the sgRNA used. In this work, we experimentally determined the most effective sequences that allow to obtain up to 60.3 % of cells negative for the expression of the B2M protein and up to 71.8 % of cells negative for the expression of the T-cell receptor. It has also been shown that the simultaneous use of two sgRNAs for gene knockout demonstrates a lower efficiency compared to using these sgRNAs separately.

Keywords: CRISPR/Cas9; sgRNA; T-cell receptor; B2M; gene knockout.

Введение

Система геномного редактирования CRISPR/Cas9 (от англ. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* – сгруппированные короткие палиндромные повторы с регулярными промежутками), открытая в контексте изучения приобретенного иммунитета бактерий, вскоре была успешно адаптирована в качестве практического инструмента, позволяющего вносить мутации в произвольные участки ДНК. Используемая в генной инженерии система CRISPR/Cas9 состоит из ДНК-эндонуклеазы Cas9 и sgRNA (от англ. *single guide RNA* – одиночная гидовая РНК), искусственной молекулы, представляющей собой гибрид двух РНК-компонентов. Первый компонент – это 20-нуклеотидная последовательность, комплементарная редактируемому участку генома, второй компонент – это scRNA (от англ. *scaffold RNA* – каркасная РНК), которая за счет своей вторичной структуры связывается с белком Cas9, что приводит к формированию активного эндонуклеазного комплекса. Система CRISPR/Cas9 вносит двухцепочечный разрыв в определенный участок ДНК, который должен быть комплементарен sgRNA и иметь на 3'-конце специфический нуклеотидный сигнал PAM (от англ. *protospacer adjacent motive* – смежный мотив протоспейсера). Необходимость соблюдения данных условий обеспечивает высокую точность геномного редактирования [1].

Система CRISPR/Cas9 широко применяется для нокаута генов, так как образованные в результате действия эндонуклеазы свободные концы ДНК соединяются друг с другом за счет внутриклеточного репарационного комплекса NHEJ (от англ. *non-homologous end joining* – негомологичное восстановление концов), который вносит по месту разрыва короткие инсерции и делеции, приводящие к сдвигу рамки считывания.

В частности, данный метод нокаута генов применяется для создания *off the shelf* аллогенных CAR-T-клеток для терапии онкологических заболеваний. Такие CAR-T-клетки, получаемые на материале T-лимфоцитов здоровых доноров, позволяют решить основные проблемы, связанные с аутологичной CAR-T-терапией (малое количество T-клеток, недостаточное для производства нескольких доз, дисфункциональное состояние T-лимфоцитов, длительное время получения CAR-T-продукта и его высокая стоимость).

В данном случае система CRISPR/Cas9 используется для нокаута генов, обеспечивающих экспрессию на поверхности T-лимфоцитов T-клеточного рецептора и комплексов HLA класса I. Это позволяет получать донорские CAR-T-клетки, способные длительное время персистировать в организме реципиента без развития реакции «трансплантат против хозяина» [2].

Ключевое требование для производства *off the shelf* алогенных CAR-T-клеток – это высокий выход Т-лимфоцитов с ожидаемым фенотипом, который, в свою очередь, зависит от эффективности геномного редактирования, а последняя определяется методом доставки элементов системы CRISPR/Cas9 в клетки и особенностями используемой sgRNA. Эффективность sgRNA может быть предсказана с помощью биоинформатических алгоритмов, однако они не учитывают влияние факторов внутриклеточной среды, таких как, например, функциональное состояние хроматина в редактируемом участке, поэтому реальная эффективность sgRNA часто не соответствует теоретической [3].

Таким образом, выбор sgRNA для нокаута генов в целях получения клеток определенного фенотипа требует предварительной экспериментальной проверки ее эффективности.

Цель данной работы – оценить на модельных клеточных линиях эффективность различных вариантов sgRNA, а также их сочетаний и выявить те из них, которые позволяют добиться наибольшего выхода клеток, негативных по экспрессии Т-клеточного рецептора и HLA класса I.

Материалы и методы исследования

Клеточные линии. В работе использовались клеточные линии HEK293T и Jurkat. Клетки линии HEK293T культивировались в полной среде DMEM (10 % FBS), клетки линии Jurkat – в полной среде RPMI 1640 (10 % FBS).

sgRNA. Подбор потенциальных sgRNA проводился с помощью веб-инструмента *CRISPOR* (версия генома hg19, эндонуклеаза SpCas9) [4]. При выборе sgRNA учитывалось количество *off-target*-мишеней, у которых 12-нуклеотидная последовательность, примыкающая к PAM, полностью комплементарна целевой мишени. Для редактирования гена *B2M* были подобраны sgRNA, комплементарные участкам экзона 1 и интрона 1–2, для редактирования гена *TRAC* – sgRNA, комплементарные участкам экзона 1, для редактирования генов *TRBC1* и *TRBC2* – sgRNA, комплементарные гомологичным участкам экзона 1 (см. таблицу).

Варианты sgRNA
sgRNA variants

Код	Последовательность (5' – 3')*	PAM	Цепь	Количество <i>off-target</i> -мишеней
B2M1	CGCGAGCACAGCTAAGGCCA	CGG	–	5
B2M2	CTCGCGCTACTCTCTTTTC	TGG	+	8
B2M3	GGCCACGGAGCGAGACATCT	CGG	–	2
B2M4	GCTACTCTCTTTCTGGCC	TGG	+	13
B2M5	CTACTAGCCCCATCAAGAGG	TGG	–	20
B2M6	ACTCACGCTGGATAGCCTCC	AGG	–	1
B2M7	GGCCGAGATGTCTCGCTCCG	TGG	+	0
B2M8	AGGGTAGGAGAGACTCACGC	TGG	–	0
TRAC1	TGTGCTAGACATGAGGTCTA	TGG	+	6
TRAC2	AGAGTCTCTCAGCTGGTACA	CGG	–	7
TRAC3	TAGGCAGACAGACTTGTCAC	TGG	–	7
TRAC4	AACAAATGTGTCACAAAGTA	AGG	+	4
TRBC1	GCAGTATCTGGAGTCATTGA	GGG	–	18
TRBC2	GGAGAATGACGAGTGGACCC	AGG	+	2

*Указаны 20-нуклеотидные последовательности sgRNA, комплементарные участку гена-мишени, последовательности scRNA опущены, так как они одинаковы для всех вариантов.

Сборка векторных конструкций. Для доставки элементов системы CRISPR/Cas9 в клетки использовалась плаزمида pX333 (№ 64073 в каталоге *Addgene*), содержащая две экспрессионные кассеты с человеческим вариантом промотора U6 и последовательностью scRNA для экспрессии sgRNA в эукариотических клетках, а также ген *SpCas9* под промотором CBh. Клонирование sgRNA в плазмиду pX333 проводилось по протоколу *Zhang Lab* [5]. Для каждой sgRNA были синтезированы два олигонуклеотида:

- 5'-CACCGN₍₂₀₎-3', где N₍₂₀₎ – 20-нуклеотидный участок sgRNA, комплементарный гену-мишени;
- 3'-CN₍₂₀₎CAAA-5', где N₍₂₀₎ – последовательность, комплементарная первому олигонуклеотиду.

Оба полученных олигонуклеотида отжигали и фосфорилировали с помощью T4-полинуклеотидкиназы, после чего лигировали в плазмиду рХ333 по сайтам рестрикции BbsI или BsaI. Правильность вставки определяли секвенированием по Сенгеру.

Трансфекция. Трансфекцию клеток линии НЕК293Т проводили в 6-луночной планшете при концентрации клеток $3 \cdot 10^5$ на лунку. Трансфецирующая смесь содержала 3,3 мкг плазмиды и 5,0 мкг линейного полиэтиленimina с молекулярной массой 8 кДа.

Трансфекцию клеток линии Jurkat осуществляли методом электропорации на приборе Neon (*Invitrogen*, США) в 96-луночной планшете при концентрации клеток $5 \cdot 10^4$ на лунку. Количество плазмиды составляло 1 мкг. Параметры электропорации – 1325 В, 10 мс, 3 импульса. Результаты трансфекции регистрировались на 4-е сутки. Эффективность нокаута (в процентах) определялась по изменению поверхностной экспрессии Т-клеточного рецептора и белка В2М и рассчитывалась по следующей формуле:

$$E = 100 - \left(\frac{x}{y} \cdot 100 \right),$$

где x – доля позитивных клеток после трансфекции, %; y – доля позитивных клеток до трансфекции, %.

Проточная цитометрия. Поверхностная экспрессия белка В2М и $\alpha\beta$ Т-клеточного рецептора определялась на приборе DxFLEX (*Beckman Coulter*, США) с использованием антител anti-B2M-PE/Cy5.5 (*Abcam*, Великобритания), anti- $\alpha\beta$ TCR-FITC (*BD Biosciences*, США).

Статистика. Построение графиков и статистический анализ результатов осуществлялись с помощью программного обеспечения *GraphPad Prism 6* (*GraphPad Software Inc.*, США). Сравнение двух независимых групп данных проводилось методом Манна – Уитни, корреляционный анализ выполнялся по методу Спирмена. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Маркером эффективности нокаута гена *B2M* являлось изменение экспрессии соответствующего белка на поверхности клеток линии НЕК293Т. В случае нокаута генов *TRAC*, *TRBC1* и *TRBC2* эффективность нокаута измерялась по изменению уровня экспрессии $\alpha\beta$ Т-клеточного рецептора на поверхности клеток линии Jurkat.

Авторы предположили, что одновременное использование двух sgRNA для редактирования одного гена-мишени позволит увеличить вероятность нокаута за счет внесения протяженных делеций. Для нокаута гена *B2M* анализировались сочетания В2М1 + В2М6, В2М2 + В2М3, В2М4 + В2М5, В2М7 + В2М8, а для нокаута генов *TRAC*, *TRBC1* и *TRBC2* – сочетания TRAC1 + TRAC2, TRAC3 + TRAC4, TRBC1 + TRBC2 (рис. 1).

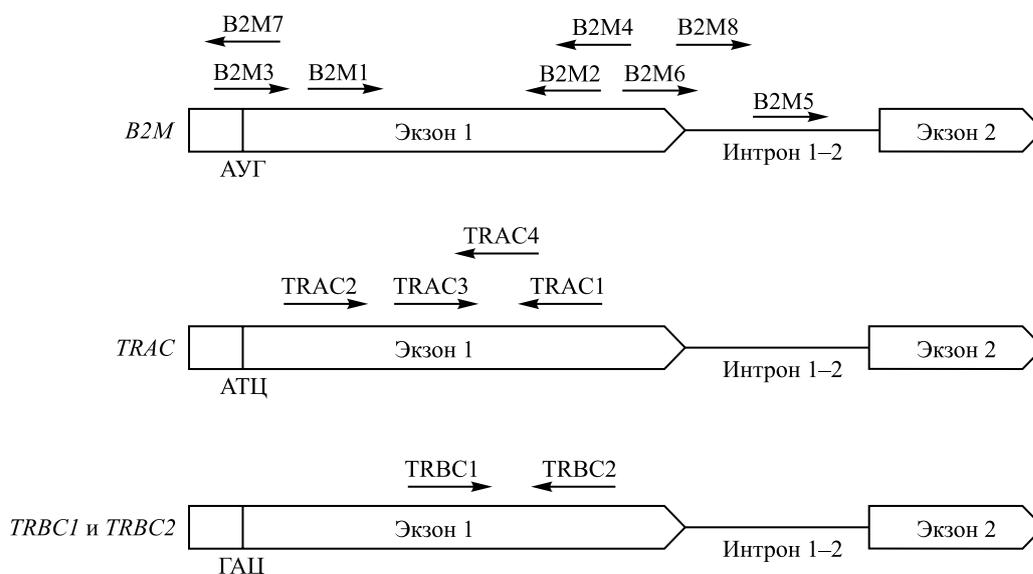


Рис. 1. Расположение участков-мишеней sgRNA в геномной ДНК (в экзоне 1 отмечен первый транслируемый кодон)

Fig. 1. Location of sgRNA target regions in genomic DNA (the first translated codon is marked on exon 1)

Наибольшую эффективность геномного редактирования в случае нокаута гена *B2M* продемонстрировали сочетания B2M2 + B2M3 и B2M7 + B2M8 (32,8 и 22,4 % соответственно) (рис. 2, а), наименьшую – сочетание B2M4 + B2M5 (10,1 %). Мишень sgRNA B2M5 расположена в интроне 1–2 и затрагивает сайт связывания транскрипционного репрессора CTCF, одной из функций которого является регуляция альтернативного сплайсинга мРНК [6]. Мишень sgRNA B2M4 располагается на конце экзона 1 и согласно работе [7] позволяет получить около 48 % B2M-негативных клеток линии HEK293T. Одно из возможных объяснений низкого выхода нокаутированных клеток в рассматриваемом случае состоит в следующем: внесение мутаций в регуляторную последовательность внутри интрона при использовании sgRNA B2M5 не приводит к значительным нарушениям сплайсинга, тем не менее данная sgRNA конкурирует с sgRNA B2M4 за связывание с эндонуклеазой Cas9, в результате чего концентрация комплексов B2M4 – Cas9 и, соответственно, вероятность внесения двухцепочечного разрыва в экзон 1 гена *B2M* снижаются.

В случае нокаута генов, кодирующих константные регионы цепей Т-клеточного рецептора, все сочетания sgRNA продемонстрировали одинаково высокую эффективность (около 40 % негативных клеток) (рис. 2, б).

Далее все sgRNA для генов *TRAC*, *TRBC1* и *TRBC2*, а также sgRNA B2M2, B2M3, B2M7 и B2M8 были клонированы по отдельности в вектор pX333 по сайту BbsI для определения их индивидуальной эффективности (рис. 3).

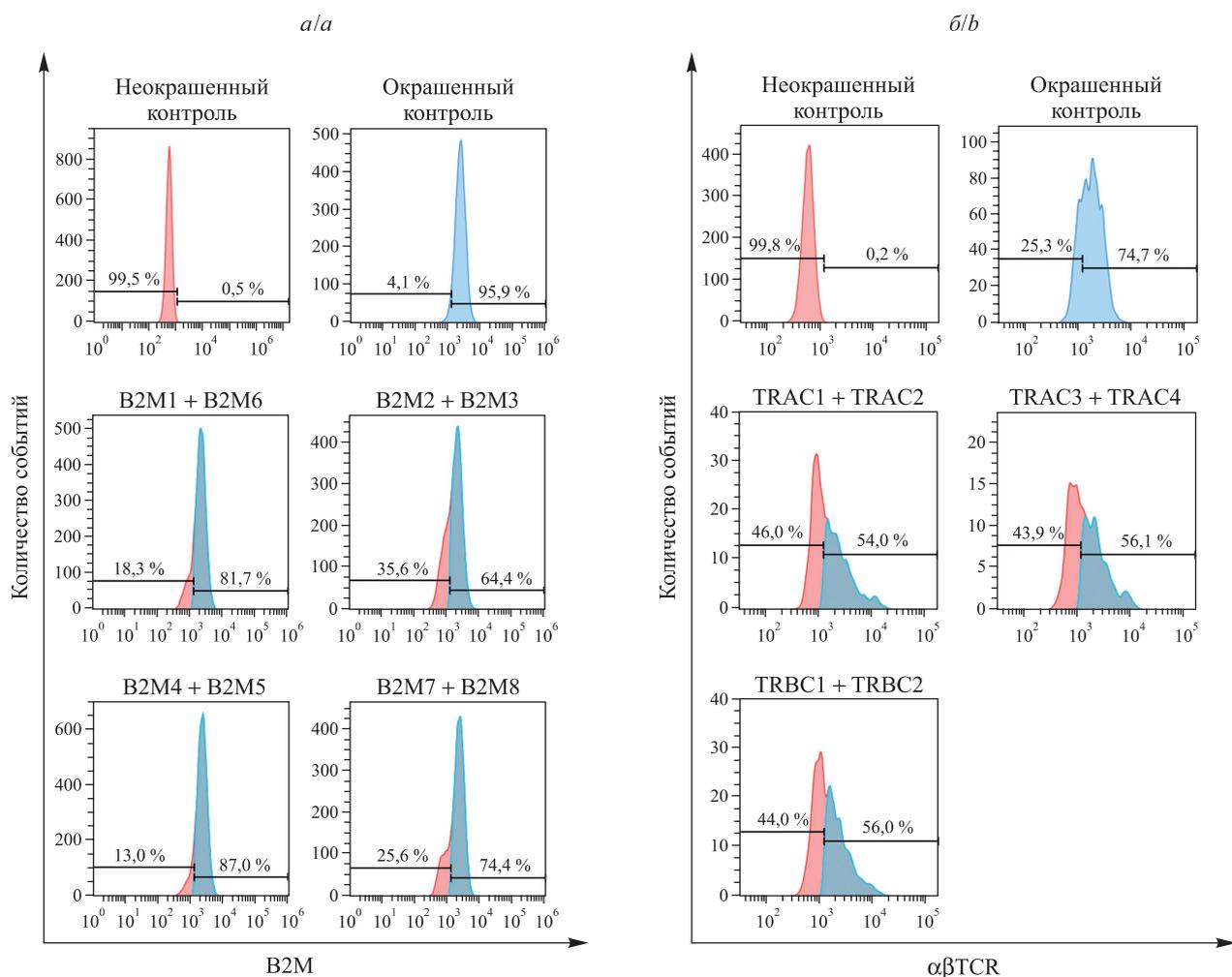


Рис. 2. Изменение поверхностной экспрессии белка B2M в клетках линии HEK293T (а) и Т-клеточного рецептора в клетках линии Jurkat (б) после геномного редактирования с использованием двух sgRNA

Fig. 2. Changes in the surface expression of the B2M protein in HEK293T cells (a) and the T-cell receptor in Jurkat cells (b) after genomic editing using two sgRNAs

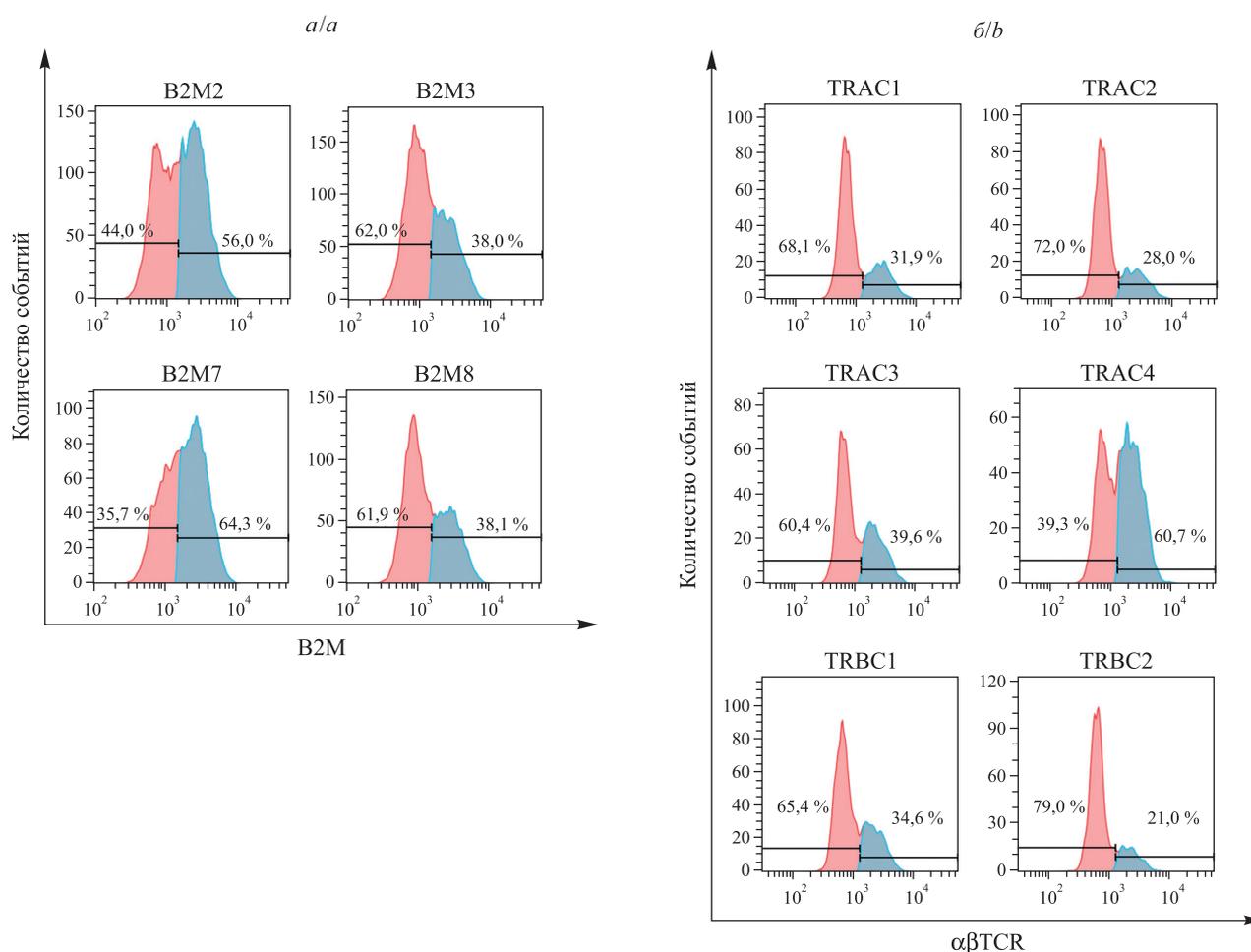


Рис. 3. Изменение поверхностной экспрессии белка B2M в клетках линии HEK293T (а) и Т-клеточного рецептора в клетках линии Jurkat (б) после геномного редактирования с использованием одной sgRNA

Fig. 3. Changes in the surface expression of the B2M protein in HEK293T cells (a) and the T-cell receptor in Jurkat cells (b) after genomic editing using a single sgRNA

Наибольший выход B2M-нокаутированных клеток (около 60,3 %) наблюдался при использовании sgRNA B2M3 и B2M8. Высокая эффективность обоих вариантов может быть объяснена тем, что области внесения двухцепочечных разрывов данных sgRNA (пять нуклеотидов выше РАМ-сайта) захватывают ключевые функциональные участки гена (старт-кодон в случае B2M3 и донорный сайт сплайсинга в случае B2M8).

Наиболее высокий выход клеток, негативных по экспрессии Т-клеточного рецептора (71,8 %), был получен при использовании sgRNA TRBC2. Что интересно, sgRNA TRBC2 и TRBC1, мишенью которых являются гомологичные участки экзона 1 генов *TRBC1* и *TRBC2*, продемонстрировали высокую эффективность редактирования, несмотря на то что их целевые последовательности присутствуют в геноме в четырех копиях. Данное наблюдение согласуется с результатами работы [8], в которой было показано, что эффективность редактирования не зависит от количества копий мишени в геноме.

Авторы не обнаружили статистически значимых различий в эффективности редактирования в зависимости от локализации участка-мишени в ДНК (начало, середина или конец экзона 1, плюс-цепь или минус-цепь ДНК), а также корреляционной зависимости между выходом нокаутированных клеток и количеством потенциальных *off-target*-мишеней, которые теоретически могут конкурировать с целевыми мишенями за связывание комплексов sgRNA – Cas9. Таким образом, эффективность нокаута, вероятно, в большей степени определяется не локализацией участка-мишени, а внутренними характеристиками sgRNA, исследование которых выходит за рамки данной работы.

Что интересно, эффективность нокаута при использовании одной sgRNA оказалась выше, чем при одновременном использовании двух sgRNA (рис. 4).

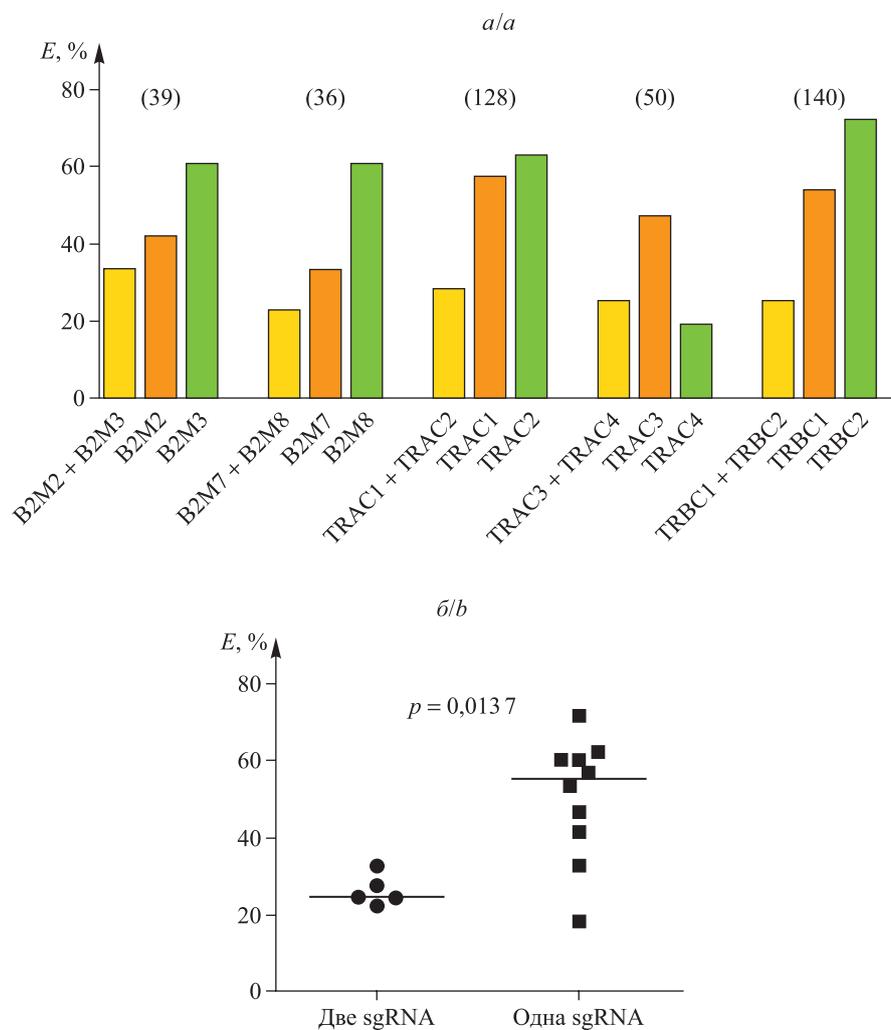


Рис. 4. Сравнение эффективности генного нокаута с использованием одной и двух sgRNA (на верхнем графике в скобках указано расстояние между двумя сайтами разрезания Cas9)
Fig. 4. Comparison of gene knockout efficiency using one and two sgRNAs (on the upper graph, the distance in base pairs between the two Cas9 cutting sites is shown in parentheses)

В работе [9] было показано, что в случае тандемного расположения двух экспрессионных кассет с промотором hU6 эффективность нокаута снижается в связи со снижением уровня экспрессии обеих sgRNA. Так как при использовании разных промоторов (hU6 и mU6) уровень экспрессии обеих sgRNA и доля нокаутированных клеток были выше, авторы объяснили данное наблюдение конкуренцией между двумя одинаковыми близко расположенными промоторами.

Однако в рассматриваемом случае уровень экспрессии sgRNA не объясняет наблюдаемых различий, так как проверка отдельных вариантов и их сочетаний проводилась с использованием одного и того же вектора, содержащего две тандемные экспрессионные кассеты с промотором hU6.

В работе [10] показано, что при двойном нокауте sgRNA демонстрируют синергетический эффект, если сайты Cas9 располагаются на расстоянии 40–300 пар нуклеотидов (п. н.) друг от друга. Также было отмечено, что синергетический эффект отсутствует, если расстояние между сайтами Cas9 двух sgRNA составляет менее 35 п. н., при этом эффективность редактирования может быть ниже эффективности редактирования при использовании данных sgRNA по отдельности [10].

В рассматриваемом случае расстояние между сайтами внесения двухцепочечных разрывов при использовании двух sgRNA варьировалось от 36 до 140 п. н. (см. рис. 4), однако авторы не обнаружили зависимости между данным параметром и количественным выходом нокаутированных клеток. Наблюдаемый эффект может быть объяснен стерической конкуренцией двух комплексов CRISPR/Cas9 в случае малого расстояния между сайтами, а также конкуренцией между более эффективной и менее эффективной sgRNA за связывание молекулы белка Cas9.

Заключение

Наибольший выход клеток, негативных по экспрессии белка B2M и T-клеточного рецептора, был получен при использовании одиночных sgRNA B2M3 и B2M8 и sgRNA TRBC2 соответственно.

Эффективность геномного редактирования при использовании одиночных sgRNA выше, чем при одновременном использовании двух sgRNA, участки-мишени которых располагаются в геноме на малом расстоянии друг от друга.

Библиографические ссылки / References

1. Peng R, Lin G, Li J. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS Journal*. 2016;283(7):1218–1231. DOI: 10.1111/febs.13586.
2. Depil S, Duchateau P, Grupp SA, Mufti G, Poirot L. «Off-the-shelf» allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2020;19(3):185–199. DOI: 10.1038/s41573-019-0051-2.
3. Daer RM, Cutts JP, Brafman DA, Haynes KA. The impact of chromatin dynamics on Cas9-mediated genome editing in human cells. *ACS Synthetic Biology*. 2017;6(3):428–438. DOI: 10.1021/acssynbio.5b00299.
4. Concordet J-P, Hacussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research*. 2018;46(W1):W242–W245. DOI: 10.1093/nar/gky354.
5. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*. 2013;8(11):2281–2308. DOI: 10.1038/nprot.2013.143.
6. Alharbi AB, Schmitz U, Bailey CG, Rasko JEJ. CTCF as a regulator of alternative splicing: new tricks for an old player. *Nucleic Acids Research*. 2021;49(14):7825–7838. DOI: 10.1093/nar/gkab520.
7. Mandal PK, Ferreira LMR, Collins R, Meissner TB, Boutwell CL, Friesen M, et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell*. 2014;15(5):643–652. DOI: 10.1016/j.stem.2014.10.004.
8. Yuen G, Khan FJ, Gao S, Stommel JM, Batchelor E, Wu X, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout is insensitive to target copy number but is dependent on guide RNA potency and Cas9/sgRNA threshold expression level. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(20):12039–12053. DOI: 10.1093/nar/gkx843.
9. Ren J, Zhang X, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget*. 2017;8(10):17002–17011. DOI: 10.18632/oncotarget.15218.
10. Joberty G, Fälth-Savitski M, Paulmann M, Bösch M, Doce C, Cheng AT, et al. A tandem guide RNA-based strategy for efficient CRISPR gene editing of cell populations with low heterogeneity of edited alleles. *CRISPR Journal*. 2020;3(2):123–134. DOI: 10.1089/crispr.2019.0064.

Получена 15.04.2022 / исправлена 25.05.2022 / принята 27.05.2022.
Received 15.04.2022 / revised 25.05.2022 / accepted 27.05.2022.

РАЗРАБОТКА МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ ПАНЕЛИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ЛОСЯ (*ALCES ALCES*) В СУДЕБНО-ЭКСПЕРТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Д. Э. НЕДЗВЕЦКАЯ¹⁾, С. А. КОТОВА¹⁾, Т. В. ЗАБАВСКАЯ¹⁾,
В. И. РЫБАКОВА¹⁾, А. Е. ГРЕБЕНЧУК¹⁾, И. С. ЦЫБОВСКИЙ²⁾

¹⁾Научно-практический центр Государственного комитета
судебных экспертиз Республики Беларусь, ул. Филлимонова, 25, 220114, г. Минск, Беларусь

²⁾БелЮрОбеспечение, пр. Дзержинского, 1б, 220069, г. Минск, Беларусь

Для судебно-экспертного исследования биологических следов с мест незаконной охоты на лося разработана панель из 15 микросателлитных (4 тетра- и 11 динуклеотидных) локусов и 1 гендерного локуса (амелогенин), реализованная в виде 2 мультиплексных тест-систем. Совокупная сила дискриминирующего потенциала микросателлитной панели на основе общей базы генотипов лося составляет более 99,999 999 999 999 %. Впервые на территории Европы генетические и криминалистические показатели панели локусов оценены на популяционной выборке лосей в масштабе страны (383 образца), а судебно-экспертная методика ДНК-идентификации биологических образцов лося (*Alces alces*) внедрена в национальную правовую систему.

Ключевые слова: микросателлиты; полиморфизм; экспертная идентификация; лось.

Образец цитирования:

Недзвецкая ДЭ, Котова СА, Забавская ТВ, Рыбакова ВИ, Гребенчук АЕ, Цыбовский ИС. Разработка микросателлитной панели для идентификации биологических образцов лося (*Alces alces*) в судебно-экспертных исследованиях. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;2:27–36. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-27-36>

For citation:

Nedzvedskaya DE, Kotava SA, Zabauskaya TV, Rybakova VI, Hrebianchuk AY, Tsybovsky IS. Development of a microsatellite panel for identification of biological samples of moose (*Alces alces*) in forensic research. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;2:27–36. Russian. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-27-36>

Авторы:

Диана Эдуардовна Недзвецкая – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярно-биологических исследований.

Светлана Александровна Котова – кандидат химических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории технических и криминалистических исследований научного отдела технических, криминалистических и специальных исследований.

Татьяна Викторовна Забавская – старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярно-биологических исследований.

Вероника Игоревна Рыбакова – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярно-биологических исследований.

Александра Евгеньевна Гребенчук – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярно-биологических исследований.

Иосиф Станиславович Цыбовский – ведущий специалист сектора учебно-методической работы управления кадровой и учебно-методической работы.

Authors:

Diana E. Nedzvedskaya, researcher at the laboratory of molecular biology research.

nedzvedskayadiana@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7953-3381>

Sviatlana A. Kotava, PhD (chemistry); leading researcher at the laboratory of technical and criminalistic research, scientific department of technical, criminalistic and special research.

sveitkotova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6521-7732>

Tatsiana V. Zabauskaya, senior researcher at the laboratory of molecular biology research.

zabava_1@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0716-4035>

Veronika I. Rybakova, researcher at the laboratory of molecular biology research.

fishveronika@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-6709-2331>

Aliaksandra Ya. Hrebianchuk, researcher at the laboratory of molecular biology research.

iamsanya94@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1224-3275>

Iosif S. Tsybovsky, leading specialist at the sector of educational and methodical work, division of human resources and educational and methodical work.

tsybovsky@yahoo.com
<https://orcid.org/0000-0002-8611-8215>

DEVELOPMENT OF A MICROSATELLITE PANEL FOR IDENTIFICATION OF BIOLOGICAL SAMPLES OF MOOSE (*ALCES ALCES*) IN FORENSIC RESEARCH

D. E. NEDZVEDSKAYA^a, S. A. KOTAVA^a, T. V. ZABAUSKAYA^a,
V. I. RYBAKOVA^a, A. Ya. HREBIANCHUK^a, I. S. TSYBOVSKY^b

^aScientific and Practical Center of the State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, 25 Filimonava Street, Minsk 220114, Belarus

^bBelJurZabespjachjenne, 2b Dzierżyńska Avenue, Minsk 220069, Belarus

Corresponding author: D. E. Nedzvedskaya (nedzvedskayadiana@gmail.com)

For forensic analysis of evidence from illegal hunting sites of moose, a panel of 15 microsatellite (4 tetranucleotide and 11 dinucleotide) loci and 1 sex locus (amelogenin) was proposed. The cumulative power of discrimination of individual based on the common genetic database of moose (for a panel of 15 microsatellite loci) is more than 99.999 999 999 999 %. The genetic and forensic indicators of a microsatellite panel were evaluated on a population sample of moose on a national scale (383 samples) for the first time in Europe and forensic methodology of the DNA identification of the moose (*Alces alces*) introduced into the national legal system.

Keywords: microsatellites; polymorphism; forensic identification; moose.

Введение

Микросателлитные (STR) маркеры широко распространены в геноме большинства эукариот, что делает их эффективным инструментом для оценки генетического разнообразия [1]. За последние два десятилетия наблюдается стремительное расширение опыта использования STR-маркеров в изучении генетических характеристик животных с минимальными априорными знаниями о последовательности генома организма или без них. Поскольку у генетически родственных групп животных фланкирующие области микросателлитов высококонсервативны [2], разработанные для целевого вида локусы могут быть использованы в исследованиях близкородственных таксонов или популяций. Адресная перекрестная амплификация (*cross-species amplification*) позволяет применять ранее открытые микросателлиты в исследованиях новых видов, благодаря чему отпадает необходимость в поиске дополнительных локусов. Эти факторы делают микросателлиты экономически эффективным инструментом для изучения демографических процессов и генетической динамики, а также мониторинга состояния популяций немодельных видов [3].

В настоящее время микросателлитные локусы составляют основу методического инструментария криминалистических лабораторий при идентификации биологических следов человека. Прогресс в изучении геномов животных и накопленный опыт применения микросателлитов в криминалистике делают генотипирование микросателлитных локусов одним из наиболее распространенных методов, используемых в судебной генетике для отнесения образцов животных к конкретной особи [4]. Нарботанная научная база позволяет использовать перекрестную амплификацию как подход при разработке методов расследования правонарушений в отношении объектов живой природы, наиболее распространенным из которых является незаконная охота (браконьерство).

В статье приведены результаты НИР «Изучение STR-полиморфизма лося, косули, оленя с целью разработки криминалистической методики ДНК-идентификации биологических следов отдельных особей при расследовании дел о незаконной охоте» (2017–2018) касательно распространенного в Беларуси нормируемого охотничьего вида – лося (*Alces alces*). Целью исследования была разработка технологий генотипирования охотничьих видов диких животных на основе традиционной мультиплексной ПЦР с последующей идентификацией аллелей методом капиллярного электрофореза для оценки уровня надежности полученных доказательств идентичности исследованных объектов.

Материалы и методы исследования

Коллекция ДНК была представлена образцами 383 лосей, добытых на законных основаниях во всех административных регионах Беларуси (в Брестской области было добыто 27 лосей (7,1 % от общей выборки), в Витебской области – 213 (55,6 %), в Гомельской области – 30 (7,8 %), в Гродненской области – 48 (12,5 %), в Минской области – 40 (10,5 %), в Могилёвской области – 25 (6,5 %)). Полученную выборку можно считать репрезентативной, так как в Беларуси наибольшая плотность вида приходится на северную и северо-восточную часть страны.

Эффективность отобранных STR-маркеров протестирована на образцах ДНК лося в монолокусной и мультиплексной ПЦР, что позволило разработать для генотипирования лося 2 тест-системы, содержащие в общей сложности 16 маркеров (15 микросателлитных локусов и 1 локус (амелогенин) в качестве гендерного маркера) (табл. 1). Амплификацию микросателлитов проводили в термоциклере iCyler (*Bio-Rad*, США) в конечном объеме 10 мкл, содержащем буфер К (100 ммоль/л трис-НСl, 500 ммоль/л КСl, 0,8 % Nonidet P40 (рН 8,8)), смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) (0,2 ммоль/л каждого), 1,5 ммоль/л MgCl₂, 0,75 единицы активности Taq-полимеразы, ДНК в концентрации 1–2 нг/мкл.

Таблица 1

Маркеры, использованные для генотипирования лося

Table 1

Markers which used for genotyping of moose

Локус	Тандемный повтор	Последовательность праймеров	Код в <i>GenBank</i>	Метка	Источник
MaF46	(GT) _n	F: AAATACCCTATAAGGCACAGTACCAC R: CACCATGGCCACCTGGAATCAGG	M77376	6-FAM	[5]
RT5	(GT) _n	F: CAGCATAATTCTGACAAGTG R: AATCCATGAACAGAGGAG	U90738	6-FAM	[6]
T530	(TAGA) _n	F: GTCCTCACAGCAGCTCTATG R: GCATTCTTTAGAACTCCAAGT	AF442817	6-FAM	[7]
RBP3	(CA) _n	F: TGTATGATCACCTTCTATGCTTC R: GCTTTAGGTAATCATCAGATAGC	–	R6G	[8]
BM888	(CA) _n	F: AGGCCATATAGGAGGCAAGCTT R: CTCGGTGAGCTCAAAACGAG	G18484	R6G	[5]
BM1818	(CA) _n	F: AGTGCTTTCAAGGTCCATGC R: AGCTGGGAATATAACCAAAGG	G18391	R6G	[5]
T193	(TAGA) _n	F: AGTCCAAGCCTGCTAAATAA R: CTGCTGTTGTCATCATTACC	AF192398	TMR	[7]
BM6438	(CA) _n	F: TTGAGCACAGACACAGACTGG R: ACTGAATGCCTCCTTTGTGC	G18435	TMR	[5]
BL4	(CA) _n	F: AAATTTTTTCATCCTTCTTTCTGAC R: TCACCCTGACTGTGAATGC	–	ROX	[5]
T268	(TAGA) _n	F: ATTCCCTTCTCCAGTGTATG R: ATGATAACAGCTCAACAGATC	AF192399	6-FAM	[7]
BM848	(CA) _n	F: TGGTTGGAAGGAAAACCTGG R: CCTCTGCTCCTCAAGACAC	G18477	6-FAM	[5]
BM1258	(CA) _n	F: GTATGTATTTTTCCCACCCTGC R: GAGTCAGACATGACTGAGCCTG	G18385	R6G	[5]
RT30	(GT) _n	F: CACTTGGCTTTTGGACTTA R: CTGGTGTATGTATGCACACT	U90749	R6G	[6]
T26	(TAGA) _n	F: GTTCCAATAGACACGCTCAT R: TGCCATAGTTTTTCCTACCTT	AF442814	R6G	[7]
BM757	(CA) _n	F: TGGAAACAATGTAAACCTGGG R: TTGAGCCACCAAGGAACC	G18473	TMR	[5]
BM1225	(CA) _n	F: TTTCTCAACAGAGGTGTCCAC R: ACCCSTATCACCATGCTCTG	G18419	TMR	[5]
BM203	(CA) _n	F: GGGTGTGACATTTTGTTCCT R: CTGCTCGCCACTAGTCCTTC	G18500	ROX	[5]
T172	(TAGA) _n	F: AGCATCTCCCTTTCAACA R: CTCCCAACCCAAGTATCG	AF192397	6-FAM	[7]
Амелогенин	–	F: AGTTCCTGGCCAACACTC R: GCTGGCCAAGCTTCCAGA	FJ946989/ FJ946990	ROX	[9]

Программа амплификации микросателлитных локусов включала первичную денатурацию (3 мин при 95 °C), 30 циклов амплификации (45 с при 95 °C, 45 с при 60 °C, 90 с при 68 °C) и конечную элонгацию (30 мин при 72 °C). Для разделения продуктов ПЦР применяли анализатор 3500 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, США). Аллели тестируемых локусов идентифицированы по молекулярному размеру в парах нуклеотидов (п. н.) с использованием программного обеспечения *GeneMapper ID-X* (версия 1.4) путем сравнения с внутренним размерным стандартом *GeneScan – 600 LIZ* (версия 2.0).

Оценку аллельного богатства (*Ar*), наблюдаемой (*Ho*) и ожидаемой (*He*) гетерозиготности, значений уровня достоверности (*p*), а также соответствия равновесию Харди – Вайнберга (HWE) проводили с помощью программных пакетов *GenAlEx* (версия 6.5) [10], *FSTAT* (версия 2.9.4) [11], *Genepop* (версия 4.7.0) [12]. Неравновесие по сцеплению (LD) между ДНК-маркерами оценивали с использованием теста отношения правдоподобия на основе программы *Arlequin* (версия 3.5.1.3) [13]. Выявление артефактов ПЦР, выпадения аллелей, нуль-аллелей и других возможных ошибок амплификации осуществляли в программе *Micro-Checker* (версия 2.2.1) [14].

Криминалистические параметры микросателлитных локусов, такие как показатель информативной ценности локуса (PIC), вероятность различения генотипов двух неродственных индивидуумов (PD), совокупная сила дискриминирующего потенциала (CPD), были рассчитаны с помощью программных продуктов *GenAlEx* (версия 6.5) [10], *Gimlet* (версия 1.3.3) [15], *Cervus* (версия 3.0.7) [16].

Результаты и их обсуждение

Тест-системы для идентификации биологических образцов лося были разработаны на основе адресного переноса микросателлитных маркеров, описанных для северного оленя (*Rangifer tarandus*), вапити (*Cervus elaphus* spp.), овцы (*Ovis aries*) и крупного рогатого скота (*Bos taurus*).

На основе анализа литературных данных и предварительных экспериментальных исследований отобранные локусы были сгруппированы в 2 мультиплексные тест-системы:

- Plex_1 – локусы MaF46, RT5, T530, RBP3, BM888, BM1818, T193, BM6438, BL4, амелогенин;
- Plex_2 – локусы T172, T268, BM848, BM1258, RT30, T26, BM757, BM1225, BM203.

При формировании мультиплексных тест-систем учитывались диапазон молекулярных размеров аллелей локусов, отсутствие взаимодействия праймеров в смеси между собой, близкие значения температуры плавления продуктов ПЦР. При этом тип флуоресцентной метки праймеров подбирался таким образом, чтобы образующиеся в результате ПЦР продукты амплификации отдельных локусов не перекрывались по молекулярным размерам в пределах детекции каждой из четырех флуоресцентных меток.

После проведенного контрольного генотипирования образцов из тест-системы Plex_1 был исключен локус RT5 по причине выявления неспецифичных фрагментов ПЦР, а из тест-системы Plex_2 – локус BM1225 в силу нестабильной амплификации продуктов ПЦР.

Анализ ассоциации аллелей локусов выявил неравновесное сцепление ($p < 0,05$) между 13 парами тестируемых STR-маркеров у лося. Однако только по 1 паре маркеров (локусы T268 и T530) величина LD оставалась статистически значимой после применения поправки Бонферрони ($p < 0,00001$) (табл. 2). Для дальнейшего анализа был выбран локус T530, который имел немного более высокую способность дискриминации лосей, чем локус T268 (0,884 и 0,880 соответственно). С учетом вышеизложенного панель локусов, разработанная для генотипирования образцов лося, имеет следующий вид:

- Plex_1 – локусы MaF46, T530, RBP3, BM888, BM1818, T193, BM6438, BL4, амелогенин (9 локусов);
- Plex_2 – локусы T172, BM848, BM1258, RT30, T26, BM757, BM203 (7 локусов).

Электрофореграммы продуктов ПЦР для мультиплексных тест-систем Plex_1 и Plex_2 приведены на рис. 1 и 2 соответственно.

В ходе проведенного анализа генотипов полной выборки лосей суммарно было идентифицировано 132 аллели. Наиболее полиморфными оказались локусы BL4 (15 аллелей), BM757 (12), BM203 (11), T26 (11). У остальных локусов количество аллелей варьировалось в пределах 7–9 на локус (см. табл. 2), и лишь у локуса T172 была выявлена 1 аллель.

Локус T172, который описан как полиморфный у подвидов оленя *C. elaphus canadensis*, *C. elaphus elaphus* [17; 18], у всех исследованных животных вида *A. alces* амплифицируется одинаковым фрагментом размером 144 п. н. Однако мономорфный у лося локус T172 сохраняет полиморфный статус у близкородственных видов оленя и косули. Это позволяет в предложенной панели локусов, оптимизированной для генотипирования образцов лося, использовать локус T172 в качестве внутреннего контроля. При анализе биологических следов с мест незаконной охоты велика вероятность обнаружения смешанных генетических профилей, происходящих от разных видов оленевых. Выявление мономорфного фрагмента размером 144 п. н. является дополнительным подтверждением происхождения образца от животного целевого вида (лось). И наоборот, выявление дополнительных аллелей в этом локусе будет указывать на наличие в следах примеси других оленевых (олень и косули).

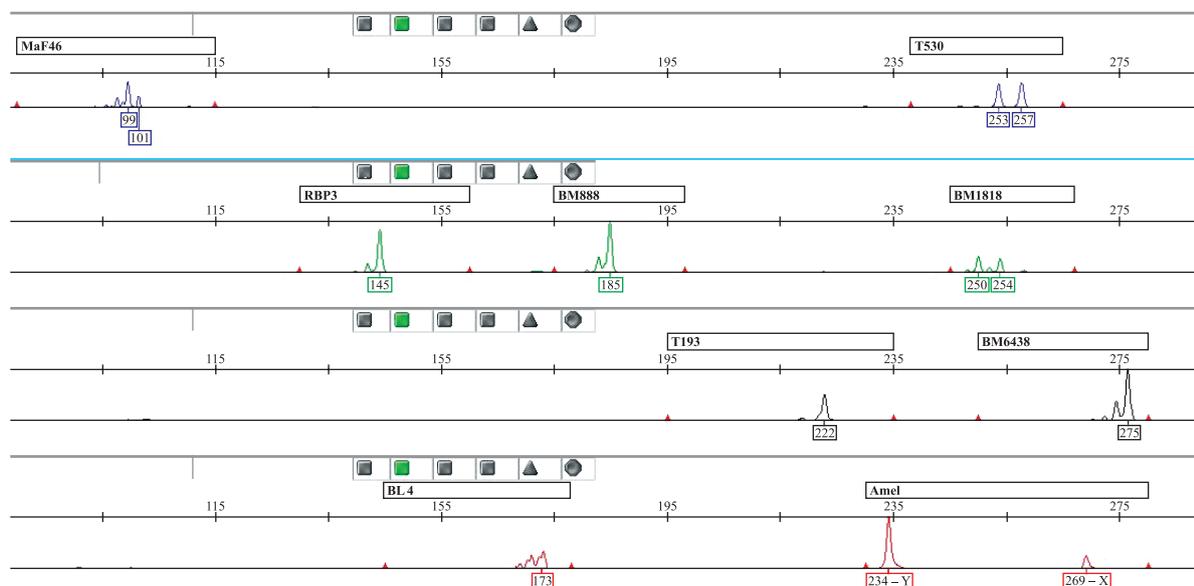


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР для мультилокусной системы Plex_1 у лося
Fig. 1. Electrophoregram of multilocus system Plex_1 for PCR products of DNA of moose

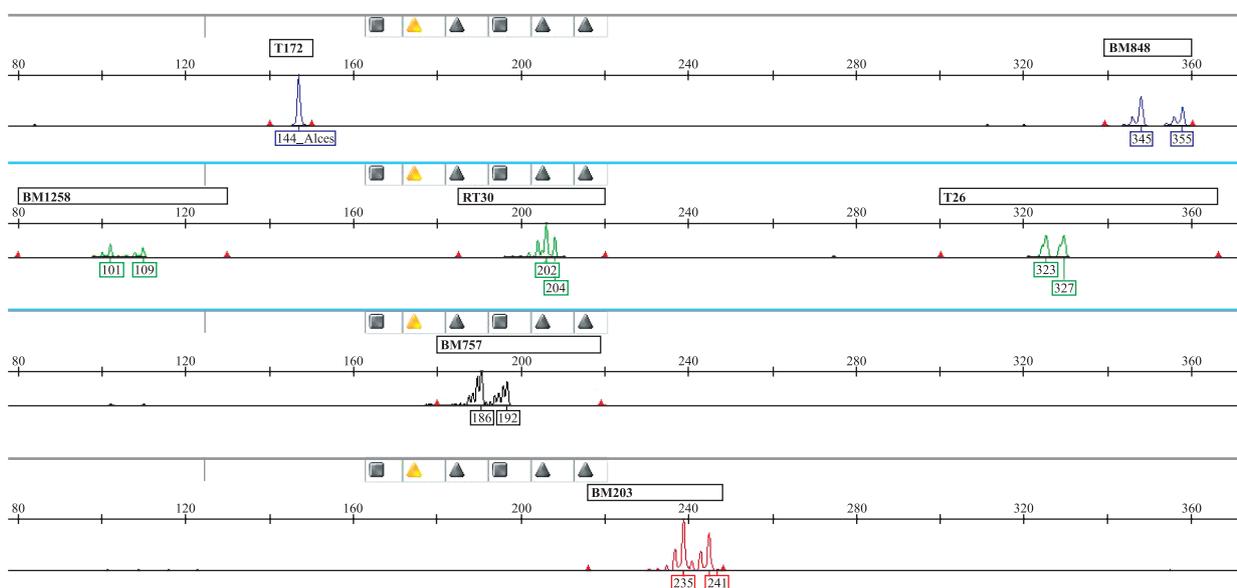


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР для мультилокусной системы Plex_2 у лося
Fig. 2. Electrophoregram of multilocus system Plex_2 for PCR products of DNA of moose

Анализ с использованием программы *Micro-Checker* показал отсутствие нуль-аллелей у исследованных локусов, о чем свидетельствуют полученные значения частот встречаемости, приведенные в табл. 2.

В популяциях лося из Беларуси всего для 2 локусов было выявлено отклонение от равновесия Харди – Вайнберга ($p < 0,05$), однако после применения поправки Бонферрони ($p < 0,0036$) все отклонения от равновесия Харди – Вайнберга становились статистически незначимыми (см. табл. 2). Для дальнейших расчетов использовались все отобранные локусы.

Средняя ожидаемая гетерозиготность микросателлитных локусов, входящих в тест-систему, составила 0,734, а средняя наблюдаемая гетерозиготность – 0,727.

При оценке криминалистической применимости локусов для идентификационных целей были получены показатели, представленные в табл. 3.

Таблица 2

**Параметры полиморфизма локусов
 тест-системы для идентификации особей лося**

Table 2

**Parameters of polymorphism of loci
 from test systems for moose identification**

Локус	<i>A_r</i>	LD	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>p</i>	NAF
MaF46	9	ns	0,741	0,750	0,132	0,006 2
T530	7	T268 (<i>p</i> = 0,000 00)	0,736	0,735	0,474	0,000 5
RBP3	8	ns	0,625	0,609	0,081	–0,011 4
BM888	7	ns	0,554	0,555	0,222	0,004 1
BM1818	8	ns	0,777	0,791	0,007	0,008 6
T193	10	ns	0,770	0,765	0,162	–0,003 3
BM6438	8	ns	0,680	0,715	0,303	0,026 1
BL4	15	ns	0,799	0,821	0,047	0,012 7
BM848	8	ns	0,688	0,659	0,091	–0,028 1
BM1258	8	ns	0,714	0,732	0,120	0,011 9
RT30	9	ns	0,731	0,722	0,295	–0,010 6
T26	11	ns	0,780	0,804	0,069	0,016 5
BM757	12	ns	0,768	0,781	0,097	0,006 4
BM203	11	ns	0,814	0,840	0,351	0,015 8

Примечание. NAF (*null allele frequency*) – частота встречаемости нуль-аллелей; ns (*none significant*) – статистически незначимое отклонение.

Таблица 3

**Криминалистические параметры локусов
 тест-системы для идентификации особей лося**

Table 3

**Criminalistic parameters of loci
 from test systems for moose identification**

Локус	PIС	PD	CPD*, %
MaF46	0,710	0,897	91,73
T530	0,689	0,884	98,606
RBP3	0,530	0,768	99,857 7
BM888	0,506	0,753	99,976 00
BM1818	0,758	0,924	99,997 549
T193	0,728	0,908	99,999 749 6
BM6438	0,684	0,888	99,999 967 63
BL4	0,797	0,944	99,999 997 791
T172	Мономорфный		99,999 997 791 2
BM848	0,630	0,855	99,999 999 774 39
BM1258	0,685	0,881	99,999 999 976 956
RT30	0,691	0,892	99,999 999 998 427 7
T26	0,778	0,935	99,999 999 999 892 70
BM757	0,749	0,920	99,999 999 999 994 800
BM203	0,822	0,956	99,999 999 999 999 700 0

*Расчет нарастающим итогом.

Анализ полученных результатов показывает, что минимальные значения PIC были выявлены у локусов BM888 (0,506) и RBP3 (0,530), максимальные – у локуса BM203 (0,822), среднее значение PIC составило 0,697. Согласно работе [19] в зависимости от значения PIC локусы для целей криминалистического анализа подразделяются на три группы: высокоинформативные (PIC более 0,50), достаточно информативные (PIC от 0,25 до 0,50) и неинформативные (PIC менее 0,25).

Значения PD у всех локусов были на достаточно высоком уровне: минимальное значение выявлено у локуса BM888 (0,753), максимальное – у локуса BM203 (0,956), а среднее значение составило 0,886. Параметр PD отражает вероятность того, что два случайно выбранных индивидуума будут иметь различные генотипы. Соответственно, чем выше данное значение, тем более информативным является исследуемый locus. Совокупный дискриминирующий потенциал тест-системы составил 99,999 999 999 999 %.

Установление половой принадлежности у животных вида *A. alces* с использованием праймеров, описанных в работе [9], показало наличие 1 аллели размером 234 п. н. для локуса амелогенина, локализованного на Y-хромосоме, и 1 аллели размером 269 п. н. для локуса амелогенина, расположенного на X-хромосоме.

Таким образом, локусы в предложенной панели, вероятнее всего, не сцеплены друг с другом и имеют низкий уровень ошибок генотипирования, таких как выпадение аллелей, а аллельное распределение всех задействованных локусов соответствует равновесию Харди – Вайнберга. Сводная генетическая статистика позволяет утверждать, что предложенная панель микросателлитных локусов обеспечивает необходимую надежность при генотипировании и может быть использована для получения высокодоказательной информации при судебно-экспертном исследовании биологических следов по фактам незаконной охоты на лося.

Вместе с тем необходимо учитывать, что применение адресного переноса праймеров при формировании описанной панели локусов обуславливает значительный уровень кросс-реактивности в отношении ДНК-матриц других видов оленевых и полорогих. По этой причине генотипирование с использованием разработанной панели локусов рекомендуется проводить для образцов, видовое происхождение которых от особей вида *A. alces* уже известно или доказано.

Эпизоотия африканской чумы свиней 2012–2013 гг. обусловила резкое сокращение популяции дикого кабана, вследствие чего именно лось занял первое место среди предпочитаемых трофеев браконьеров. В 2019 г. в Научно-практическом центре Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь было проведено 179 экспертных исследований по фактам браконьерства на оленевых, 106 из которых относились к незаконному отстрелу лосей. Успешное судебное преследование браконьерства требует идентификации биологических следов, чтобы связать доказательства, собранные на месте преступления (например, на месте отстрела), с биологическим материалом (рога, мясо, следы крови и т. п.), найденным у потенциального подозреваемого, который мог совершить данное преступление [20]. Вместе с тем в научной литературе описано лишь несколько таких тестов для судебно-экспертного генотипирования оленевых. Более того, хотя оленевые являются очень популярными промысловыми млекопитающими в Европе [21], большинство судебно-экспертных анализов микросателлитных локусов и соответствующие базы данных частот аллелей отработаны для оленевых из Северной Америки. На данный момент судебно-экспертное сообщество опубликовало один тест для STR-типирования лосей, который позже был использован для отнесения особей вида *A. alces* к их исходным популяциям из провинций Новая Шотландия и Нью-Брансуик в Канаде [22], но полезность анализа для тестирования генетической идентичности образцов европейских лосей не оценивалась. В 2021 г. канадскими исследователями [23] для криминалистического генотипирования лосей провинции Альберта и территории Юкон предложена валидированная на 515 образцах панель, включающая 12 микросателлитных динуклеотидных локусов (6 из них (RT5, RT30, BM203, BM848, BM888 и BM1225) задействованы в данном исследовании лосей, обитающих в Беларуси) и половой маркер Sika amelogenin, которые объединены в 2 мультиплекса с различными условиями амплификации. Как и в настоящей работе, ДНК-маркеры достаточно полиморфны, находятся в равновесии по сцеплению и соответствуют равновесию Харди – Вайнберга. Авторами проведен анализ популяционной структуры лосей Альберты и Юкона, однако частоты распределения аллелей локусов не опубликованы, что не позволяет провести сравнительный анализ европейских и канадских лосей.

Компанией «Гордиз» (Россия) в 2021 г. предложена тест-система COrDIS Alces¹ для молекулярно-генетической индивидуализации лосей, включающая 10 микросателлитных локусов (RT1, RT6, RT9, RT24, RT30, BMS745, FSB193, OheQ, C32, T40) и 1 полспецифичный маркер (SRY). Однако никакого информационно-справочного обеспечения данной тест-системы (частоты аллелей, генетические параметры полиморфизма, популяционный анализ и т. п.) в доступном информационном сегменте не имеется.

¹COrDIS Alces [Electronic resource]. URL: <https://gordiz.ru/products/animal-kits/cordis-alces/> (date of access: 10.09.2021).

Заклучение

Настоящее исследование ставило целью разработку системы мультиплексной ПЦР для генотипирования микросателлитных локусов у лося, которая предоставила бы неоспоримые ДНК-доказательства идентичности образцов в судебной экспертизе.

В результате предложена панель из 15 микросателлитных локусов для высокодостоверной идентификации биологических образцов лося в судебной экспертизе доказательств по фактам незаконной охоты. Это первое исследование, предоставляющее возможность тестирования генетической идентичности образцов лося (*A. alces*) на основе STR-маркеров, для которого проведена оценка статистических и генетических параметров выборки лосей в масштабе страны. Результаты генотипирования образцов с использованием представленной панели позволяют достигать уровня чрезвычайно надежных доказательств в судебно-экспертном ДНК-анализе биологических следов с мест незаконной охоты на лося. Сводная генетическая статистика показала, что панель из 15 STR-маркеров демонстрирует уровень полиморфизма от умеренного до высокого (аллельное богатство варьируется от 7 до 15 аллелей на локус, наблюдаемая гетерозиготность – от 0,554 до 0,814, значения PIC – от 0,506 до 0,822). Совокупная сила дискриминирующего потенциала микросателлитной панели составляет более 99,999 999 999 999 %. Создана база данных генотипов лося. На основе проведенных исследований разработана судебно-экспертная методика ДНК-идентификации биологических образцов животных вида *A. alces* [24], которая включена в Реестр судебно-экспертных методик и иных методических материалов Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, что соответствует имплементации разработки в национальную правовую систему.

Библиографические ссылки

1. Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FAM. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. 2006;255(1–4):1–29. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.11.031.
2. Engel SR, Linn RA, Taylor JF. Conservation of microsatellite loci across species of artiodactyls: implications for population studies. *Journal of Mammalogy*. 1996;77(2):504–518. DOI: 10.2307/1382825.
3. Miller WL, Edson J, Pietrandrea P, Miller-Butterworth C, Walter WD. Identification and evaluation of a core microsatellite panel for use in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *BMC Genetics*. 2019;20:49. DOI: 10.1186/s12863-019-0750-z.
4. Linacre AMT, Tobe SS. *Wildlife DNA analysis. Applications in forensic science*. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2013. 352 p. DOI: 10.1002/9781118496411.
5. Bishop MD, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sunden SL, Hawkins GA, et al. A genetic linkage map for cattle. *Genetics*. 1994; 136(2):619–639. DOI: 10.1093/genetics/136.2.619.
6. Wilson GA, Strobeck C, Wu L, Coffin JW. Characterization of microsatellite loci in caribou *Rangifer tarandus*, and their use in other artiodactyls. *Molecular Ecology*. 1997;6:697–699. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1997.00237.x.
7. Meredith EP, Rodzen JA, Levine KF, Banks JD. Characterization of an additional 14 microsatellite loci in California Elk (*Cervus elaphus*) for use in forensic and population applications. *Conservation Genetics*. 2005;6(1):151–153. DOI: 10.1007/s10592-004-7735-8.
8. Cronin MA, Patton JC, Balmysheva N, MacNeil MD. Genetic variation in caribou and reindeer (*Rangifer tarandus*). *Animal Genetics*. 2003;34(1):33–41. DOI: 10.1046/j.1365-2052.2003.00927.x.
9. Gurgul A, Radko A, Slota E. Characteristics of X- and Y-chromosome specific regions of the amelogenin gene and a PCR-based method for sex identification in red deer (*Cervus elaphus*). *Molecular Biology Reports*. 2010;37:2915–2918. DOI: 10.1007/s11033-009-9852-4.
10. Peakall R, Smouse PE. GenAlix 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 2006;6(1):288–295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
11. Goudet J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*. 1995;86(6):485–486. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627.
12. Raymond M, Rousset F. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 1995;86(3):248–249. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573.
13. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 2010;10(3):564–567. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
14. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 2004;4(3):535–538. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
15. Valière N. Gimlet: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*. 2002; 2(3):377–379. DOI: 10.1046/j.1471-8286.2002.00228.x-i2.
16. Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. 1998;7(5):639–655. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x.
17. Jones KC, Levine KF, Banks JD. Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensic applications in California elk (*Cervus elaphus canadensis*). *Molecular Ecology Notes*. 2002;2(4):425–427. DOI: 10.1046/j.1471-8278.2002.00264.x.

18. Socratous E, Graham E, Ruttly GN. Forensic DNA profiling of *Cervus elaphus* species in the United Kingdom. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2009;2(1):281–282. DOI: 10.1016/j.fsigss.2009.08.127.
19. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 1980;32(3):314–331.
20. Цыбовский ИС, Котова СА, Забавская ТВ, Спивак ЕА, Лукашкова ОН. Молекулярно-генетическая идентификация биологических следов диких животных при расследовании дел о незаконной охоте в Республике Беларусь. *Теория и практика судебной экспертизы*. 2018;13(4):116–123. DOI: 10.30764/10.30764/1819-2785-2018-13-4-116-12317.
21. Burbaitė L, Csányi S. Red deer population and harvest changes in Europe. *Acta Zoologica Lituanica*. 2010;20(4):179–188. DOI: 10.2478/v10043-010-0038-z.
22. Ball MC, Finnegan LA, Nette T, Broders HG, Wilson PJ. Wildlife forensics: «supervised» assignment testing can complicate the association of suspect cases to source populations. *Forensic Science International: Genetics*. 2011;5(1):50–56. DOI: 10.1016/j.fsigen.2010.02.002.
23. Sim Z, Monderman L, Hildebrand D, Packer T, Jobin RM. Development and implementation of a STR based forensic typing system for moose (*Alces alces*). *Forensic Science International: Genetics*. 2021;53:102536. DOI: 10.1016/j.fsigen.2021.102536.
24. Котова СА, Цыбовский ИС, Рыбакова ВИ, Недзведка ДЭ, Забавская ТВ, Спивак ЕА и др. *Методика ДНК-идентификации биологических образцов животных вида лось европейский (Alces alces)*. Цыбовский ИС, редактор. Минск: ИВЦ Минфина; 2019. 34 с.

References

1. Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FAM. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. 2006;255(1–4):1–29. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.11.031.
2. Engel SR, Linn RA, Taylor JF. Conservation of microsatellite loci across species of artiodactyls: implications for population studies. *Journal of Mammalogy*. 1996;77(2):504–518. DOI: 10.2307/1382825.
3. Miller WL, Edson J, Pietrandrea P, Miller-Butterworth C, Walter WD. Identification and evaluation of a core microsatellite panel for use in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *BMC Genetics*. 2019;20:49. DOI: 10.1186/s12863-019-0750-z.
4. Linacre AMT, Tobe SS. *Wildlife DNA analysis. Applications in forensic science*. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2013. 352 p. DOI: 10.1002/9781118496411.
5. Bishop MD, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sunden SL, Hawkins GA, et al. A genetic linkage map for cattle. *Genetics*. 1994;136(2):619–639. DOI: 10.1093/genetics/136.2.619.
6. Wilson GA, Strobeck C, Wu L, Coffin JW. Characterization of microsatellite loci in caribou *Rangifer tarandus*, and their use in other artiodactyls. *Molecular Ecology*. 1997;6:697–699. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1997.00237.x.
7. Meredith EP, Rodzen JA, Levine KF, Banks JD. Characterization of an additional 14 microsatellite loci in California Elk (*Cervus elaphus*) for use in forensic and population applications. *Conservation Genetics*. 2005;6(1):151–153. DOI: 10.1007/s10592-004-7735-8.
8. Cronin MA, Patton JC, Balmysheva N, MacNeil MD. Genetic variation in caribou and reindeer (*Rangifer tarandus*). *Animal Genetics*. 2003;34(1):33–41. DOI: 10.1046/j.1365-2052.2003.00927.x.
9. Gurgul A, Radko A, Słota E. Characteristics of X- and Y-chromosome specific regions of the amelogenin gene and a PCR-based method for sex identification in red deer (*Cervus elaphus*). *Molecular Biology Reports*. 2010;37:2915–2918. DOI: 10.1007/s11033-009-9852-4.
10. Peakall R, Smouse PE. GenAEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 2006;6(1):288–295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
11. Goudet J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*. 1995;86(6):485–486. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627.
12. Raymond M, Rousset F. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 1995;86(3):248–249. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573.
13. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 2010;10(3):564–567. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
14. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 2004;4(3):535–538. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
15. Valière N. Gimlet: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*. 2002;2(3):377–379. DOI: 10.1046/j.1471-8286.2002.00228.x-i2.
16. Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. 1998;7(5):639–655. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x.
17. Jones KC, Levine KF, Banks JD. Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensic applications in California elk (*Cervus elaphus canadensis*). *Molecular Ecology Notes*. 2002;2(4):425–427. DOI: 10.1046/j.1471-8278.2002.00264.x.
18. Socratous E, Graham E, Ruttly GN. Forensic DNA profiling of *Cervus elaphus* species in the United Kingdom. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2009;2(1):281–282. DOI: 10.1016/j.fsigss.2009.08.127.
19. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 1980;32(3):314–331.
20. Tsybovsky IS, Kotova SA, Zabavskaya TV, Spivak EA, Lukashkova ON. DNA identification of biological traces in forensic casework for investigation of illegal hunting in Belarus. *Theory and Practice of Forensic Science*. 2018;13(4):116–123. DOI: 10.30764/10.30764/1819-2785-2018-13-4-116-12317.
21. Burbaitė L, Csányi S. Red deer population and harvest changes in Europe. *Acta Zoologica Lituanica*. 2010;20(4):179–188. DOI: 10.2478/v10043-010-0038-z.

22. Ball MC, Finnegan LA, Nette T, Broders HG, Wilson PJ. Wildlife forensics: «supervised» assignment testing can complicate the association of suspect cases to source populations. *Forensic Science International: Genetics*. 2011;5(1):50–56. DOI: 10.1016/j.fsigen.2010.02.002.

23. Sim Z, Monderman L, Hildebrand D, Packer T, Jobin RM. Development and implementation of a STR based forensic typing system for moose (*Alces alces*). *Forensic Science International: Genetics*. 2021;53:102536. DOI: 10.1016/j.fsigen.2021.102536.

24. Kotava SA, Tsybovsky IS, Rybakova VI, Nedzvedskaya DE, Zabauskaya TV, Spivak EA, et al. *Metodika DNK-identifikatsii biologicheskikh obraztsov zhivotnykh vida los' evropeiskii (Alces alces)* [Method of DNA identification of biological samples of animals of the European elk species (*Alces alces*)]. Tsybovskii IS, editor. Minsk: Informatsionno-vychislitel'nyi tsentr Ministerstva finansov Respubliki Belarus'; 2019. 34 p. Russian.

Получена 11.10.2021 / исправлена 24.01.2022 / принята 21.04.2022.
Received 11.10.2021 / revised 24.01.2022 / accepted 21.04.2022.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 577.218+579

НАКОПЛЕНИЕ И АНТИГЕННОСТЬ УКОРОЧЕННОГО БЕЛКА КАПСИДА ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ 2-го ТИПА В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

А. Д. ТИТОВА¹⁾, Ю. М. КУЛЕШОВА¹⁾,
М. И. ПОТАПОВИЧ¹⁾, В. А. ПРОКУЛЕВИЧ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Исследованы особенности накопления укороченного варианта белка капсида цирковируса свиней 2-го типа (белок SOP) в клетках бактерий штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, содержащих ранее сконструированную плазмиду pET-SOP. Ген белка SOP модифицирован путем удаления участка (108 пар нуклеотидов), затрудняющего экспрессию в клетках прокариот, и оптимизации 93 редких для бактерий кодонов. Доля целевого белка в клетках *E. coli* при температуре культивирования 37 °С в течение 2 ч после индукции

Образец цитирования:

Титова АД, Кулешова ЮМ, Потапович МИ, Прокулевич ВА. Накопление и антигенность укороченного белка капсида цирковируса свиней 2-го типа в клетках *Escherichia coli*. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;2:37–47. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-37-47>

For citation:

Titova AD, Kuleshova YM, Potapovich MI, Prokulevich VA. Accumulation and antigenicity of truncated porcine circovirus type 2 capsid protein in *Escherichia coli* cells. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;2:37–47. Russian. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-37-47>

Авторы:

Анастасия Дмитриевна Титова – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета.

Юлия Михайловна Кулешова – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета.

Максим Иосифович Потапович – заведующий научно-исследовательской лабораторией биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета.

Владимир Антонович Прокулевич – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета.

Authors:

Anastasia D. Titova, junior researcher at the laboratory of biotechnology, department of microbiology, faculty of biology. titovaad@gmail.com

Yuliya M. Kuleshova, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of biotechnology, department of microbiology, faculty of biology. yuliakuleshova@yahoo.co.uk

Maxim I. Potapovich, head of the laboratory of biotechnology, department of microbiology, faculty of biology. potapovich@bsu.by

Vladimir A. Prokulevich, doctor of science (biology), full professor; head of the department of microbiology, faculty of biology. prokulevich@mail.ru



достигает 24 % от общего клеточного белка, что позволяет отнести указанный штамм к эффективным производственным продуцентам целевого белка. В ходе культивирования продуцента при 37 °С сразу после индукции целевой белок находится в клетках в растворимом виде, но через 1 ч после добавления индуктора обнаруживается преимущественно в нерастворимой форме (тельца включения). При понижении температуры культивирования до 18–30 °С формирование телец включения замедляется, однако доля рекомбинантного белка в клетках продуцента уменьшается до 15–6 % соответственно, что в значительной степени снижает рентабельность технологического процесса. Также установлено, что модифицированный рекомбинантный белок SOP, получаемый из бактериальных клеток штамма-продуцента, сохраняет свою антигенную активность, это подтверждается специфическим иммуноферментным анализом. Полученные данные позволяют считать исследуемый белок перспективным для разработки вакцины против цирковируса свиней.

Ключевые слова: цирковирус свиней 2-го типа; белок капсида; экспрессия гена; индукция; температура культивирования; растворимая фракция; нерастворимая фракция; иммуноферментный анализ; тельца включения.

ACCUMULATION AND ANTIGENICITY OF TRUNCATED PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 CAPSID PROTEIN IN *ESCHERICHIA COLI* CELLS

A. D. TITOVA^a, Y. M. KULESHOVA^a,
M. I. POTAPOVICH^a, V. A. PROKULEVICH^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: A. D. Titova (titovaad@gmail.com)

This work examines accumulation of shortened version of porcine circovirus type 2 capsid protein (SOP protein) in the cells of bacterial strain *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL with plasmid pET-SOP, obtained in previous work. The gene for SOP protein was modified by deletion of the part (108 base pair) interfering expression in procaryotes, as well as optimisation of 93 rare codons. Under cultivation temperature 37 °C for 2 h after induction the proportion of target protein reaches of 24 % of the total cellular protein, which makes it possible to classify this strain as an effective industrial producer of target protein. During the cultivation of the producer at 37 °C, the target protein is in the cells in the native soluble form right after induction, but 1 h after the addition of the inducer, it is found mostly in insoluble multimeric form (inclusion bodies). When the cultivation temperature is lowered to 18–30 °C, the formation of inclusion bodies slows down, however the proportion of recombinant protein in the cells of the producer decreases to 15–6 % respectively, which significantly reduces the profitability of the technological process. It has been established that the modified recombinant SOP protein obtained from bacterial cells of the producer strain retains its antigenic activity, which is confirmed by specific enzyme-linked immunosorbent assay analysis. These data allow us to consider studied protein as a promising candidate for a porcine circovirus type 2 vaccine.

Keywords: porcine circovirus type 2; capsid protein; gene expression; induction; cultivation temperature; soluble fraction; insoluble fraction; enzyme-linked immunosorbent assay; inclusion bodies.

Введение

Цирковирус свиней 2-го типа (ЦВС-2) – это небольшой ДНК-содержащий икосаэдрический безоболочечный вирус, принадлежащий к роду *Circovirus* семейства *Circoviridae* [1; 2]. Данный вирус является возбудителем целого ряда синдромов, клинические проявления которых обозначаются общим термином «цирковиральные болезни свиней» (ЦВБС). К ЦВБС относятся синдром послеотъемного мультисистемного истощения, синдром дерматита и нефропатии свиней, а также связанные с ЦВС пневмония, энтерит и репродуктивная дисфункция [3]. Каждое из указанных заболеваний наносит значительный ущерб свиноводству [4].

Наиболее эффективным средством борьбы с ЦВС-2 являются вакцины [5]. При разработке генно-инженерных субъединичных вакцин против цирковируса в качестве антигена используют единственный белок капсидной оболочки вируса [5–7].

Белок-антиген производят путем культивирования бактериальных штаммов-продуцентов, наследующих соответствующий ген вируса. Для успешного производственного процесса зачастую требуется модификация гена, экспрессируемого в клетках нового хозяина, а также подбор оптимальных условий культивирования штамма-продуцента [8].

В ходе разработки вакцины сконструирована плазмида pET-SOP, на основе которой в бактериях синтезируется белок SOP – оптимизированный вариант белка капсида ЦВС-2 [9]. Ген белка SOP был подвергнут модификациям, которые привели к повышению его экспрессии в клетках прокариот (удален участок ДНК размером 108 пар нуклеотидов, соответствующий 36 N-концевым аминокислотным остаткам белка, и заменены 93 редких для бактерий синонимических кодона).

Цель исследования – изучить влияние условий культивирования на формирование целевого продукта (белка-антигена) в клетках штамма-продуцента, несущего плазмиду pET-SOP.

Задачи исследования: 1) проанализировать динамические характеристики биосинтеза белка SOP на ранних стадиях экспрессии; 2) сравнить уровни накопления белка в растворимой и нерастворимой фракциях при различных условиях культивирования; 3) охарактеризовать антигенные свойства оптимизированного белка капсида ЦВС-2 путем иммуноферментного анализа.

Материалы и методы исследования

В работе использовали плазмиды из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета БГУ:

- pET-TP3 с укороченным геном белка капсида ЦВС-2b [8];
- pET-SOP с укороченным и оптимизированным по 93 кодонам геном белка капсида ЦВС-2b [9].

Бактерии штамма *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (*E. coli* В F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r gal λ(DE3) *endA* Hte [*argU proL* Cam^r] [*argU ileY leuW* Strep/Spec^r]) фирмы *Stratagene* (США), содержащие указанные плазмиды, обозначены *E. coli* pET-TP3 и *E. coli* pET-SOP соответственно. Клетки исходного штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL без плазмид выступали в качестве отрицательного контроля, а клетки штамма *E. coli* pET-TP3 – в качестве положительного контроля.

Культуры клеток выращивали в жидкой питательной среде LB с добавлением антибиотиков (30 мкг/мл канамицина, 30 мкг/мл хлорамфеникола для *E. coli* pET-TP3 и *E. coli* pET-SOP; 30 мкг/мл хлорамфеникола для *E. coli* без рекомбинантной плазмиды). Для индукции экспрессии рекомбинантных генов в клетках штамма *E. coli* pET-SOP ночную культуру клеток, выращенную на качалке при 160 об/мин и 37 °С, разбавляли питательной средой в 20 раз и культивировали 2 ч при 160 об/мин и 37 °С до оптической плотности культуры 0,6–1,0 при длине волны 600 нм, затем добавляли изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1 ммоль/л и продолжали культивирование 2 ч при температуре 18; 25; 30 или 37 °С. Перед добавлением индуктора и через каждые 30 мин выращивания отбирали пробы культуры клеток для анализа различных фракций белков. Для получения проб клетки *E. coli* центрифугировали 3 мин при 13 000 об/мин. Выделение белков из клеток *E. coli* осуществляли с помощью B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, США) в соответствии с инструкцией производителя. Данный реагент позволяет разрушать клетки и выделять растворимые белки, но не растворяет тельца включения и не нарушает структуру белков [10].

Уровень накопления белков анализировали путем электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ-электрофореза) по Лэммли согласно общепринятому протоколу [11]. Для получения проб к образцам клеток, а также к растворимой и нерастворимой фракциям белка добавляли загрузочный буфер для электрофореза, затем кипятили их в течение 5 мин. Объем проб для ПААГ-электрофореза различных фракций рассчитывался таким образом, чтобы в каждой пробе был представлен белок, выделенный из одинакового количества клеток. В качестве маркеров молекулярной массы использовали Protein Marker VI (10–245) Prestained (*ITW Reagents*, Испания) и PageRuler™ Prestained Protein Ladder (*Thermo Fisher Scientific Inc.*). Денситометрический анализ изображений окрашенных полиакриламидных гелей проводили с помощью программного пакета *ImageJ* (версия 1.46r) [12]. Долю целевого белка в клетке оценивали путем сравнения интенсивности окрашивания полосы белка SOP с интенсивностью окрашивания полос остальных белков на дорожке. Чтобы оценить соотношение растворимой и нерастворимой фракций целевого белка, сравнивали интенсивность окрашивания полос растворимого и нерастворимого белка SOP, выделенного из одинакового количества клеток.

Антигенные свойства целевого белка в разделенных фракциях изучали посредством иммуноферментного анализа [11]. В пробы для иммуноферментного анализа добавляли додецилсульфат натрия до конечной концентрации 0,54 % и инкубировали 10 мин при 37 °С. Концентрацию белка в образцах определяли путем измерения оптической плотности при 280 нм [11] на спектрофотометре DS-11 (*DeNovix Inc.*, США). Все образцы разводили до конечной концентрации 20 мкг/мл фосфатно-солевым буфером (*Melford Biolaboratories Ltd.*, Великобритания). Пробы (каждый образец брали в четырех повторях) иммобилизовали в лунках полистиролового 96-луночного планшета (*Sarstedt*, Германия) путем инкубирования в течение ночи при 4 °С. Для блокирования свободных сайтов связывания белка в лунки вносили по 300 мкл раствора, содержащего 1 % бычьего сывороточного альбумина и 0,05 % Tween 20

(Sigma Life Science, США) в фосфатно-солевом буфере, и выдерживали в течение 1 ч при 37 °С. Затем в лунки добавляли по 50 мкл первичных антител (использовали свиную поликлональную антисыворотку к ЦВС-2 (Accurate Chemical & Scientific Corporation, США), разбавленную до конечной концентрации в соответствии с инструкцией производителя) и выдерживали в течение 1 ч при 37 °С. Затем точно так же проводили инкубацию проб со вторичными козьими антителами к свиному иммуноглобулину G, конъюгированными с пероксидазой хрена (Abcam, Великобритания). Между этапами инкубации лунки планшета 4 раза промывали фосфатно-солевым буфером. После инкубации образцов с антителами в лунки вносили по 50 мкл субстратной смеси, в качестве которой использовался 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (Thermo Fisher Scientific Inc.), и выдерживали при комнатной температуре до максимального проявления окраски (но не более 15 мин). Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 моль/л серной кислоты. Результаты фиксировали путем считывания оптической плотности на планшетном спектрофлуориметре SpectraMax® M2 (Molecular Devices, США) при длине волны 450 нм.

Статистический анализ (в том числе дисперсионный анализ) проводили в программе *SOFA Statistics* (версия 1.5.3). Количественные данные, обобщающие результаты нескольких экспериментов, указаны в следующем виде: среднее значение плюс-минус стандартная ошибка среднего, в скобках дано количество измерений *n*, например (24,06 ± 1,90) % (*n* = 4).

Результаты и их обсуждение

Экспрессия укороченного оптимизированного гена белка капсида ЦВС-2 в бактериальных клетках. В исследовании использовали культуру клеток потенциального штамма-производителя *E. coli* pET-SOP, содержащего сконструированную плазмиду. Клетки исходного штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL без плазмиды выступали в качестве отрицательного контроля, положительным контролем служили клетки штамма *E. coli* pET-TP3, синтезирующие белок TP – укороченный белок капсида ЦВС-2.

В первой серии экспериментов бактерии культивировали при оптимальной для *E. coli* температуре (37 °С). Пробы клеток *E. coli* pET-SOP, а также выделенные из них растворимую и нерастворимую фракции белка подвергали электрофоретическому, а затем и иммуноферментному анализу. Результаты белкового ПААГ-электрофореза представлены на рис. 1.

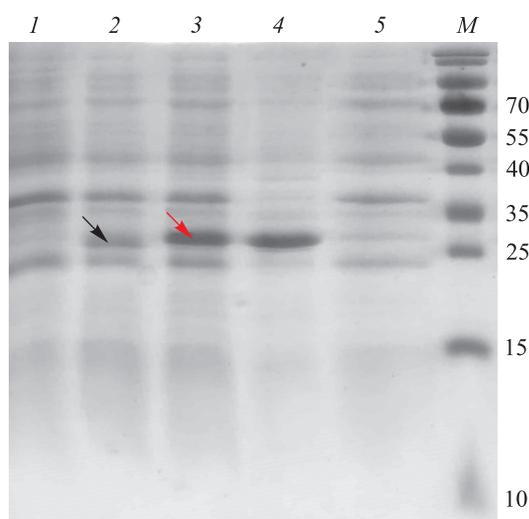


Рис. 1. Оценка распределения целевого белка в растворимой и нерастворимой фракциях бактериального лизата:

- 1 – отрицательный контроль (общий белок из клеток без рекомбинантных плазмид);
- 2 – положительный контроль (общий белок из клеток с плазмидой pET-TP3);
- 3 – общий белок из клеток с плазмидой pET-SOP;
- 4 – нерастворимая фракция белков из клеток с плазмидой pET-SOP;
- 5 – растворимая фракция белков из клеток с плазмидой pET-SOP;

M – маркер молекулярной массы (справа указаны размеры белков (кДа)). Красной и черной стрелками обозначены целевой белок SOP (26,35 кДа) и белок TP (25 кДа) соответственно

Fig. 1. Estimation of target protein distribution in soluble and insoluble fractions of bacterial lysate:

- 1 – negative control (total protein from cells without recombinant plasmids);
- 2 – positive control (total protein from cells with pET-TP3 plasmid);
- 3 – total protein from cells with pET-SOP plasmid; 4 – insoluble fraction of proteins from cells with pET-SOP plasmid; 5 – soluble fraction of proteins from cells with pET-SOP plasmid;

M – molecular weight marker (on the right are shown the protein sizes (kDa)). Red and black arrows indicate the target SOP protein (26.35 kDa) and TP protein (25 kDa) respectively

Выявлено наличие белка SOP ожидаемого размера (около 26 кДа), который накапливается в клетках преимущественно в нерастворимой форме (в виде телец включения). В отрицательном контроле присутствует белок с похожей молекулярной массой в количестве $(2,40 \pm 0,17) \%$ ($n = 3$) от общего клеточного белка, на что сделана поправка при последующей оценке доли целевого белка в клетках. Дальнейшая идентификация рекомбинантного белка в клетках продуцента проведена с применением иммуноферментного анализа.

Проверка антигенных свойств целевого белка с помощью иммуноферментного анализа. Метод иммуноферментного анализа позволяет определить, взаимодействует ли целевой белок с соответствующими антителами, при этом избежав трудностей с переносом целевого белка на мембрану из поливинилиденфторида, которые возникли при попытке проведения вестерн-блоттинга. Для иммуноферментного анализа использовали образцы белка, отобранные в предыдущем эксперименте, – фракции белка из клеток с плазмидой pET-SOP, культивированных при температуре 37 °С, положительный и отрицательный контроль. Пробы доводили до одинаковой концентрации общего белка (каждый образец брали в четырех повторах). В качестве первичных антител в анализе использовали поликлональную антисыворотку к ЦВС-2, а в качестве вторичных – антитела к свиному иммуноглобулину G, конъюгированные с пероксидазой хрена. В конце анализа была измерена оптическая плотность полученных образцов при 450 нм. Обобщенные результаты этих измерений представлены на рис. 2.

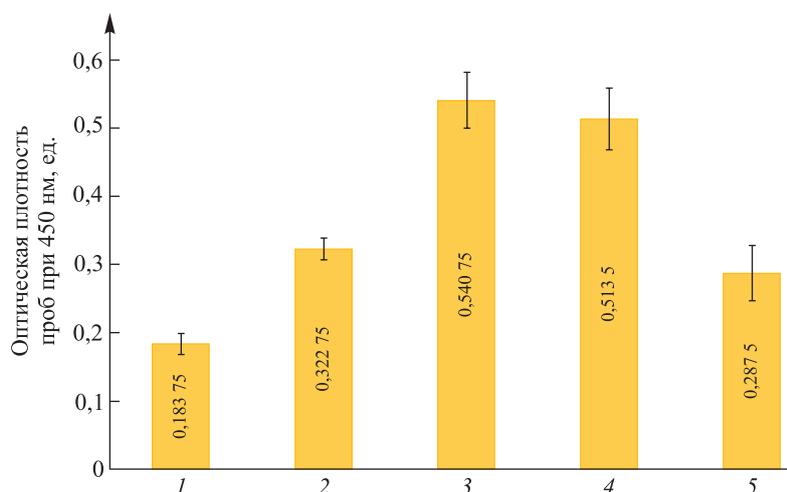


Рис. 2. Результаты иммуноферментного анализа образцов белка из клеток *E. coli* с рекомбинантными плазмидами:

- 1 – отрицательный контроль (общий белок из клеток без рекомбинантных плазмид);
- 2 – положительный контроль (общий белок из клеток с плазмидой pET-TP3);
- 3 – общий белок из клеток с плазмидой pET-SOP;
- 4 – нерастворимая фракция белков из клеток с плазмидой pET-SOP;
- 5 – растворимая фракция белков из клеток с плазмидой pET-SOP.

Высота столбцов соответствует средней оптической плотности образцов при 450 нм, усы показывают стандартную ошибку среднего

Fig. 2. Results of enzyme-linked immunosorbent assay of proteins from *E. coli* cells with recombinant plasmids:

- 1 – negative control (total protein from cells without recombinant plasmids);
- 2 – positive control (total protein from cells with pET-TP3 plasmid);
- 3 – total protein from cells with pET-SOP plasmid;
- 4 – insoluble fraction of proteins from cells with pET-SOP plasmid;
- 5 – soluble fraction of proteins from cells with pET-SOP plasmid.

The height of the columns corresponds to the average optical density at 450 nm, the whiskers shows standard error of the mean

Как видно из рис. 2, оптическая плотность образцов с белком SOP заметно превышает оптическую плотность отрицательного контроля. Согласно проведенному дисперсионному анализу эта разница в оптической плотности является статистически значимой ($p < 0,001$ ($7,454E-6$)). Данные иммуноферментного анализа показывают, что в клетках продуцента, содержащих плазмиду pET-SOP, присутствует целевой модифицированный белок, который сохраняет свои эпитопные антигенные свойства. При этом оптическая плотность проб с нерастворимой фракцией значительно превышает оптическую плотность проб с растворимой фракцией, что указывает на преимущественное накопление целевого белка в нерастворимом состоянии, это согласуется с результатами ПААГ-электрофореза.

Динамика накопления целевого белка в нерастворимой и растворимой формах. Проводилась индукция экспрессии гена при 37 °С. Пробы отбирали непосредственно перед добавлением индуктора и через каждые 30 мин после его добавления. Полученные образцы общего клеточного белка, а также растворимой и нерастворимой фракций проанализировали посредством ПААГ-электрофореза (рис. 3).

С помощью денситометрического анализа определяли процентное содержание белка SOP по отношению к общему бактериальному белку, а также соотношение нерастворимой и растворимой фракций целевого белка. Чтобы избежать завышения доли целевого белка в клетке, в этом и последующих экспериментах расчет производился с вычетом 2,4 % белка с молекулярной массой около 26 кДа, имевшегося в отрицательном контроле. Результаты анализа представлены на рис. 4. Согласно полученным данным первоначально белок SOP находится в клетках в растворимом состоянии. Однако примерно через 1 ч после добавления ИПТГ, когда содержание целевого белка достигает $(16,78 \pm 3,16) \%$ ($n = 4$) от общего клеточного белка, доля растворимой фракции снижается и целевой белок накапливается преимущественно в нерастворимой форме. При этом доля целевого белка через 2 ч после индукции достигает $(24,06 \pm 1,90) \%$ ($n = 4$) от общего клеточного белка.

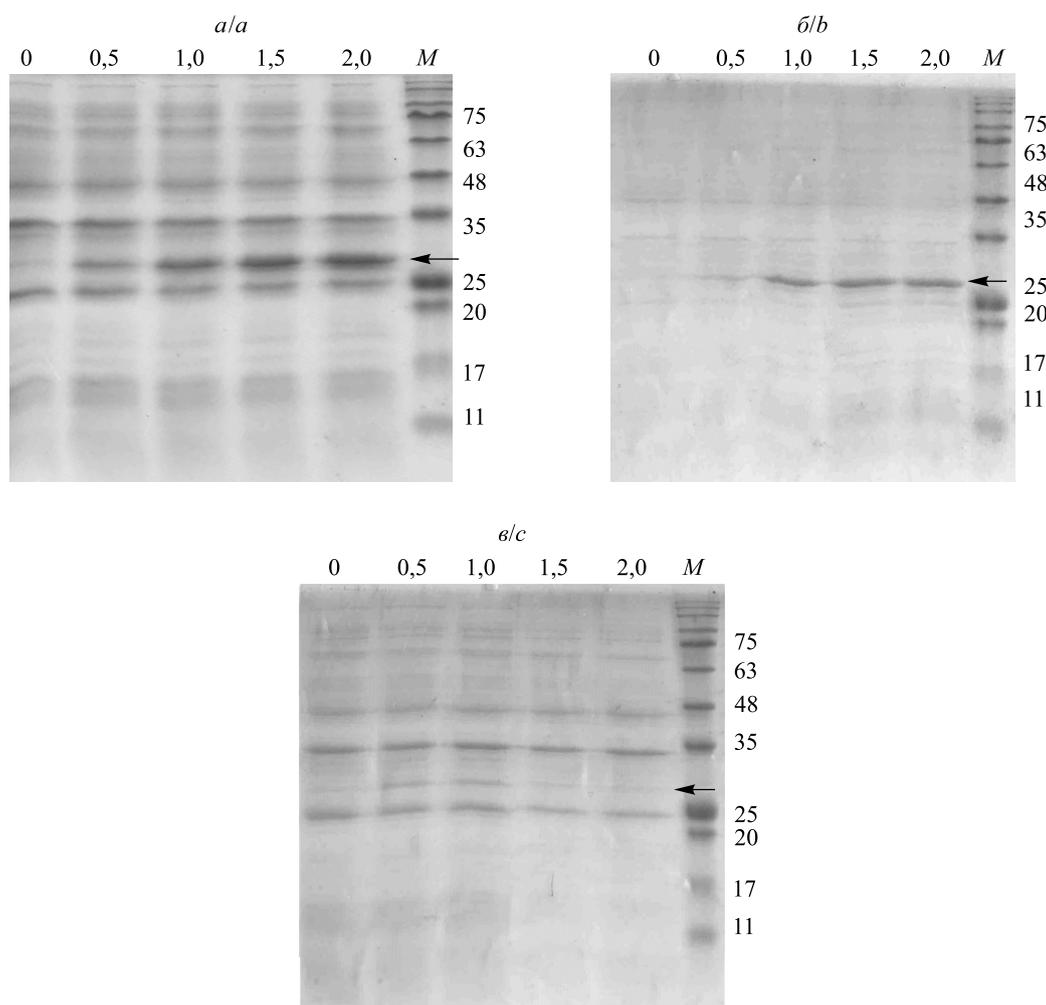


Рис. 3. Динамика накопления целевого белка в клетках *E. coli* при температуре культивирования 37 °С: *a* – общий клеточный белок; *b* – нерастворимая белковая фракция; *e* – растворимая белковая фракция. На всех электрофореграммах сверху указано время отбора проб с момента добавления индуктора (0; 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 ч); *M* – маркер молекулярного веса (справа указаны размеры белков (кДа)). Стрелкой обозначено расположение целевого белка SOP (26,35 кДа)

Fig. 3. Target protein accumulation dynamic in *E. coli* cells at cultivation temperature 37 °С: *a* – total cellular protein; *b* – insoluble protein fraction; *c* – soluble protein fraction. All figures above indicate the sampling time from the moment the inducer was added (0; 0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 h); *M* – molecular weight marker (on the right are shown the protein sizes (kDa)). The arrow shows the target SOP protein placement (26.35 kDa)

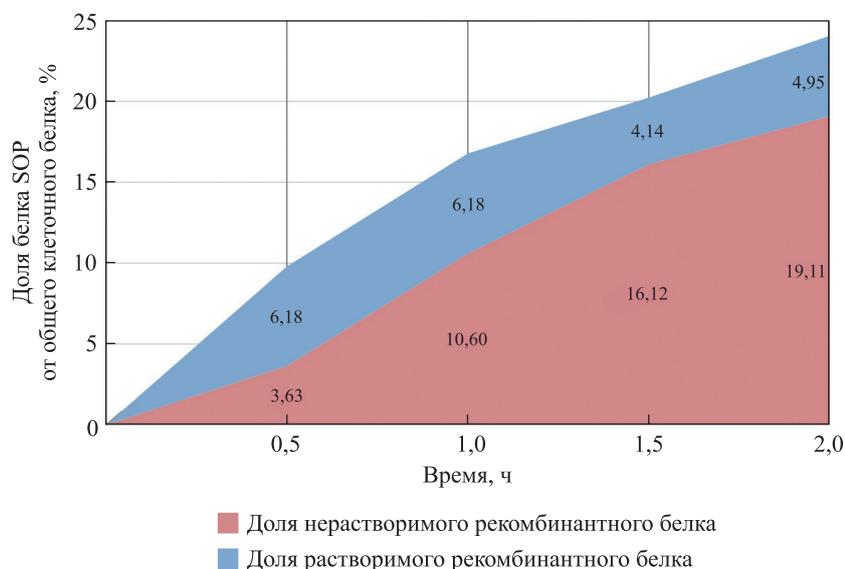


Рис. 4. Динамика накопления растворимой и нерастворимой форм целевого белка в клетках в процессе культивирования продуцента при 37 °С

Fig. 4. Dynamics of soluble and insoluble target protein accumulation in the cells during cultivation at 37 °C

Особенности накопления белка SOP при различной температуре культивирования продуцента.

После добавления индуктора клетки продуцента целевого белка культивировали при температуре 37; 30; 25 и 18 °С. Отрицательный контроль (клетки без плазмиды) выращивали при 37 °С. Пробы клеток анализировали с помощью ПААГ-электрофореза (рис. 5).

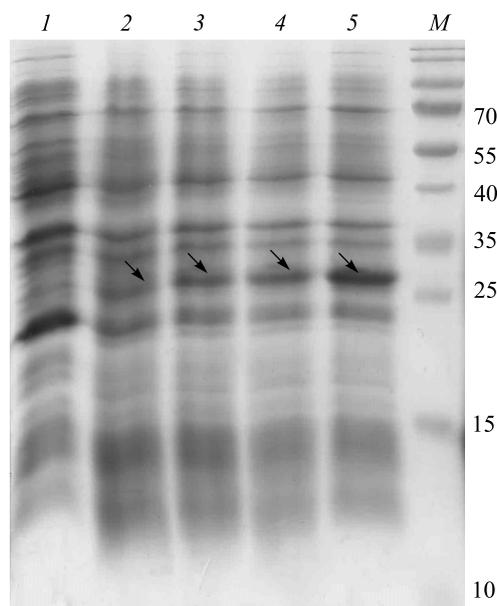


Рис. 5. Результаты ПААГ-электрофореза проб, содержащих общий белок из клеток *E. coli* с рекомбинантной плазмидой pET-SOP, культивируемых при различной температуре:

1 – отрицательный контроль (белок из клеток без рекомбинантной плазмиды);
2 – белок, синтезирующийся при 18 °С; 3 – белок, синтезирующийся при 25 °С;
4 – белок, синтезирующийся при 30 °С; 5 – белок, синтезирующийся при 37 °С;
M – маркер молекулярной массы (справа указаны размеры белков (кДа)).

Стрелками обозначен целевой белок SOP (26,35 кДа)

Fig. 5. Results of PAGE electrophoresis of samples with total protein from *E. coli* cells with recombinant plasmid pET-SOP, cultivated at different temperature:

1 – negative control (protein from cells without recombinant plasmids);
2 – protein expressed at 18 °C; 3 – protein expressed at 25 °C; 4 – protein expressed at 30 °C;
5 – protein expressed at 37 °C; M – molecular weight marker (on the right are shown the protein sizes (kDa)).
The arrows indicate the target protein SOP (26.35 kDa)

Чтобы определить оптимальные условия для накопления белка SOP в растворимом и нерастворимом состоянии, из образцов культур, выращенных при различной температуре, выделяли растворимую и нерастворимую фракции, из которых готовили пробы для ПААГ-электрофореза (рис. 6).

В ходе денситометрического анализа установлено, что наибольшее количество целевого белка ((24,06 ± 1,90) % от общего белка) синтезируется в клетках, культивируемых при 37 °С, при этом он накапливается преимущественно в нерастворимой форме. При 30 °С содержание белка SOP достигает (14,93 ± 1,23) % ($n = 5$) от общего количества белка в клетке, при этом он присутствует как в растворимой, так и в нерастворимой фракции примерно в одинаковых пропорциях. При 25 °С содержание рекомбинантного белка снижается до (8,94 ± 1,33) % ($n = 5$), а при 18 °С – до (6,45 ± 0,76) % ($n = 5$). При 18–25 °С белок SOP находится преимущественно в растворимом состоянии, а нерастворимый белок присутствует в незначительных количествах. Результаты анализа представлены на рис. 7.

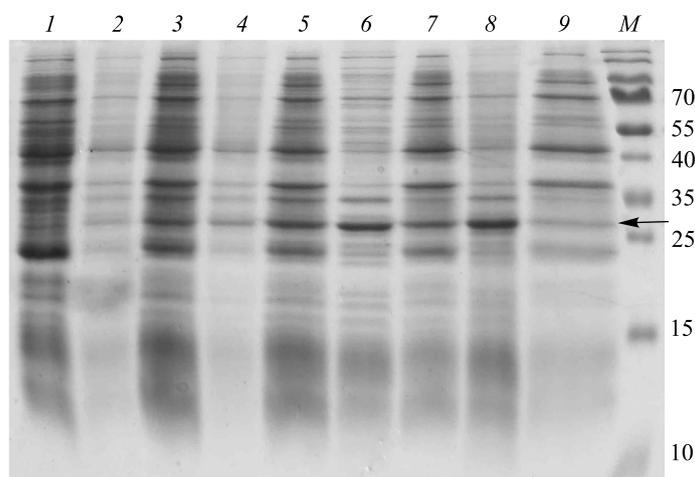


Рис. 6. Результаты ПААГ-электрофореза разных фракций белка из клеток *E. coli* с рекомбинантной плазмидой pET-SOP, культивируемых при различной температуре:

- 1 – отрицательный контроль (общий белок из клеток без рекомбинантной плазмиды);
 2 – нерастворимая фракция, образующаяся при 18 °С; 3 – растворимая фракция, образующаяся при 18 °С;
 4 – нерастворимая фракция, образующаяся при 25 °С; 5 – растворимая фракция, образующаяся при 25 °С;
 6 – нерастворимая фракция, образующаяся при 30 °С; 7 – растворимая фракция, образующаяся при 30 °С;
 8 – нерастворимая фракция, образующаяся при 37 °С; 9 – растворимая фракция, образующаяся при 37 °С;
 M – маркер молекулярной массы (справа указаны размеры белков (кДа)).
 Стрелками обозначен целевой белок SOP (26,35 кДа)

Fig. 6. Results of PAGE electrophoresis of various protein fractions from *E. coli* cells with recombinant plasmid pET-SOP, cultivated at different temperature:

- 1 – negative control (total protein from cells without recombinant plasmid); 2 – insoluble fraction formed at 18 °С;
 3 – soluble fraction formed at 18 °С; 4 – insoluble fraction formed at 25 °С; 5 – soluble fraction formed at 25 °С;
 6 – insoluble fraction formed at 30 °С; 7 – soluble fraction formed at 30 °С; 8 – insoluble fraction formed at 37 °С;
 9 – soluble fraction formed at 37 °С; M – molecular weight marker (on the right are shown the protein sizes (kDa)).
 The arrows indicate the target protein SOP (26.35 kDa)

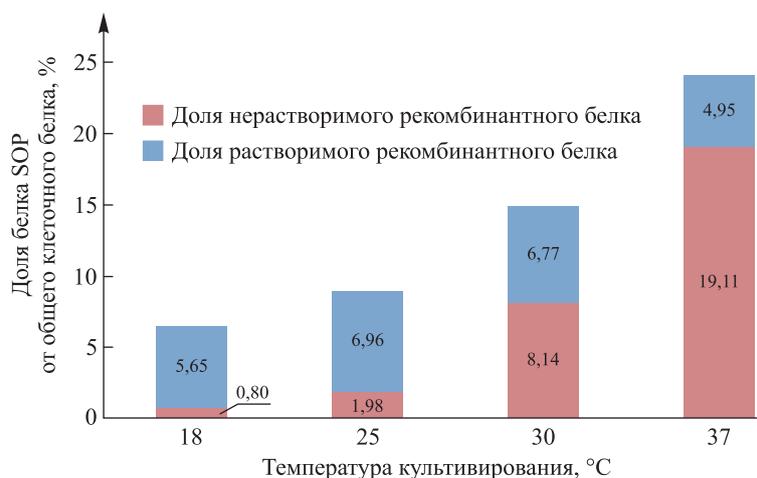


Рис. 7. Влияние температуры культивирования на биосинтез целевого белка в клетках *E. coli*

Fig. 7. Effect of cultivation temperature on the biosynthesis of the target protein in *E. coli* cells

Обсуждение результатов. Белок капсида ЦВС-2 является антигеном, необходимым для получения вакцины, в связи с чем проводится множество исследований по оптимизации его производства. Один из таких способов – получение рекомбинантного белка в клетках *E. coli*, однако ген белка капсида ЦВС-2 требует значительной модификации для повышения уровня его экспрессии в бактериях. Без оптимизации белок капсида ЦВС-2 составляет только 8,6 % от общего количества белка в клетке продуцента [8], тогда как различные варианты модифицированного белка могут составлять от 13–14 % [8; 9; 13] до 22 % [14] от общего количества белка в клетке. Таким образом, уровень экспрессии свыше 20 % от общего белка в клетках *E. coli* можно считать достаточно высоким. Модифицированный рекомбинантный белок SOP накапливается в количестве более 24 % от общего клеточного белка, что позволяет отнести сконструированный штамм-продуцент к производственно значимым штаммам-продуцентам. Такой уровень экспрессии достигнут за счет сочетания оптимизации кодонов и удаления N-концевого участка белка, затрудняющего экспрессию.

Также установлено, что наиболее высокий уровень синтеза целевого белка соответствует температуре культивирования штамма-продуцента 37 °С, при которой большая часть рекомбинантного белка накапливается в нерастворимом состоянии (в виде телец включения), это согласуется с результатами других экспериментов по биосинтезу гетерологичных белков [15]. Стоит отметить, что в работах по получению растворимого белка капсида цирковируса температура, при которой проводилась индукция экспрессии, отличается: 16 °С [16], 20 °С [17], 30 °С [18], 37 °С [19]. Это может быть связано с тем, что авторы указанных работ получали разные варианты данного белка (полноразмерный или укороченный белок, с оптимизацией кодонов гена или без нее и т. д.), которые имели свои особенности накопления в бактериальной клетке. Также различие результатов может объясняться разными способами разрушения клеток и выделения растворимого белка. Способ выделения белка может повлиять на его третичную структуру и функциональность. Так, в некоторых случаях разрушение клеток ультразвуком позволяло выделить больше белка в растворимой форме, чем при использовании реагента B-PER, однако снижало долю функционального белка [10].

Проведенное исследование показало, что можно получать целевой белок в необходимой форме, варьируя температуру экспрессии. При условиях культивирования и методе разрушения клеток, использованных в данной работе, оптимальная температура для получения растворимого белка SOP составляет 25 °С. Наибольшее содержание рекомбинантного белка достигается при 37 °С, при этом он накапливается преимущественно в нерастворимом состоянии. Таким образом, данная температура является оптимальной для получения большого количества целевого белка, однако затем потребуются либо изменение методов выделения белка, либо солюбилизация и рефолдинг полученного нерастворимого продукта [20], либо его использование непосредственно в виде телец включения [21].

Установлено, что укороченный и оптимизированный рекомбинантный белок капсида ЦВС-2 сохраняет свою антигенную активность. Эффективное связывание с антителами против капсида цирковируса дает надежду, что получаемый целевой рекомбинантный белок может быть использован в качестве антигена для производства вакцины. В связи с этим целесообразны дальнейшие исследования иммуногенности рекомбинантного белка капсида ЦВС-2 для определения наиболее эффективного и экономически выгодного варианта вакцины.

Заключение

В клетках сконструированного бактериального штамма-продуцента, наследующего плазмиду pET-SOP с оптимизированным геном капсидного белка SOP (субъединичного рекомбинантного антигена ЦВС-2b), успешно индуцируется синтез этого целевого продукта. При температуре 37 °С в течение 2 ч после индукции доля целевого белка достигает 24 % от общего количества белка в клетке, при этом он накапливается в основном в виде телец включения. При понижении температуры культивирования до 18–25 °С доля целевого белка в клетке продуцента снижается и он находится преимущественно в растворимом состоянии. Полученные данные позволяют отнести бактериальный штамм, содержащий сконструированную рекомбинантную плазмиду с модифицированным геном вируса, к эффективным производственным продуцентам целевого белка. Особенности его накопления в клетках позволяют получать целевой продукт как в растворимой, так и в нерастворимой форме, варьируя температуру и время экспрессии. Взаимодействие белка SOP с антисывороткой к ЦВС-2 указывает на потенциальную возможность использования данного белка для получения вакцины.

Библиографические ссылки

1. Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, et al. Characterisation of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology*. 1998;79(9):2171–2179. DOI: 10.1099/0022-1317-79-9-2171.
2. Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segalés J, Varsani A, ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: Circoviridae. *Journal of General Virology*. 2017;98(8):1997–1998. DOI: 10.1099/jgv.0.000871.

3. Opriessnig T, McKeown NE, Zhou E-M, Meng X-J, Halbur PG. Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. *Journal of General Virology*. 2006;87(10):2923–2932. DOI: 10.1099/vir.0.82099-0.
4. Alarcon P, Rushton J, Wieland B. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 sub-clinical infection in England – an economic disease model. *Preventive Veterinary Medicine*. 2013;110(2):88–102. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.02.010.
5. Segalés J. Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. *Expert Review of Vaccines*. 2015;14(3):473–487. DOI: 10.1586/14760584.2015.983084.
6. Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, Elvinger F, Meng XJ. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the non-pathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *Journal of Virology*. 2004;78(12):6297–6303. DOI: 10.1128/JVI.78.12.6297-6303.2004.
7. Matzinger SR, Opriessnig T, Xiao C-T, Catanzaro N, Beach NM, Slade DE, et al. A chimeric virus created by DNA shuffling of the capsid genes of different subtypes of porcine circovirus type 2 (PCV2) in the backbone of the non-pathogenic PCV1 induces protective immunity against the predominant PCV2b and the emerging PCV2d in pigs. *Virology*. 2016;498:82–93. DOI: 10.1016/j.virol.2016.08.011.
8. Прокулевич ВА, Кудин КВ. Экспрессия открытой рамки трансляции белка капсида ЦВС-2 в клетках *E. coli*. В: Пручковская ОН, редактор. *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Том 5*. Минск: Беларуская навука; 2013. с. 131–141.
9. Титова АД, Кудин КВ, Прокулевич ВА. Особенности экспрессии белка капсида цирковируса свиней 2-го типа в бактериальных клетках. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021;1:48–57. DOI: 10.33581/2521-1722-2021-1-48-57.
10. Soon Bin Kwon, Ji Eun Yu, Jihoon Kim, Hana Oh, Chan Park, Jinhee Lee, et al. Quality screening of incorrectly folded soluble aggregates from functional recombinant proteins. *International Journal of Molecular Science*. 2019;20(4):907. DOI: 10.3390/ijms20040907.
11. Ausubel M, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al., editors. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons; 2003. 2 volumes. DOI: 10.1002/mrd.1080010210.
12. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089.
13. Ji-Yong Zhou, Shao-Bin Shang, Hui Gong, Qing-Xin Chen, Jian-Xiang Wu, Hui-Gang Shen, et al. *In vitro* expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localisation signal. *Journal of Biotechnology*. 2005;118(2):201–211. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.02.017.
14. Wentao Kong, Jian Kong, Shumin Hu, Wenwei Lu, Ke Wang, Mingjie Ji. Enhanced expression of PCV2 capsid protein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis* by codon optimisation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;27:651–657. DOI: 10.1007/s11274-010-0503-7.
15. Peti W, Page R. Strategies to maximise heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expression and Purification*. 2007;51(1):1–10. DOI: 10.1016/j.pep.2006.06.024.
16. Guoyang Liu, Xuwen Qiao, Chen Chang, Tao Hua, Jichun Wang, Bo Tang, et al. Reduction of postweaning multisystemic wasting syndrome-associated clinical symptoms by virus-like particle vaccine against porcine parvovirus and porcine circovirus type 2. *Viral Immunology*. 2020;33(6):444–456. DOI: 10.1089/vim.2019.0201.
17. Shuanghui Yin, Shiqi Sun, Shunli Yang, Youjun Shang, Xuepeng Cai, Xiangtao Liu. Self-assembly of virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein expressed from *Escherichia coli*. *Virology Journal*. 2010;7:166. DOI: 10.1186/1743-422X-7-166.
18. Trundova M, Celer V. Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimised *E. coli* cells. *Virus Genes*. 2007;34(2):199–204. DOI: 10.1007/s11262-006-0043-2.
19. Liu Q, Willson P, Attoh-Poku S, Babiuk LA. Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein. *Protein Expression and Purification*. 2001;21(1):115–120. DOI: 10.1006/prep.2000.1356.
20. Singh SM, Panda AK. Solubilisation and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005;99(4):303–310. DOI: 10.1263/jbb.99.303.
21. Kęsik M, Sączyńska V, Szewczyk B, Płucienniczak A. Inclusion bodies from recombinant bacteria as a novel system for delivery of vaccine antigen by the oral route. *Immunology Letters*. 2004;91(2–3):197–204. DOI: 10.1016/j.imlet.2003.12.001.

References

1. Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, et al. Characterisation of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology*. 1998;79(9):2171–2179. DOI: 10.1099/0022-1317-79-9-2171.
2. Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segalés J, Varsani A, ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: Circoviridae. *Journal of General Virology*. 2017;98(8):1997–1998. DOI: 10.1099/jgv.0.000871.
3. Opriessnig T, McKeown NE, Zhou E-M, Meng X-J, Halbur PG. Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. *Journal of General Virology*. 2006;87(10):2923–2932. DOI: 10.1099/vir.0.82099-0.
4. Alarcon P, Rushton J, Wieland B. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 sub-clinical infection in England – an economic disease model. *Preventive Veterinary Medicine*. 2013;110(2):88–102. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.02.010.
5. Segalés J. Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. *Expert Review of Vaccines*. 2015;14(3):473–487. DOI: 10.1586/14760584.2015.983084.
6. Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, Elvinger F, Meng XJ. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the non-pathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *Journal of Virology*. 2004;78(12):6297–6303. DOI: 10.1128/JVI.78.12.6297-6303.2004.

7. Matzinger SR, Opriessnig T, Xiao C-T, Catanzaro N, Beach NM, Slade DE, et al. A chimeric virus created by DNA shuffling of the capsid genes of different subtypes of porcine circovirus type 2 (PCV2) in the backbone of the non-pathogenic PCV1 induces protective immunity against the predominant PCV2b and the emerging PCV2d in pigs. *Virology*. 2016;498:82–93. DOI: 10.1016/j.virol.2016.08.011.
8. Prokulevich VA, Kudzin KV. [Expression of the open reading frame of PCV2 capsid protein in *E. coli* cells]. In: Pruchkovskaya ON, editor. *Mikrobnnye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty. Tom 5* [Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects. Volume 5]. Minsk: Belaruskaja navuka; 2013. p. 131–141. Russian.
9. Titova AD, Kudzin KV, Prokulevich VA. Properties of expression of protein capsid protein of porcine circovirus type 2 in bacterial cells. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;1:48–57. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2021-1-48-57.
10. Soon Bin Kwon, Ji Eun Yu, Jihoon Kim, Hana Oh, Chan Park, Jinhee Lee, et al. Quality screening of incorrectly folded soluble aggregates from functional recombinant proteins. *International Journal of Molecular Science*. 2019;20(4):907. DOI: 10.3390/ijms20040907.
11. Ausubel M, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al., editors. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons; 2003. 2 volumes. DOI: 10.1002/mrd.1080010210.
12. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089.
13. Ji-Yong Zhou, Shao-Bin Shang, Hui Gong, Qing-Xin Chen, Jian-Xiang Wu, Hui-Gang Shen, et al. *In vitro* expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localisation signal. *Journal of Biotechnology*. 2005;118(2):201–211. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.02.017.
14. Wentao Kong, Jian Kong, Shumin Hu, Wenwei Lu, Ke Wang, Mingjie Ji. Enhanced expression of PCV2 capsid protein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis* by codon optimisation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;27:651–657. DOI: 10.1007/s11274-010-0503-7.
15. Peti W, Page R. Strategies to maximise heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expression and Purification*. 2007;51(1):1–10. DOI: 10.1016/j.pep.2006.06.024.
16. Guoyang Liu, Xuwen Qiao, Chen Chang, Tao Hua, Jichun Wang, Bo Tang, et al. Reduction of postweaning multisystemic wasting syndrome-associated clinical symptoms by virus-like particle vaccine against porcine parvovirus and porcine circovirus type 2. *Viral Immunology*. 2020;33(6):444–456. DOI: 10.1089/vim.2019.0201.
17. Shuanghui Yin, Shiqi Sun, Shunli Yang, Youjun Shang, Xuepeng Cai, Xiangtao Liu. Self-assembly of virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein expressed from *Escherichia coli*. *Virology Journal*. 2010;7:166. DOI: 10.1186/1743-422X-7-166.
18. Trundova M, Celer V. Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimised *E. coli* cells. *Virus Genes*. 2007;34(2):199–204. DOI: 10.1007/s11262-006-0043-2.
19. Liu Q, Willson P, Attoh-Poku S, Babiuk LA. Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein. *Protein Expression and Purification*. 2001;21(1):115–120. DOI: 10.1006/prep.2000.1356.
20. Singh SM, Panda AK. Solubilisation and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005;99(4):303–310. DOI: 10.1263/jbb.99.303.
21. Kęsik M, Sączyńska V, Szewczyk B, Plucienniczak A. Inclusion bodies from recombinant bacteria as a novel system for delivery of vaccine antigen by the oral route. *Immunology Letters*. 2004;91(2–3):197–204. DOI: 10.1016/j.imlet.2003.12.001.

Получена 18.05.2022 / исправлена 20.06.2022 / принята 20.06.2022.
Received 18.05.2022 / revised 20.06.2022 / accepted 20.06.2022.

ДИНАМИКА КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ ПАЦИЕНТОВ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Е. В. ОХРЕМЧУК¹⁾, Е. Я. СКОПОВЕЦ²⁾, А. Э. ОХРЕМЧУК¹⁾,
Н. П. КИРСАНОВА²⁾, А. В. СИДОРЕНКО¹⁾, Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ¹⁾

¹⁾Институт микробиологии НАН Беларуси,
ул. Академика Купревича, 2, 220141, г. Минск, Беларусь

²⁾Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский район, Беларусь

Исследована динамика микробиоты кишечника 32 пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Показано, что обратный индекс Симпсона, характеризующий таксономическое разнообразие микробиоты, на 14-й и 30-й дни после трансплантации снижается более чем в 3 раза и к 100-му дню возвращается к исходному уровню. Связи между снижением биоразнообразия микробиоты и развитием посттрансплантационных осложнений не выявлено. Отмечен индивидуальный характер изменений качественного и количественного состава микробиоты пациентов после трансплантации. Определен ряд бактериальных таксонов, таких как семейства Streptococcaceae, Actinomycetaceae, Acidaminococcaceae, Akkermansiaceae, Desulfovibrionaceae, Prevotellaceae, роды *Streptococcus*, *Clostridioides*, *Phascolarctobacterium*, *Paraprevotella*, *Bilophila*, *Akkermansia*, *Coprococcus*, *Sutterella*, *Alistipes*, изменение представленности которых связано с развитием посттрансплантационных

Образец цитирования:

Охремчук ЕВ, Скоповец ЕЯ, Охремчук АЭ, Кирсанова НП, Сидоренко АВ, Валентович ЛН. Динамика кишечной микробиоты пациентов с онкогематологическими заболеваниями после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;2:48–59.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-48-59>

For citation:

Akhremchuk KV, Skapavets KY, Akhremchuk AE, Kirsanova NP, Sidarenka AV, Valentovich LN. Dynamics of gut microbiota in patients suffering from hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;2:48–59. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-48-59>

Авторы:

Екатерина Владимировна Охремчук – научный сотрудник лаборатории «Центр аналитических и гено-инженерных исследований».

Екатерина Ярославовна Скоповец – младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований.

Артур Эдуардович Охремчук – научный сотрудник лаборатории «Центр аналитических и гено-инженерных исследований».

Наталья Павловна Кирсанова – кандидат медицинских наук; врач-гематолог отделения трансплантации.

Анастасия Вячеславовна Сидоренко – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией «Коллекция микроорганизмов».

Леонид Николаевич Валентович – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией «Центр аналитических и гено-инженерных исследований».

Authors:

Katsiaryna V. Akhremchuk, researcher at the laboratory «Center of analytical and genetic engineering research».

katerina_akhr@bio.bsu.by
<https://orcid.org/0000-0002-3195-6529>

Katsiaryna Y. Skapavets, junior researcher at the laboratory of molecular genetic research.

skopovets@yandex.by
<https://orcid.org/0000-0002-4510-6760>

Artur E. Akhremchuk, researcher at the laboratory «Center of analytical and genetic engineering research».

akhremchuk@bio.bsu.by
<https://orcid.org/0000-0001-8602-4887>

Natallia P. Kirsanova, PhD (medicine); hematologist at the department of transplantation.

litvinko_natasha@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3193-4864>

Anastasiya V. Sidarenka, PhD (biology); head of the laboratory «Microbial collection».

a_sidarenka@mbio.bas-net.by
<https://orcid.org/0000-0001-8447-9538>

Leonid N. Valentovich, PhD (biology); head of the laboratory «Center of analytical and genetic engineering research».

valentovich@mbio.bas-net.by
<https://orcid.org/0000-0001-7329-743X>

осложнений. Выдвинуто предположение, что повышенная относительная численность представителей отдела Proteobacteria, семейств Actinomycetaceae и Streptococcaceae, рода *Streptococcus* до трансплантации может являться потенциальным биомаркером развития реакции «трансплантат против хозяина».

Ключевые слова: микробиом; реакция «трансплантат против хозяина»; дисбиоз; метагеномика.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственной программы «Научно-технологические и технические» на 2016–2020 гг. (подпрограмма «Инновационные биотехнологии – 2020», мероприятие 67¹).

DYNAMICS OF GUT MICROBIOTA IN PATIENTS SUFFERING FROM HEMATOLOGIC MALIGNANCIES AFTER ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

K. V. AKHREMCHUK^a, K. Y. SKAPAVETS^b, A. E. AKHREMCHUK^a,
N. P. KIRSANOVA^b, A. V. SIDARENKA^a, L. N. VALETOVICH^a

^aInstitute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus,
2 Akademika Kupreviča Street, Minsk 220141, Belarus

^bBelarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
43 Frunzienskaja Street, Baraŭliany 223053, Minsk District, Belarus

Corresponding author: K. V. Akhremchuk (katerina_akhr@bio.bsu.by)

In this study, we described the dynamics of intestinal microbiota of 32 patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). After HSCT, on 14th day and 30th day, the inverse Simpson index value was more than 3 times lower compared to the pre-HSCT period. Biodiversity became more similar to the pre-HSCT level by 100th day. The correlation between diversity of microbiota and development of post-HSCT complications wasn't observed. Our findings indicated individual-specific changes in the taxonomic structure of patients' microbiota after HSCT. Changes in the relative abundance of the bacterial families Streptococcaceae, Actinomycetaceae, Acidaminococcaceae, Akkermansiaceae, Desulfovibrionaceae, Prevotellaceae, genera *Streptococcus*, *Clostridioides*, *Phascolarctobacterium*, *Paraprevotella*, *Bilophila*, *Akkermansia*, *Coprococcus*, *Sutterella*, *Alistipes* appear to be associated with the development of post-HSCT complications. High abundance of phylum Proteobacteria, families Actinomycetaceae and Streptococcaceae, genus *Streptococcus* before HSCT can be considered as a potential predictor of graft-versus-host disease development in the post-HSCT period.

Keywords: microbiome; graft-versus-host disease; dysbiosis; metagenomics.

Acknowledgements. This work was supported by the state program «Science-intensive technologies and equipment» for 2016–2020 (subprogram «Innovative biotechnologies – 2020», measure 67¹).

Введение

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) широко применяется при лечении онкогематологических заболеваний. Однако реципиенты ТГСК подвергаются высокому риску развития осложнений, таких как реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ), синдром синусоидальной обструкции, бактериальные инфекции и др. Острая РТПХ (ОРТПХ) является одной из основных причин смертности пациентов, перенесших трансплантацию [1; 2].

Рядом исследователей показано, что высокая частота инфекционных и иммунных осложнений с летальными исходами после ТГСК ассоциирована с кишечным дисбиозом – снижением общего разнообразия микробиоты и количества облигатно-анаэробных комменсальных бактерий, а также размножением патогенных и (или) условно-патогенных микроорганизмов [3–5]. Считается, что развитие РТПХ инициируется каскадом воспалительных реакций, вызванных повреждением тканей и транслокацией бактерий из кишечника [6]. Сообщалось, что состав микробиоты кишечника реципиентов ТГСК при приживлении нейтрофилов может являться предиктором развития ОРТПХ [7].

Изменения качественного и количественного состава кишечной микробиоты в ранние сроки после ТГСК – период максимального риска осложнений и летальных исходов – все еще мало изучены. Однако обсуждается возможность использования микробных биомаркеров для прогнозирования риска развития посттрансплантационных осложнений, в том числе РТПХ. В данном исследовании предпринята попытка проанализировать изменения состава микробиоты пациентов с онкогематологическими заболеваниями после ТГСК (первые 100 дней), выявить взаимосвязь между степенью дисбиоза и клиническим проявлением инфекционных и иммунологических осложнений, определить потенциальные микробные маркеры развития РТПХ.

Материалы и методы исследования

Исследование одобрено комитетом по медицинской этике Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии. Все пациенты, включенные в исследование, либо их родители дали письменное информированное согласие на сбор и анализ клинических данных, а также образцов биологического материала. Сбор клинических данных проводился путем ретроспективного обзора клинических карт лицами, не участвующими в анализе микробиоты.

Исследуемая группа пациентов. В исследование включены 32 пациента с онкогематологическими заболеваниями в возрасте от 2 до 29 лет (медиана 10,5 года), проходивших лечение в условиях дневного стационара на базе Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии. Перед ТГСК пациентам назначался миелоаблативный либо немиелоаблативный режим кондиционирования с учетом возраста и соматического статуса, источника стволовых клеток, степени совместимости между донором и реципиентом, типа и стадии болезни. За период наблюдения после ТГСК (100 дней) у 8 пациентов развилась РТПХ различной степени тяжести; для 6 пациентов отмечен летальный исход, однако ни у одного из них не выявлены признаки РТПХ. Медиана возраста в группе пациентов с РТПХ составила 16,0 года (интерквартильный размах 5–29 лет), в группе пациентов без РТПХ – 6,0 года (интерквартильный размер 2–28 лет). Общая характеристика¹ пациентов и параметров ТГСК представлена в табл. 1.

Таблица 1

Основные характеристики пациентов и параметры ТГСК

Table 1

Characteristics of patients and hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) parameters

Параметр	Количество пациентов (доля, %)		
	с РТПХ	без РТПХ	всего
Половая принадлежность			
Женщины	4 (50,0)	10 (41,7)	14 (43,7)
Мужчины	4 (50,0)	14 (58,3)	18 (56,3)
Диагноз			
Острый лимфобластный лейкоз	5 (62,5)	4 (16,7)	9 (28,1)
Острый миелоидный лейкоз	2 (25,0)	4 (16,7)	6 (18,8)
Приобретенная апластическая анемия	0 (0)	5 (20,9)	5 (15,6)
Неходжкинская лимфома	1 (12,5)	2 (8,3)	3 (9,4)
Первичный иммунодефицит	0 (0)	3 (12,5)	3 (9,4)
Миелодиспластический синдром	0 (0)	2 (8,3)	2 (6,3)
Анемия Блекфена – Даймонда	0 (0)	1 (4,2)	1 (3,1)
Талассемия	0 (0)	1 (4,2)	1 (3,1)
Острый бифенотипический лейкоз	0 (0)	1 (4,2)	1 (3,1)
Лимфома Ходжкина	0 (0)	1 (4,2)	1 (3,1)
Режим кондиционирования			
Миелоаблативный	8 (100,0)	15 (62,5)	23 (71,9)
Немиелоаблативный	0 (0)	9 (37,5)	9 (28,1)
Вид ТГСК			
От HLA-идентичного неродственного донора	4 (50,0)	10 (41,7)	14 (43,7)
От совместимого родственного донора	0 (0)	8 (33,3)	8 (25,0)
Гаплоидентичная	4 (50,0)	6 (25,0)	10 (31,3)

¹Более подробную характеристику пациентов см. в прил. 1: http://bio.bsu.by/ebb/2022/2/supplementary_data_1.pdf.

Окончание табл. 1
Ending table 1

Параметр	Количество пациентов (доля, %)		
	с РТПХ	без РТПХ	всего
Источник стволовых клеток			
Костный мозг	2 (25,0)	15 (62,5)	17 (53,1)
Периферические стволовые клетки	6 (75,0)	9 (37,5)	15 (46,9)

Сбор и хранение биоматериала. Образцы кала собирали у пациентов в нескольких контрольных точках: до ТГСК ($n = 30$) и через 14 дней ($n = 19$), 30 дней ($n = 21$) и 100 дней ($n = 15$) после трансплантации. Сбор биоматериала осуществляли в стерильные криопробирки объемом 2 мл с металлическим шариком (диаметр 4,5 мм) для гомогенизации и перемешивания содержимого. Образцы кала замораживали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, затем хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до выделения ДНК.

Секвенирование и биоинформатическая обработка данных. Выделение метагеномной ДНК из образцов кала осуществляли с помощью набора NucleoSpin[®] DNA Soil (740780; Macherey-Nagel, Германия). Подготовку библиотек для секвенирования проводили в соответствии с руководством 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, США). Для определения нуклеотидных последовательностей V3–V4 варибельного региона генов 16S рPHK использовали комплект реактивов MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle) (MS-102-3003; Illumina) и секвенатор MiSeq (Illumina). Удаление последовательностей праймеров и объединение прочтений² выполняли с помощью скрипта *preprocess16S* (<https://github.com/masikol/preprocess16S>). Последующую обработку данных осуществляли с использованием среды программирования R. Для контроля качества объединенных прочтений, конструирования таблицы вариантов ампликонных последовательностей, удаления химерных последовательностей и присвоения таксономического статуса применяли конвейер *dada2* (<https://benjjneb.github.io/dada2/>). При таксономической классификации в качестве референса использовали тренировочный набор данных на основе базы данных *Silva SSU NR99* (версия 138) [8], форматированный для применения в конвейере *dada2*. Удаление предположительно контаминирующих последовательностей осуществляли с помощью библиотеки *decontam* (<https://benjjneb.github.io/decontam/>). Для вычисления и визуализации обратного индекса Симпсона [9] использовали возможности библиотеки *phyloseq* (<https://joey711.github.io/phyloseq/>). Для попарных сравнений применяли *T*-критерий Вилкоксона [10], для поправки на множественную проверку гипотез – метод Бенджамини – Хохберга [11]. Вычисление логарифма кратного изменения ($\log_2\text{FoldChange}$) представленности вариантов ампликонных последовательностей и соответствующих значений средней доли ложных отклонений гипотезы (FDR) проводили с помощью библиотеки *DESeq2* (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>).

Результаты и их обсуждение

Биоразнообразие и динамика кишечной микробиоты пациентов после ТГСК. Разнообразие микробиоты пациентов с онкогематологическими заболеваниями анализировали до ТГСК (медиана за 8 дней до ТГСК) и через 14; 30; 100 дней после трансплантации. Медиана обратного индекса Симпсона, описывающего вероятность принадлежности двух случайно отобранных из неопределенно большого сообщества прочтений к разным таксономическим единицам, у пациентов до ТГСК составляла 9,5, на 14-й день после ТГСК – 2,1, на 30-й день – 3,1, на 100-й день – 9,7. Таким образом, через 14 и 30 дней после трансплантации наблюдалось статистически значимое снижение биоразнообразия кишечной микробиоты реципиентов ТГСК. Наблюдаемые изменения, вероятно, связаны с предшествующим ТГСК кондиционированием, а также интенсивной антибиотикотерапией после трансплантации. Через 100 дней после ТГСК биоразнообразие кишечной микробиоты пациентов возвращалось к уровню предтрансплантационного периода (рис. 1). Резкое снижение α -разнообразия микробиоты, особенно между точкой до ТГСК и 14-м днем после трансплантации, отмечено и в других исследованиях [12; 13]. В работе Э. Илетт с коллегами статистически значимые отличия в уровне α -разнообразия кишечного микробиоценоза наблюдали также между предтрансплантационным периодом и 100-м днем после ТГСК [14].

Основываясь на статистически значимых отличиях в значениях обратного индекса Симпсона у пациентов до ТГСК и через 14 и 30 дней после трансплантации, авторы проверили гипотезу о наличии связи между уровнем биоразнообразия кишечной микробиоты и развитием посттрансплантационных осложнений. В настоящем исследовании статистически значимых отличий в таксономическом разнообразии микробных сообществ кишечника у реципиентов ТГСК с симптомами РТПХ и без данного

²Информацию о количестве прочтений, приходящихся на каждый образец, см. в прил. 2: http://bio.bsu.by/ebb/2022/2/supplementary_data_2.xlsx.

осложнения не выявлено (рис. 2). Также не обнаружено взаимосвязи между биоразнообразием кишечной микробиоты и режимом кондиционирования (миелоаблативным либо немиелоаблативным). Схожие результаты опубликованы Э. Илетт с коллегами [14]. С другой стороны, рядом исследований показано, что снижение биоразнообразия кишечной микробиоты у реципиентов ТГСК связано с режимом кондиционирования и антибиотикотерапией и может индуцировать оРТПХ [15; 16]. У взрослых пациентов, перенесших ТГСК и имеющих симптомы РТПХ, отмечено значимое уменьшение таксономического разнообразия микробиоты по сравнению с пациентами, у которых РТПХ не диагностировалась [17]. Таким образом, полученные в настоящее время данные, касающиеся роли биоразнообразия кишечной микробиоты в развитии РТПХ, довольно противоречивы, что свидетельствует о необходимости проведения дальнейших исследований в этом направлении.

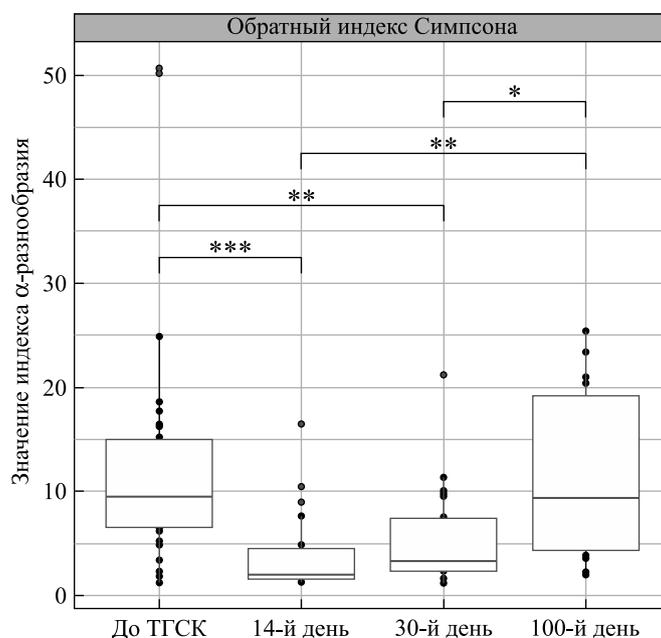


Рис. 1. Динамика α -разнообразия кишечной микробиоты у реципиентов ТГСК. Уровень значимости p установлен с помощью T -критерия Вилкоксона с применением метода Бенджамини – Хохберга для поправки на множественную проверку гипотез: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,001$; *** – $p \leq 0,0001$

Fig. 1. Changes in alpha diversity of gut microbiota in HSCT recipients. The Wilcoxon pairwise test with the Benjamini – Hochberg procedure was used to estimate and correct the p -values: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,001$; *** – $p \leq 0,0001$

Авторы проанализировали динамику представленности четырех наиболее характерных для микробиоты здоровых людей отделов бактерий (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria) в кишечнике пациентов в разных временных точках после ТГСК (рис. 3). Количество представителей отдела Firmicutes изменялось незначительно. Данный факт примечателен, так как в исследованиях других научных групп отмечено снижение относительной численности фирмикут после ТГСК [12; 18], а в ряде работ низкая доля этих бактерий ассоциирована с дисбиозом [19]. Представленность отдела Bacteroidetes снижалась в поздний посттрансплантационный период ($p < 0,001$), что согласуется с литературными данными [12; 19]. Доля представителей отдела Actinobacteria уменьшалась в ранний период после ТГСК ($p = 0,019$), но возвращалась к исходному уровню уже через 30 дней. В исследовании С. Куиди с соавторами также отмечено снижение доли актинобактерий у реципиентов ТГСК [19]. Количество представителей отдела Proteobacteria варьировалось в широких пределах и статистически значимо не отличалось у пациентов с симптомами РТПХ и без данного осложнения. Отсутствие достоверных отличий в доле протеобактерий отмечено и в работе Н. Манцини с соавторами [12]. В ранее упомянутом исследовании С. Куиди с коллегами, напротив, выявлено повышение относительного количества представителей отдела Proteobacteria после ТГСК [19].

Наиболее распространенными семействами бактерий в кишечнике пациентов до ТГСК были Lachnospiraceae, Bacteroidaceae и Ruminococcaceae, относительно высокое содержание которых характерно и для кишечной микробиоты здоровых людей [20]. Значительную долю также занимали представители семейств Enterococcaceae, Streptococcaceae, Enterobacteriaceae, Peptostreptococcaceae и др. Через 14 дней после трансплантации состав микробиоты пациентов характеризовался существенными индивидуальными

отличиями, что могло быть связано со случайным характером колонизации желудочно-кишечного тракта после кондиционирования и ТГСК во время нахождения в дневном стационаре. Лишь 14 общих таксонов с относительным содержанием более 0,1 % прочтений присутствовали у 50 % или более пациентов. При этом самой распространенной и многочисленной группой являлись энтерококки, у отдельных пациентов занимающие более 95 % прочтений. Помимо семейства Enterococcaceae, детектировались семейства Vacteroidaceae, Streptococcaceae и Enterobacteriaceae. На 30-й день после ТГСК все еще преобладали бактерии семейства Enterococcaceae, однако появлялись бактерии других семейств, таких как Erysipelatoclostridiaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Bifidobacteriaceae, присутствовавших в кишечном микробиоме пациентов до трансплантации. Через 100 дней после ТГСК наиболее представленным в кишечнике пациентов являлось семейство Lachnospiraceae, также были распространены семейства Enterobacteriaceae, Enterococcaceae, Streptococcaceae. Стоит отметить, что состав микробиоты на 100-й день был все еще крайне вариабелен, для некоторых пациентов отмечено дисбиотическое состояние, что может свидетельствовать об инфекционном процессе в организме. Так, на уровне клинической картины у 2 реципиентов ТГСК диагностировали сепсис, вызванный бактериями вида *Pseudomonas aeruginosa*, у 3 реципиентов – стафилококковую инфекцию кровотока, у 1 реципиента – инфекцию кровотока, вызванную бактериями рода *Achromobacter*, у остальных реципиентов – энтероколиты различной природы, вирусные инфекции, микозы и др.

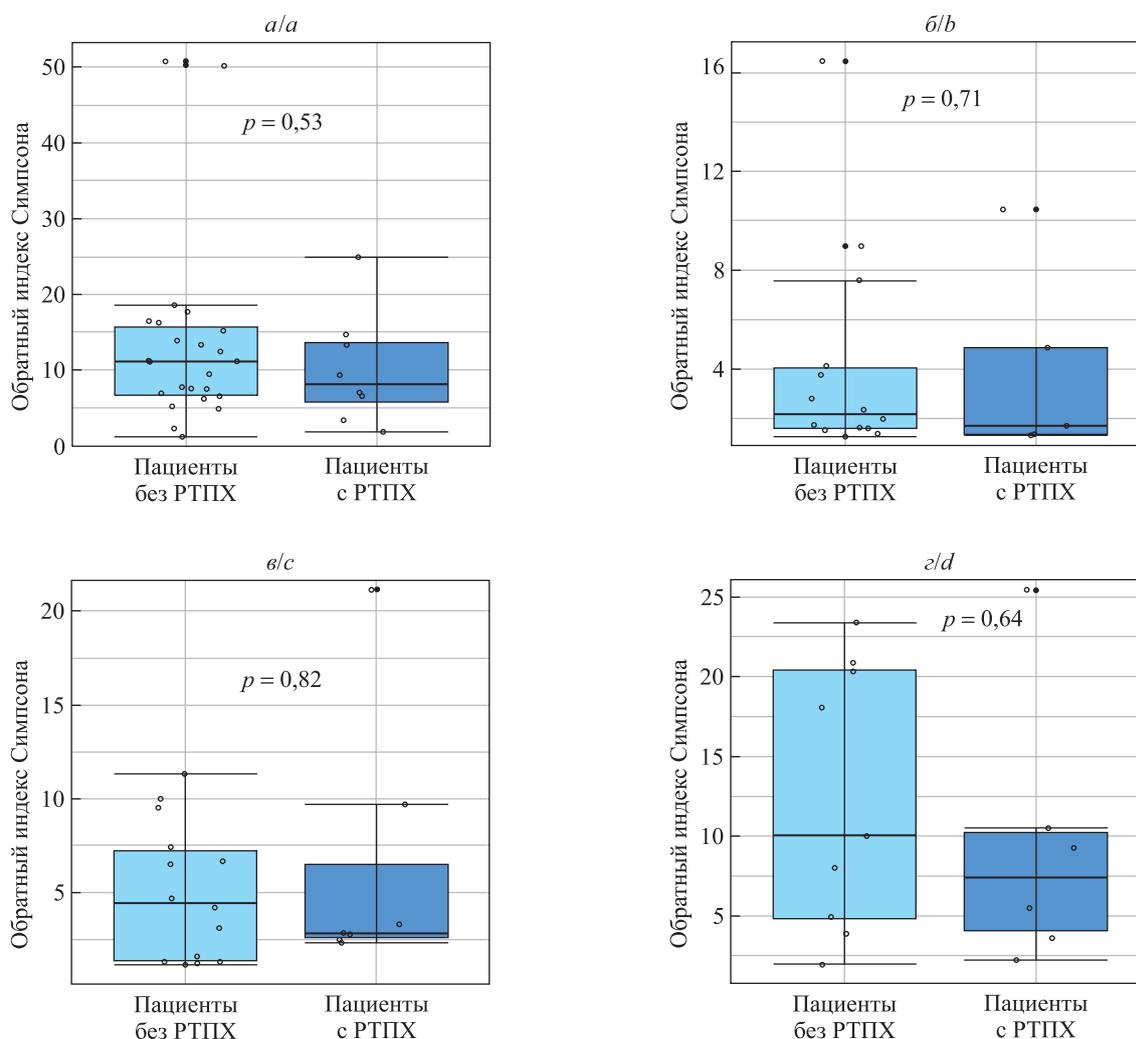


Рис. 2. Значения обратного индекса Симпсона в группе пациентов без РТПХ и в группе пациентов с РТПХ: а – до ТГСК; б – на 14-й день после ТГСК; в – на 30-й день после ТГСК; г – на 100-й день после ТГСК.

Уровень значимости p установлен с помощью T -критерия Вилкоксона

Fig. 2. Inverse Simpson index in patients with and without graft-versus-host disease: а – in pre-HSCT period; б – on 14th day after HSCT; в – on 30th day after HSCT; г – on 100th day after HSCT. p -Values were estimated using the Wilcoxon rank sum test

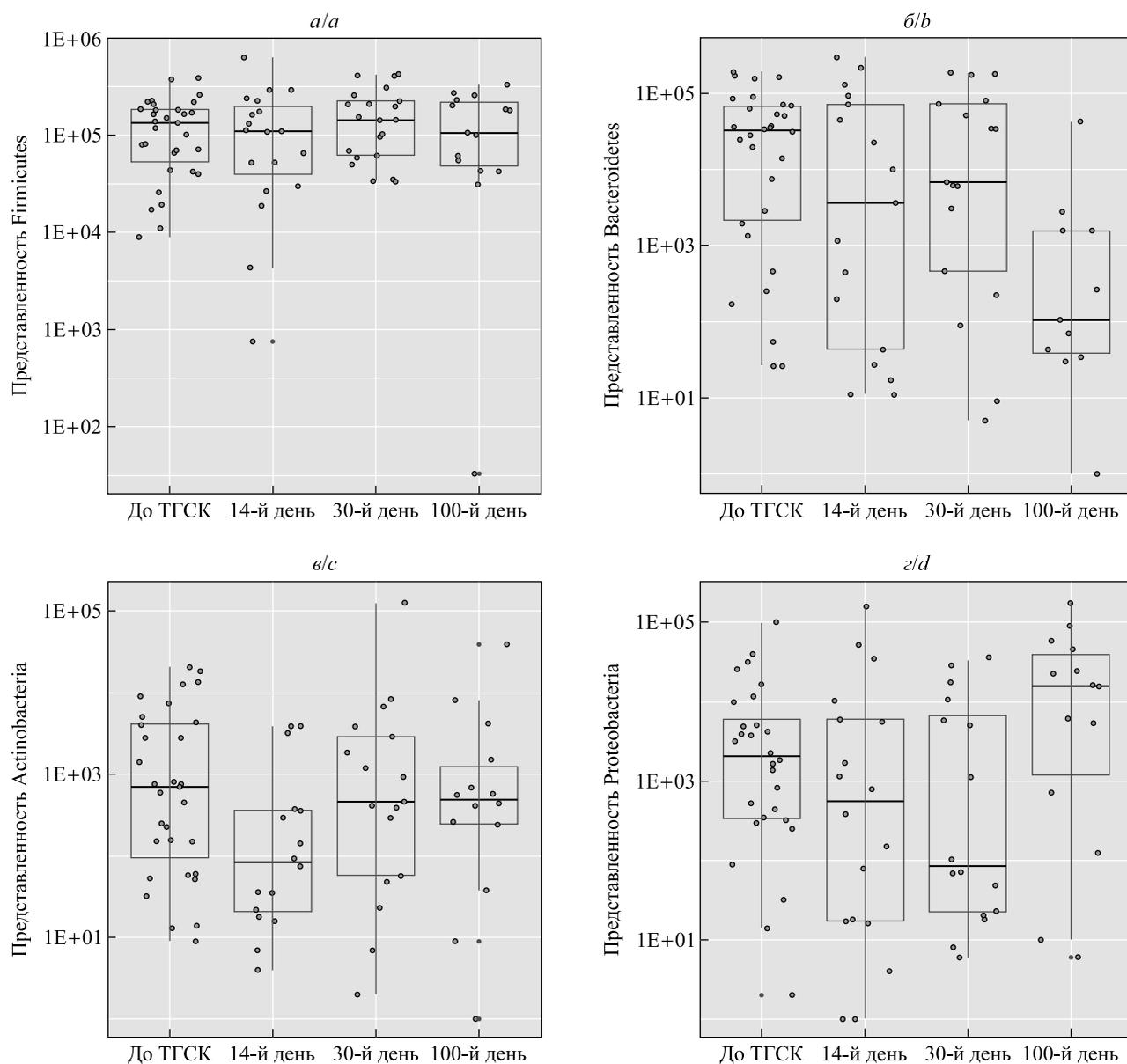


Рис. 3. Изменение представленности наиболее многочисленных отделов бактерий в микробиоте кишечника пациентов после ТГСК

Fig. 3. Changes in the abundance of prevalent taxa of gut microbiota in patients after HSCT

Таким образом, изменение качественного и количественного состава микробиоты пациентов после ТГСК носило индивидуальный характер. В большинстве случаев на фоне кондиционирования и антибиотикотерапии отмечались снижение таксономического разнообразия и смена доминирующих таксонов бактерий в ранний период после ТГСК (14-й и 30-й дни) и возвращение структуры микробиома к состоянию, близкому к предтрансплантационному периоду, через 100 дней. На фоне дисбиотических изменений микробиоты у пациентов часто наблюдалось избыточное развитие условно-патогенных микроорганизмов, в том числе энтерококков, стафилококков и энтеробактерий, что могло стать причиной инфекционных осложнений.

Связь между изменениями состава кишечной микробиоты и развитием посттрансплантационных осложнений. Сведения об изменениях таксономического состава микробиоты кишечника и отдельных таксонов микроорганизмов, которые могли бы служить маркерами, позволяющими прогнозировать развитие РТПХ, не согласованы и часто противоречивы [21; 22]. Вероятно, это связано с тем, что состав микробиоты кишечника зависит от множества факторов, включая прием антибиотиков, кондиционирование, сопутствующие заболевания, питание, географические условия и др. [3; 22–25].

В настоящем исследовании в составе микробиоты пациентов выявлено статистически значимое увеличение относительной численности бактерий родов *Staphylococcus*, *Pseudomonas* и *Enterococcus* от

предтрансплантационного периода к 14-му и 30-му дням после ТГСК (FDR < 0,01) (табл. 2). Возрастание доли стафилококков в ранний посттрансплантационный период упоминалось и в работе Э. Илетт с соавторами [14]. Кроме того, положительные значения \log_2 FoldChange установлены для родов *Stenotrophomonas* и *Lactococcus*. Между точкой до ТГСК и 100-м днем после трансплантации изменялась доля представителей рода *Klebsiella* (FDR < 0,01).

Таблица 2

Значения \log_2 FoldChange представленности таксонов бактерий в микробиоте пациентов между точкой до ТГСК и 14, 30, 100-м днями после трансплантации

Table 2

\log_2 FoldChange in the relative abundance of bacterial taxa in the microbiota of patients between the point before H SCT and 14, 30, 100th days after transplantation

Род	Значение \log_2 FoldChange		
	между точкой до ТГСК и 14-м днем после трансплантации	между точкой до ТГСК и 30-м днем после трансплантации	между точкой до ТГСК и 100-м днем после трансплантации
<i>Staphylococcus</i>	5,47	8,19	–
<i>Pseudomonas</i>	8,23	12,88	–
<i>Enterococcus</i>	3,63	4,43	–
<i>Stenotrophomonas</i>	9,74	–	–
<i>Lactococcus</i>	–	3,91	–
<i>Klebsiella</i>	–	–	6,73

Колонизация кишечника пациентов бактериями рода *Stenotrophomonas*, в частности видом *S. maltophilia*, может быть связана с пребыванием в онкологическом отделении и терапией после ТГСК. К факторам риска заселения кишечного тракта бактериями *S. maltophilia* относят тяжелый мукозит и нейтропению, длительную терапию и прием антибиотиков [26–28]. Исследуемые пациенты входили в группу риска, так как перед трансплантацией им назначалась интенсивная химио- и антибиотикотерапия, что приводило к фебрильной нейтропении, а у 3 пациентов был диагностирован мукозит. Колонизация кишечника бактериями *S. maltophilia* отмечена у 8 из 32 пациентов. Увеличение доли данных бактерий происходило в ранний период после ТГСК, а к 100-му дню их численность снижалась.

Доля бактерий рода *Klebsiella* также повышалась после ТГСК. Высокая численность клебсиелл (0,3–99,9 %) на 100-й день наблюдалась у 6 пациентов, из них у 4 пациентов до ТГСК клебсиеллы не детектировались, а у 2 пациентов занимали малую долю (<0,01 %). Лишь у 1 пациента бактерии рода *Klebsiella* до ТГСК выявлялись в количестве 1,7 % от всех прочтений, а через 100 дней после трансплантации не обнаруживались. Таким образом, вероятно, клебсиеллы попадали в организм пациентов во время нахождения в лечебном отделении.

Для выявления связи между изменением представленности определенных таксонов бактерий в кишечном микробиоме реципиентов ТГСК и развитием РТПХ были изучены различия в количестве прочтений генов 16S рРНК на разных таксономических уровнях у пациентов с данным осложнением и без него. Установлено, что осложнения различной степени тяжести развивались у пациентов, в микробиоме которых до ТГСК была повышена доля представителей отдела Proteobacteria, семейств Actinomycetaceae и Streptococcaceae, а также рода *Streptococcus* (табл. 3).

Представители отдела Proteobacteria у пациентов без осложнений занимали до 22,72 % прочтений с медианой 0,55 %, а у пациентов с РТПХ – до 59,89 % с медианой 3,25 % (рис. 4). Стоит отметить, что протеобактерии часто чрезмерно представлены при кишечных и внекишечных заболеваниях, сопровождающихся воспалительным процессом [29]; связь бактерий отдела Proteobacteria с развитием РТПХ отмечалась и ранее [16; 30]. Рядом исследователей показано, что увеличение доли протеобактерий коррелирует со снижением соотношения лимфоцитов T_{reg}/T_h17 [16], первые из которых обладают противовоспалительной активностью, а вторые опосредованно стимулируют выработку антимикробных пептидов эпителиальными клетками кишечника [31; 32]. Таким образом, повышенная численность бактерий отдела Proteobacteria в кишечнике увеличивает риск инфекционных осложнений.

Таблица 3

Таксоны в составе кишечного микробиома пациентов, доля которых была повышена у пациентов с РТПХ (FDR < 0,01)

Table 3

Taxa of the patients' intestinal microbiome, which show increased relative abundance in patients with graft-versus-host disease (FDR < 0.01)

Таксон	Значение \log_2 FoldChange
Proteobacteria	3,72
Actinomycetaceae	3,01
Streptococcaceae	4,47
<i>Streptococcus</i>	3,44

Семейство Actinomycetaceae в микробиоме пациентов без РТПХ составляло до 0,48 % прочтений с медианой 0,02 %, в то время как у пациентов с РТПХ на данный таксон приходилось от 0,01 до 0,94 % с медианой 0,06 % (см. рис. 4). Стоит отметить, что полученные авторами результаты противоречат ряду исследований, продемонстрировавших уменьшение доли бактерий семейства Actinomycetaceae у пациентов с оРТПХ [33]. В то же время показано, что высокое содержание в микробиоме бактерий γ -Proteobacteria положительно коррелирует со смертельным исходом, а высокая относительная численность бактерий Lachnospiraceae и Actinomycetaceae – с благоприятным исходом ТГСК [3]. За время наблюдения летальный исход зафиксирован у 6 пациентов, однако ни у одного из них смерть не была связана с развитием РТПХ.

Доля прочтений, приходящихся на семейство Streptococcaceae, у пациентов без РТПХ колебалась от 0,10 до 4,71 % с медианой 0,98 %, а у пациентов с РТПХ – от 0,14 до 81,79 % с медианой 8,19 %. На род *Streptococcus* у пациентов с РТПХ приходилось от 0,09 до 79,39 % с медианой 6,56 % (см. рис. 4). Доминирование стрептококков в составе микробиоты пациентов после трансплантации является достаточно распространенным и считается одной из наиболее частых причин инфекций кровотока после ТГСК [34].

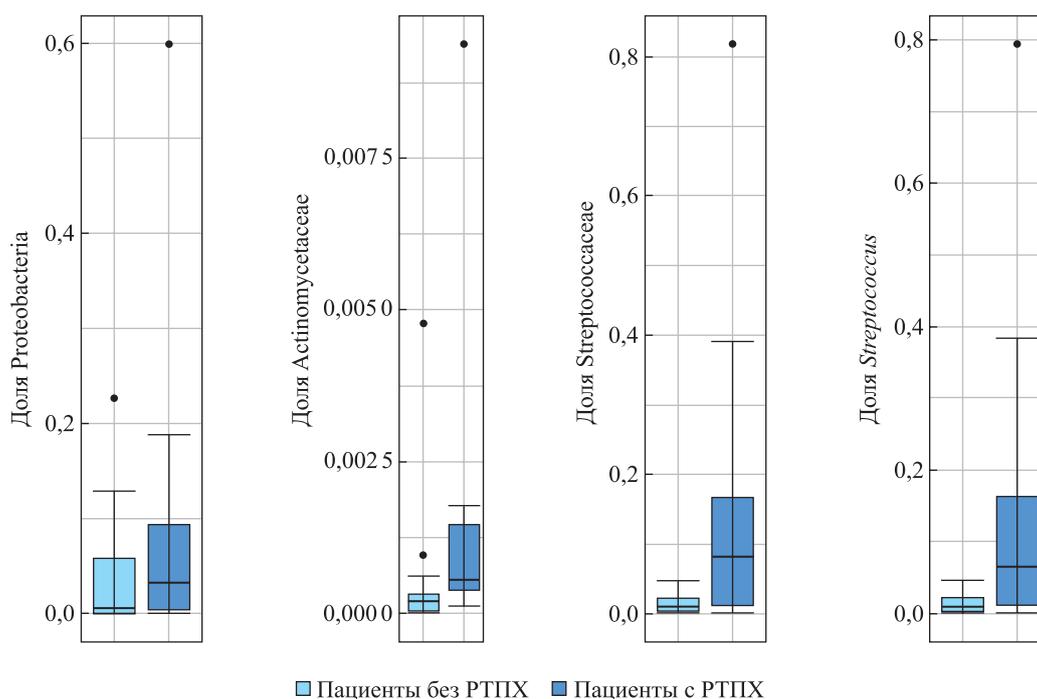


Рис. 4. Различия в представленности отдельных таксонов бактерий в кишечном микробиоме пациентов без РТПХ и пациентов с РТПХ

Fig. 4. Differences in given taxa abundance in patients with and without graft-versus-host disease

На основании представленных данных можно предположить, что высокая относительная численность бактерий отдела Proteobacteria, семейств Actinomycetaceae и Streptococcaceae, рода *Streptococcus* в микробиоте кишечника пациентов до ТГСК может рассматриваться как потенциальный биомаркер развития РТПХ, однако для подтверждения данной гипотезы необходимы дальнейшие исследования на большей выборке пациентов.

На фоне присутствия перечисленных бактериальных таксонов в повышенном количестве у пациентов с РТПХ было снижено содержание представителей отделов Verrucomicrobia и Desulfobacterota, семейств Acidaminococcaceae, Akkermansiaceae, Desulfovibrionaceae и Prevotellaceae, родов *Clostridioides*, *Phascolarctobacterium*, *Bilophila*, *Akkermansia*, *Paraprevotella*, *Coproccoccus*, *Sutterella*, *Alistipes*, *Oscillospiraceae* NK4A214 и *Eubacterium siraeum*.

Представители семейства Acidaminococcaceae, и в частности рода *Phascolarctobacterium*, являются продуцентами пропионовой кислоты [35], снижение их численности отмечено у пациентов с колоректальным раком [36].

Представители семейства Akkermansiaceae являются продуцентами короткоцепочечных жирных кислот и широко распространены в микробиоте кишечника здоровых людей. Снижение содержания бактерий данного семейства и непосредственно рода *Akkermansia* отмечали при сахарном диабете, синдроме раздраженного кишечника, гипертонии, ожирении, болезнях печени [37–42]. В настоящее время род *Akkermansia* включают в перечень микроорганизмов, которые в перспективе можно использовать в качестве альтернативы противовоспалительной и иммуносупрессивной терапии [43].

Влияние бактерий семейства Prevotellaceae на здоровье человека пока считается неоднозначным. Повышенную долю представителей семейства Prevotellaceae связывают с пародонтитом, бактериальным вагинозом, системным воспалением, ревматоидным артритом и метаболическими нарушениями. Имеются сведения, что воспаление слизистых, опосредованное превотеллой, приводит к системному распространению медиаторов воспаления, что может влиять на исход системных заболеваний [44]. В то же время показано, что представители семейства Prevotellaceae продуцируют короткоцепочечные жирные кислоты, нехватка которых является причиной повышенной проницаемости кишечника [45]. Род *Paraprevotella* – один из четырех родов семейства Prevotellaceae, для которого характерна продукция короткоцепочечных жирных кислот. В 2019 г. Т. Танэ с соавторами установил, что бактерии рода *Paraprevotella* индуцируют выработку γ -интерферона Т-клетками, не вызывая воспаления, опосредованного дендритными CD103⁺-клетками и главным комплексом гистосовместимости. Данный интерферон играет решающую роль в противоопухолевом иммунитете и повышает эффективность применения ингибиторов иммунных контрольных точек [46].

Таким образом, снижение доли ряда семейств (Acidaminococcaceae, Akkermansiaceae, Prevotellaceae) и родов (*Clostridioides*, *Phascolarctobacterium*, *Paraprevotella*, *Akkermansia*, *Alistipes* и др.) кишечной микробиоты может влиять на иммунную систему, метаболический и функциональный статус желудочно-кишечного тракта пациентов с РТПХ. Воздействие конкретных представителей микробиоты на статус пациентов с онкогематологическими заболеваниями требует дальнейшего изучения.

Следует отметить, что данное исследование ограничено небольшой выборкой пациентов с онкогематологическими заболеваниями, перенесших ТГСК, которые относились к разным возрастным группам (2–29 лет), имели различный диагноз (острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, приобретенная апластическая анемия, неходжкинская лимфома и др.) и сопутствующие заболевания, проходили лечение в условиях стационарного отделения одного медицинского учреждения. Каждый из этих факторов может влиять на качественный и количественный состав микробиоты кишечника и отчасти являться причиной отличия представленных результатов от данных, полученных другими исследовательскими группами. В связи с этим желательнее дальнейшее детальное изучение динамики изменения кишечной микробиоты реципиентов ТГСК на более репрезентативных и гомогенных группах пациентов для разработки диагностических маркеров РТПХ и способов коррекции дисбиотических состояний в целях профилактики посттрансплантационных осложнений.

Заключение

Исследована динамика восстановления кишечной микробиоты пациентов с онкогематологическими заболеваниями в ранние сроки после ТГСК. Выявлено, что изменения кишечного микробиоценоза пациентов носят индивидуальный характер, различия в таксономическом составе микроорганизмов более выражены в ранний период после трансплантации (14-й и 30-й дни). Настоящее исследование подтверждает, что дисбиоз у реципиентов ТГСК проявляется снижением общего разнообразия микробиоты. Медиана обратного индекса Симпсона на 14-й день после трансплантации была в 4,5 раза ниже медианы данного индекса до ТГСК. Однако связи между биоразнообразием кишечной микробиоты и развитием

осложнений после трансплантации, а также режимом кондиционирования не установлено. До трансплантации в составе кишечной микробиоты пациентов доминировали семейства Lachnospiraceae, Bacteroidaceae, Enterococcaceae, Ruminococcaceae, Streptococcaceae, Enterobacteriaceae, Peptostreptococcaceae. На 14-й день после ТГСК биоразнообразие было наименьшим, преобладали семейства Enterococcaceae, Bacteroidaceae, Streptococcaceae, Lactobacillaceae. Через 100 дней после трансплантации α -разнообразие микробиоты приближалось к предтрансплантационному уровню, детектировались таксоны, характерные для периода до трансплантации (Erysipelatoclostridiaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae).

Обнаружена связь между развитием посттрансплантационных осложнений и изменением относительной численности бактерий 3 отделов (Proteobacteria, Verrucomicrobia, Desulfobacterota), 6 семейств (Streptococcaceae, Actinomycetaceae, Acidaminococcaceae, Akkermansiaceae, Desulfovibrionaceae, Prevotellaceae) и 11 родов (*Streptococcus*, *Clostridioides*, *Phascolarctobacterium*, *Paraprevotella*, *Bilophila*, *Akkermansia*, *Coprococcus*, *Sutterella*, *Alistipes*, *Oscillospiraceae* NK4A214, *Eubacterium siraeum*) в кишечном микробиоме реципиентов ТГСК. Сделано предположение, что повышенная относительная численность представителей отдела Proteobacteria, семейств Actinomycetaceae и Streptococcaceae, рода *Streptococcus* до ТГСК может являться потенциальным биомаркером развития РТПХ.

Библиографические ссылки / References

1. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *The Lancet*. 2009;373(9674):1550–1561. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60237-3.
2. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *The New England Journal of Medicine*. 2012;367:1487–1496. DOI: 10.1056/NEJMoa1203517.
3. Taur Y, Jenq RR, Perales M-A, Littmann ER, Morjaria S, Ling L, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2014;124(7):1174–1182. DOI: 10.1182/blood-2014-02-554725.
4. Peled JU, Gomes ALC, Devlin SM, Littmann ER, Taur Ying, Sung AD, et al. Microbiota as predictor of mortality in allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *The New England Journal of Medicine*. 2020;382:822–834. DOI: 10.1056/NEJMoa1900623.
5. Shono Y, Docampo MD, Peled JU, Perobelli SM, Jenq RR. Intestinal microbiota-related effects on graft-versus-host disease. *International Journal of Hematology*. 2015;101:428–437. DOI: 10.1007/s12185-015-1781-5.
6. Bekker V, Zwiittink RD, Knetsch CW, Sanders IMJG, Berghuis D, Heidt PJ, et al. Dynamics of the gut microbiota in children receiving selective or total gut decontamination treatment during hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2019;25(6):1164–1171. DOI: 10.1016/j.bbmt.2019.01.037.
7. Golob JL, Pergam SA, Srinivasan S, Fiedler TL, Liu C, Garcia K, et al. Stool microbiota at neutrophil recovery is predictive for severe acute graft vs host disease after hematopoietic cell transplantation. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;65(12):1984–1991. DOI: 10.1093/cid/cix699.
8. McLaren MR. Silva SSU taxonomic training data formatted for DADA2 (Silva version 138) [Internet]. Geneva: CERN; 2020 March 27 [cited 2022 February 20]. Available from: <https://zenodo.org/record/3731176#.YrK8unZByUk>. DOI: 10.5281/zenodo.3731176.
9. Simpson EH. Measurement of diversity. *Nature*. 1949;163(4148):688. DOI: 10.1038/163688a0.
10. Wilcoxon F. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bulletin*. 1945;1:80–83. DOI: 10.2307/3001968.
11. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289–300.
12. Mancini N, Greco R, Pasciuta R, Barbanti MC, Pini G, Morrow OB, et al. Enteric microbiome markers as early predictors of clinical outcome in allogeneic hematopoietic stem cell transplant: results of a prospective study in adult patients. *Open Forum Infectious Diseases*. 2017;4(4):ofx215. DOI: 10.1093/ofid/ofx215.
13. Ingham AC, Kielsen K, Cilieborg MS, Lund O, Holmes S, Aarestrup FM, et al. Specific gut microbiome members are associated with distinct immune markers in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Microbiome*. 2019;7(1):131. DOI: 10.1186/s40168-019-0745-z.
14. Ilett EE, Jørgensen M, Noguera-Julian M, Nørgaard JC, Daugaard G, Helleberg M, et al. Associations of the gut microbiome and clinical factors with acute GVHD in allogeneic HSCT recipients. *Blood Advances*. 2020;4(22):5797–5809. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020002677.
15. Han L, Zhang H, Chen S, Zhou L, Li Y, Zhao K, et al. Intestinal microbiota can predict acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2019;25(10):1944–1955. DOI: 10.1016/j.bbmt.2019.07.006.
16. Han L, Jin H, Zhou L, Zhang X, Fan Z, Dai M, et al. Intestinal microbiota at engraftment influence acute graft-versus-host disease via the T_{reg}/T_H17 balance in allo-HSCT recipients. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:669. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00669.
17. Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, Menezes CC, Khanin R, Dudakov JA, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *Journal of Experimental Medicine*. 2012;209(5):903–911. DOI: 10.1084/jem.20112408.
18. Laterza L, Rizzatti G, Gaetani E, Chiusolo P, Gasbarrini A. The gut microbiota and immune system relationship in human graft-versus-host disease. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 2016;8(1):e2016025. DOI: 10.4084/MJHID.2016.025.
19. Kouidhi S, Souai N, Zidi O, Mosbah A, Lakhali A, Othmane TB, et al. High throughput analysis reveals changes in gut microbiota and specific fecal metabolomic signature in hematopoietic stem cell transplant patients. *Microorganisms*. 2021;9(9):1845. DOI: 10.3390/microorganisms9091845.
20. Akhremchuk KV, Skapavets KY, Akhremchuk AE, Kirsanova NP, Sidarenka AV, Valentovich LN. Gut microbiome of healthy people and patients with hematological malignancies in Belarus. *Microbiology Independent Research Journal (MIR Journal)*. 2022;9(1):18–30. DOI: 10.18527/2500-2236-2022-9-1-18-30.

21. Jenq RR, Taur Y, Devlin SM, Ponce DM, Goldberg JD, Ahr KF, et al. Intestinal *Blautia* is associated with reduced death from graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(8):1373–1383. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.04.016.
22. Chen J, Ryu E, Hathcock M, Ballman K, Chia N, Olson JE, et al. Impact of demographics on human gut microbial diversity in a US Midwest population. *PeerJ*. 2016;4:e1514. DOI: 10.7717/peerj.1514.
23. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H, et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterology*. 2015;15:100. DOI: 10.1186/s12876-015-0330-2.
24. Yi M, Yu S, Qin S, Liu Q, Xu H, Zhao W, et al. Gut microbiome modulates efficacy of immune checkpoint inhibitors. *Journal of Hematology & Oncology*. 2018;11(1):47. DOI: 10.1186/s13045-018-0592-6.
25. Shono Y, Docampo MD, Peled JU, Perobelli SM, Velardi E, Tsai JJ, et al. Increased GVHD-related mortality with broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice. *Science Translational Medicine*. 2016;8(339):339ra71. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf2311.
26. Apisarnthanarak A, Fraser VJ, Dunne WM, Little JR, Hoppe-Bauer J, Mayfield JL, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* intestinal colonization in hospitalized oncology patients with diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(8):1131–1135. DOI: 10.1086/378297.
27. Labarca JA, Leber AL, Kern VL, Territo MC, Brankovic LE, Bruckner DA, et al. Outbreak of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in allogeneic bone marrow transplant patients: role of severe neutropenia and mucositis. *Clinical Infectious Diseases*. 2000;30(1):195–197. DOI: 10.1086/313591.
28. Apisarnthanarak A, Mayfield JL, Garison T, McLendon PM, DiPersio JF, Fraser VJ, et al. Risk factors for *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in oncology patients: a case-control study. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2003;24(4):269–274. DOI: 10.1086/502197.
29. Rizzatti G, Lopetusu LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: a common factor in human diseases. *BioMed Research International*. 2017;2017:9351507. DOI: 10.1155/2017/9351507.
30. Lähteenmäki K, Wacklin P, Taskinen M, Tuovinen E, Lohi O, Partanen J, et al. Haematopoietic stem cell transplantation induces severe dysbiosis in intestinal microbiota of paediatric ALL patients. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52:1479–1482. DOI: 10.1038/bmt.2017.168.
31. Lazar V, Ditu L-M, Pircalabioru GG, Gheorghe I, Curutiu C, Holban AM, et al. Aspects of gut microbiota and immune system interactions in infectious diseases, immunopathology, and cancer. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:1830. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01830.
32. Gaboriau-Routhiau V, Cerf-Bensussan N. [Gut microbiota and development of the immune system]. *Medecine Sciences (Paris)*. 2016;32(11):961–967. French. DOI: 10.1051/medsci/20163211011.
33. Lin D, Hu B, Li P, Zhao Y, Xu Y, Wu D. Roles of the intestinal microbiota and microbial metabolites in acute GVHD. *Experimental Hematology & Oncology*. 2021;10:49. DOI: 10.1186/s40164-021-00240-3.
34. Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;55(7):905–914. DOI: 10.1093/cid/cis580.
35. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*. 2017;19(1):29–41. DOI: 10.1111/1462-2920.13589.
36. Youssef O, Lahti L, Kokkola A, Karla T, Tikkanen M, Ehsan H, et al. Stool microbiota composition differs in patients with stomach, colon, and rectal neoplasms. *Digestive Diseases and Sciences*. 2018;63:2950–2958. DOI: 10.1007/s10620-018-5190-5.
37. Hänninen A, Toivonen R, Pöysti S, Belzer C, Plovier H, Ouwerkerk JP, et al. *Akkermansia muciniphila* induces gut microbiota remodelling and controls islet autoimmunity in NOD mice. *Gut*. 2018;67(8):1445–1453. DOI: 10.1136/gutjnl-2017-314508.
38. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nature Medicine*. 2017;23(1):107–113. DOI: 10.1038/nm.4236.
39. Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI, et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment *in vitro* utilization of mucin by other bacteria. *The American Journal of Gastroenterology*. 2010;105(11):2420–2428. DOI: 10.1038/ajg.2010.281.
40. Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nature Medicine*. 2019;25(7):1096–1103. DOI: 10.1038/s41591-019-0495-2.
41. Belzer C, de Vos WM. Microbes inside – from diversity to function: the case of *Akkermansia*. *The ISME Journal*. 2012;6(8):1449–1458. DOI: 10.1038/ismej.2012.6.
42. Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, et al. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One*. 2013;8(8):e71108. DOI: 10.1371/journal.pone.0071108.
43. van der Lelie D, Oka A, Taghavi S, Umeno J, Fan T-J, Merrell KE, et al. Rationally designed bacterial consortia to treat chronic immune-mediated colitis and restore intestinal homeostasis. *Nature Communications*. 2021;12:3105. DOI: 10.1038/s41467-021-23460-x.
44. Larsen JM. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*. 2017;151(4):363–374. DOI: 10.1111/imm.12760.
45. Liu X, Lieberman J. Chapter three – a mechanistic understanding of pyroptosis: the fiery death triggered by invasive infection. In: Alt FW, editor. *Advances in immunology. Volume 135*. Cambridge: Academic Press; 2017. p. 81–117. DOI: 10.1016/bs.ai.2017.02.002.
46. Tanoue T, Morita S, Plichta DR, Skelly AN, Suda W, Sugiura Y, et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature*. 2019;565(7741):600–605. DOI: 10.1038/s41586-019-0878-z.

Получена 29.04.2022 / исправлена 20.05.2022 / принята 23.05.2022.
Received 29.04.2022 / revised 20.05.2022 / accepted 23.05.2022.

УДК 579.22

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *PRIESTIA MEGATERIUM* Cp-1 И *RHODOCOCCUS JOSTII* CA-6, УСТОЙЧИВЫХ К СОЛЕВОМУ СТРЕССУ

Н. И. НАУМОВИЧ¹⁾, З. М. АЛЕЩЕНКОВА¹⁾,
И. Н. АНАНЬЕВА¹⁾, Г. В. САФРОНОВА¹⁾

¹⁾Институт микробиологии НАН Беларуси,
ул. Академика Купревича, 2, 220141, г. Минск, Беларусь

Показано, что штаммы *Priestia megaterium* Cp-1 и *Rhodococcus jostii* CA-6 сохраняют способность к фосфат-солюбилизации, азотфиксации и синтезу индолил-3-уксусной кислоты в условиях осмотического стресса, вызванного хлоридом натрия в диапазоне концентраций 1197–2052 ммоль/л, а также положительно влияют на всхожесть семян и развитие проростков редиса розово-красного. Установлено, что пролин, бетаин и сахароза оказывают положительный эффект на рост штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 и их способность адаптироваться к осмотическому стрессу. В ходе масс-спектрометрического анализа выявлено, что внутриклеточное образование пролина и бетаина у исследованных бактерий пропорционально связано с концентрацией хлорида натрия: при увеличении содержания NaCl в среде до 1197 ммоль/л уровень пролина повышается с 0,062 до 1,502 мкг/мл (*Rh. jostii* CA-6) и с 0,089 до 2,105 мкг/мл (*P. megaterium* Cp-1), а уровень бетаина – с 0,071 до 0,118 мкг/мл (*Rh. jostii* CA-6) и с 0,055 до 0,219 мкг/мл (*P. megaterium* Cp-1).

Ключевые слова: азотфиксация; фосфатсолюбилизация; ростостимуляция; осмолиты; солевой стресс.

CHARACTERISTIC OF STRAINS *PRIESTIA MEGATERIUM* Cp-1 AND *RHODOCOCCUS JOSTII* CA-6 DEMONSTRATING INCREASED SALT RESISTANCE

N. I. NAUMOVICH^a, Z. M. ALESCHENKOVA^a,
I. N. ANANYEVA^a, H. V. SAFRONAVA^a

^aInstitute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus,
2 Akademika Kupreviča Street, Minsk 220141, Belarus
Corresponding author: N. I. Naumovich (naumovichnadezda@yandex.ru)

The strains *Priestia megaterium* Cp-1 and *Rhodococcus jostii* CA-6 were shown to preserve phosphate-solubilising ability, nitrogen-fixing activity and synthesis of indole-3-acetic acid under osmotic stress conditions caused by sodium

Образец цитирования:

Наумович НИ, Алещенкова ЗМ, Ананьева ИН, Сафронова ГВ. Характеристика штаммов *Priestia megaterium* Cp-1 и *Rhodococcus jostii* CA-6, устойчивых к солевому стрессу. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;2:60–72. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-60-72>

For citation:

Naumovich NI, Aleschenkova ZM, Ananyeva IN, Safronava HV. Characteristic of strains *Priestia megaterium* Cp-1 and *Rhodococcus jostii* CA-6 demonstrating increased salt resistance. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;2:60–72. Russian. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-60-72>

Авторы:

Надежда Ивановна Наумович – научный сотрудник лаборатории взаимоотношений микроорганизмов почвы и высших растений.

Зинаида Михайловна Алещенкова – доктор биологических наук; главный научный сотрудник лаборатории взаимоотношений микроорганизмов почвы и высших растений.

Ирина Николаевна Ананьева – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией взаимоотношений микроорганизмов почвы и высших растений.

Галина Владимировна Сафронова – кандидат биологических наук, доцент; ведущий научный сотрудник лаборатории взаимоотношений микроорганизмов почвы и высших растений.

Authors:

Nadezhda I. Naumovich, researcher at the laboratory of interactions between soil microorganisms and higher plants. naumovichnadezda@yandex.ru

Zinaida M. Aleschenkova, doctor of science (biology); chief researcher at the laboratory of interactions between soil microorganisms and higher plants.

z_aleschenkova@tut.by

Irina N. Ananyeva, PhD (biology), docent; head of the laboratory of interactions between soil microorganisms and higher plants.

ananeva@mbio.bas-net.by

Halina V. Safronava, PhD (biology), docent; leading researcher at the laboratory of interactions between soil microorganisms and higher plants.

hsafronava@mail.ru

chloride in concentration range of 1197–2052 mmol/L, as well as to promote seed germination rate and development of small radish seedlings. Proline, betaine and sucrose were found to exert a beneficial effect on growth and ability of strains *P. megaterium* Cp-1 and *Rh. jostii* CA-6 to adapt to osmotic stress. Mass spectrometric analysis has revealed that intracellular synthesis of proline and betaine in both bacteria was directly proportional to sodium chloride concentration: rising NaCl level in the medium to 1197 mmol/L was accompanied by increase in proline level from 0.062 to 1.502 µg/mL (*Rh. jostii* CA-6) and from 0.089 to 2.105 µg/mL (*P. megaterium* Cp-1), in a similar manner betaine production grew up from 0.071 to 0.118 µg/mL (*Rh. jostii* CA-6) and from 0.055 to 0.219 µg/mL (*P. megaterium* Cp-1).

Keywords: nitrogen fixation; phosphate solubilisation; growth stimulation; osmolytes; salt-induced stress.

Введение

Высокое содержание солей в почве является серьезным экологическим стрессом, который негативно влияет на биологическую активность почвы и рост растений. Для минимизации отрицательного воздействия абиотических факторов окружающей среды на растения активно применяются микроорганизмы, способные стимулировать рост растений в условиях засоления [1].

Солеустойчивые микроорганизмы используют различные механизмы адаптации к осмотическому стрессу, положительно влияющие на рост и развитие растений. К ним относят обеспечение растений питательными веществами посредством азотфиксации, фосфатсолубилизации, синтеза осмопротекторов различной химической природы [2; 3]. Использование солеустойчивых ростостимулирующих ризобактерий в фиторемедиации агроэкосистем, страдающих от высокой концентрации солей в почве, указывает на их огромный потенциал [4].

В связи с вышеизложенным особый интерес представляют бактерии рода *Priestia* и рода *Rhodococcus*, которые широко распространены в экстремальных экосистемах и характеризуются высокой адаптивной способностью [5]. Ранее авторами были выделены и идентифицированы ростостимулирующий азотфиксирующий штамм *Rh. jostii* CA-6 и ростостимулирующий фосфатсолубилизирующий штамм *P. megaterium* Cp-1, растущие на среде, содержащей хлорид натрия в концентрации 2052 и 2565 ммоль/л соответственно. Данные штаммы перспективны для использования в технологии биоремедиации засоленных почв и улучшения роста растений в условиях солевого стресса [6].

Цель настоящей работы – изучить сохранность агрономически ценных свойств солеустойчивых бактерий *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 и их способность синтезировать осмолиты в условиях засоления.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись бактериальные штаммы *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6, выделенные из образцов почвы, отобранной на территории ОАО «Беларуськалий». Как указывалось выше, они способны расти на среде, содержащей 2565 ммоль/л (15 %) и 2052 ммоль/л (12 %) NaCl соответственно. Штаммы были идентифицированы с помощью секвенирования фрагмента гена 16S рРНК и масс-спектрометрии MALDI-TOF и депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под регистрационными номерами БИМ В-1314Д (*P. megaterium* Cp-1) и БИМ В-1353Д (*Rh. jostii* CA-6) [6].

Физиолого-биохимические свойства исследуемых штаммов изучены с использованием автоматического бактериологического анализатора VITEK[®] 2 Compact (*BioMérieux*, Франция) и тест-системы Mikrolatest (*Erba Lachema*, Германия) для идентификации микроорганизмов. Каталазную и оксидазную активность штаммов определяли согласно методике, изложенной в работе [7]. Окраску бактериальных штаммов осуществляли по Граму [7], микроскопирование проводили с помощью микроскопа Nikon E200 (*Nikon*, Япония).

В работе использовали следующие концентрации хлорида натрия, ммоль/л: 171 (1 %), 342 (2 %), 513 (3 %), 855 (5 %), 1197 (7 %), 1710 (10 %), 2052 (12 %).

Действие бактериальных штаммов *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 на всхожесть семян, рост и развитие проростков редиса розово-красного (*Raphanus sativus* var. *radicula*) в условиях засоления изучали с применением методов, изложенных в работе [8]. Семена контрольных растений замачивали в стерильной водопроводной воде, семена опытных растений – в 2 % растворе культуральной жидкости (КЖ), полученном путем внесения 2 мл КЖ в 98 мл стерильной водопроводной воды. Саму КЖ получали отдельным культивированием исследуемых штаммов в среде LB при скорости вращения лабораторной качалки (200 ± 20) об/мин и температуре (28 ± 2) °C в течение 48 ч. В чашках с контрольными образцами фильтровальную бумагу увлажняли стерильной водопроводной водой, в чашках с опытными образцами – раствором хлорида натрия в концентрации 171–855 ммоль/л.

Влияние хлорида натрия на способность штаммов синтезировать индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) исследовали в процессе культивирования штаммов в течение 48 ч в жидкой среде LB [9, р. 1335–1885], содержащей 0,1 % триптофана и 1197; 1710; 2052 ммоль/л хлорида натрия. Концентрацию ИУК определяли колориметрическим методом при длине волны 530 нм путем сравнения оптической плотности образцов со стандартной кривой, полученной при измерении оптической плотности раствора, содержащего ИУК в концентрации 10–100 мкг/мл [10].

Активность растворения фосфатов кальция в условиях засоления определяли в жидкой среде NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) [11], содержащей 5 г/л $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и 1197; 1710; 2052 ммоль/л NaCl, по методу, изложенному в работах [12; 13], с использованием спектрофотометра РВ 2201А (SOLAR, Беларусь) при длине волны 540 нм. Концентрацию растворимого фосфора определяли путем сравнения оптической плотности исследуемых образцов со стандартной кривой, полученной при измерении оптической плотности раствора, содержащего KH_2PO_4 в концентрации 2; 4; 8; 12; 20; 30 мкг/мл [13].

Азотфиксирующую активность штамма *Rh. jostii* СА-6 в условиях осмотического стресса, вызванного хлоридом натрия, измеряли ацетиленовым методом на газовом хроматографе Хромос ГХ-1000 (Хромос Инжиниринг, Россия) [14].

Влияние осмолитов различной химической природы на рост солеустойчивых штаммов изучали путем культивирования их в жидкой среде М9 [7], содержащей пролин, бетаин и сахарозу в концентрации 1 ммоль/л и хлорид натрия в концентрации 1197; 1710 и 2052 ммоль/л, в течение 72 ч с последующим высевом на поверхность плотной среды LB для определения титра жизнеспособных клеток [15].

Содержание пролина и бетаина в клетках определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1200 с масс-селективным детектором типа «тройной квадруполь» Agilent 6410 (Agilent Technologies Inc., США). Бактериальную биомассу штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* СА-6 получали путем культивирования в среде М9, содержащей 1197 ммоль/л хлорида натрия, с последующим центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 5 мин. Полученную бактериальную биомассу разрушали с помощью ультразвука и фильтровали через шприцевый мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы с размером пор 0,45 мкм. ВЭЖХ проводили с использованием колонки Agilent Zorbax XDB-C18 (4,6 × 150 мм, 5 мкм) с температурой 40 °С в 0,1 % растворе трифторуксусной кислоты в деионизированной воде при скорости потока 0,5 мл/мин. Для количественного анализа бетаина и пролина осуществляли мониторинг заданных реакций (MRM) в режиме генерации положительных ионов при следующих переходах:

- m/z 118 → m/z 59 (бетаин);
- m/z 116 → m/z 70 (пролин).

В обоих случаях напряжение на фрагменторе и энергия в ячейке соударений составляли 100 и 20 В соответственно. Для построения калибровочной кривой использовали растворы пролина (Acros Organics, США) и бетаина (Беллехимкомплект, Беларусь) в деионизированной воде в диапазоне концентраций от 0,02 до 2,00 мкг/мл. Количественный анализ хроматограмм проводили с применением программного обеспечения Agilent MassHunter Workstation (версия В.01.03) (Agilent Technologies Inc.).

Статистическую обработку результатов осуществляли в программе Microsoft Excel 2016. Данные представлены в виде средних арифметических величин со среднестатистической ошибкой средних арифметических величин.

Результаты и их обсуждение

Использованные в работе штаммы *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* СА-6 обладают комплексом агрономически ценных свойств и способны переносить абиотический стресс, вызванный повышенным содержанием хлорида натрия и дефицитом влаги в среде [6].

Бактерии *P. megaterium* Cp-1 – грамположительные спорообразующие аэробные палочки размером 5–7 мкм (рис. 1, а). Они образуют белые, округлые, выпуклые, непрозрачные, с жирно-блестящим и волнисто-бахромчатым краем колонии, способны расти в присутствии 2565 ммоль/л NaCl, при росте на МПА и среде Кинга В не образуют флуоресцирующий пигмент.

Бактерии *Rh. jostii* СА-6 – неподвижные прямые и слегка изогнутые грамположительные не образующие спор аэробные палочки (рис. 1, б). Они образуют округлые, с валиком по краю, выпуклые, непрозрачные, матовые, с концентрическими кругами и гладким краем колонии с розовым оттенком, способны расти в присутствии 2052 ммоль/л NaCl.

Изучение физиолого-биохимических свойств солеустойчивых штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* СА-6 предполагало анализ их ферментативной и сахаролитической активности, а также устойчивости к антибиотикам и токсическим соединениям (табл. 1).

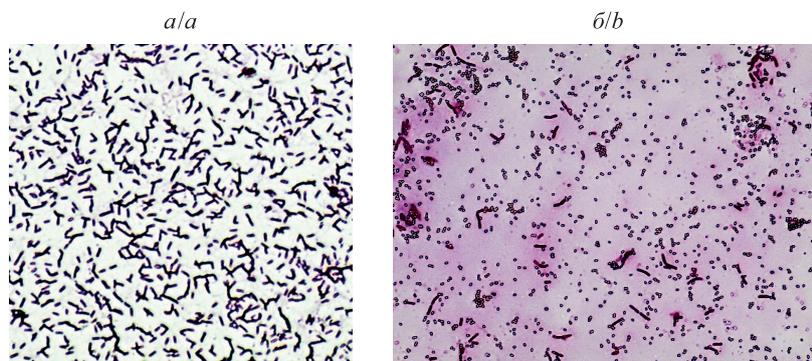


Рис. 1. Вид клеток штаммов *P. megaterium* Cp-1 (а) и *Rh. jostii* CA-6 (б) в световом микроскопе (увеличение $\times 1000$)

Fig. 1. The image of bacterial cells of *P. megaterium* Cp-1 (a) and *Rh. jostii* CA-6 (b) under light microscope (magnification $\times 1000$)

Таблица 1

Физиолого-биохимические свойства штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6

Table 1

Physiological-biochemical properties of strains *P. megaterium* Cp-1 and *Rh. jostii* CA-6

Вещество	Штамм	
	<i>P. megaterium</i> Cp-1	<i>Rh. jostii</i> CA-6
Ферментативная активность		
Аланин-фенилаланин-пролинариламидаза	–	–
Аланинариламидаза	–	+
Лейцинариламидаза	–	+
Тирозинариламидаза	–	+
L-пролинариламидаза	–	–
L-пирролидонилариламидаза	–	–
L-аспартатариламидаза	–	–
L-лизинариламидаза	–	–
α -Маннозидаза	–	–
β -Маннозидаза	–	–
α -Галактозидаза	+	+
β -Галактозидаза	+	+
α -Глюкозидаза	–	–
β -Галактопиранозидаза	+	–
β -Глюкоронидаза	–	–
β -Ксилозидаза	–	–
N-ацетил-D-глюкозамин	+	–
Аланиндигидролаза I	–	–
Аргининдигидролаза II	–	–
Уреаза	+	+
Фосфатидилинозитолфосфолипаза C	–	–
Алкализатор L-лактата	–	+
Метил-B-D-глюкопиранозидаза	+	–
Фосфатаза	+	+

Окончание табл. 1
 Ending table 1

Вещество	Штамм	
	<i>P. megaterium</i> Cp-1	<i>Rh. jostii</i> CA-6
Сахаролитическая активность		
D-амигдалин	–	–
D-глюкоза	–	–
D-рибоза	+	+
D-раффиноза	+	–
D-ксилоза	+	–
D-сорбитол	–	–
D-манитол	+	+
D-манноза	–	–
D-мальтоза	+	+
D-трегалоза	+	+
Лактоза	+	–
Сахароза	+	+
Циклодекстрин	–	–
Инозитол	+	+
Гликоген	+	–
Салицин	+	–
Устойчивость к антибиотикам и токсическим соединениям		
Новобиоцин	–	–
Оптохин	+	–
Полимиксин В	–	+
Бацитрацин	+	–
O129	–	–
Олеандомицин	–	–

Результаты изучения влияния осмотического стресса, вызванного содержанием хлорида натрия в среде в концентрации 1197; 1710 и 2052 ммоль/л, на азотфиксирующую активность (*Rh. jostii* CA-6) и фосфат-сольюбилизирующую способность (*P. megaterium* Cp-1), а также синтез ИУК исследуемыми штаммами приведены в табл. 2 и 3.

Таблица 2

Влияние осмотического стресса на азотфиксирующую активность и синтез ИУК штаммом *Rh. jostii* CA-6

Table 2

Effect of osmotic stress on nitrogen-fixing activity and synthesis of indole-3-acetic acid by the strain *Rh. jostii* CA-6

Концентрация NaCl, ммоль/л	Азотфиксирующая активность, нмоль/л этилена на флакон за 3 сут	Количество ИУК, мкг/мл
0 (контроль)	43,90 ± 0,14	37,80 ± 0,09
1197	35,60 ± 0,24	12,40 ± 0,12
1710	26,20 ± 0,29	12,10 ± 0,03
2052	21,00 ± 0,28	9,90 ± 0,11

Таблица 3

Влияние осмотического стресса на фосфатсольбилизирующую способность и синтез ИУК штаммом *P. megaterium* Cp-1

Table 3

Effect of osmotic stress on phosphate-solubilising ability and synthesis of IAA by the strain *P. megaterium* Cp-1

Концентрация NaCl, ммоль/л	Концентрация растворимого фосфора, мкг/мл	Количество ИУК, мкг/мл
0 (контроль)	65,00 ± 0,71	89,70 ± 0,05
1197	64,10 ± 0,43	22,90 ± 0,03
1710	36,60 ± 0,92	15,20 ± 0,06
2052	29,60 ± 0,06	11,40 ± 0,03

Установлено, что засоление, вызванное содержанием хлорида натрия в среде в диапазоне концентраций 1197–2052 ммоль/л, снижает фосфатсольбилизирующую способность, азотфиксирующую активность и синтез ИУК. У штамма *Rh. jostii* CA-6 в условиях засоления выявлено уменьшение азотфиксирующей активности с 43,9 до 21,0 нмоль/л C_2H_4 на флакон за 3 сут и количества ИУК с 37,8 до 9,9 мкг на 1 мл КЖ (см. табл. 2). Показано, что концентрация растворенного фосфора в КЖ штамма *P. megaterium* Cp-1 в условиях засоления снижается с 65,0 до 29,6 мкг/мл, а ИУК – с 89,7 до 11,4 мкг/мл (см. табл. 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые штаммы *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 сохраняют способность к фосфатсольбилизации, азотфиксации и синтезу ИУК в условиях осмотического стресса, вызванного хлоридом натрия.

В ходе дальнейшей работы изучено влияние осмолитов различной химической природы (пролин, бетаин и сахароза в концентрации 1 ммоль/л) на рост солеустойчивых штаммов *P. megaterium* Cp-1 (табл. 4) и *Rh. jostii* CA-6 (табл. 5) в условиях засоления, вызванного хлоридом натрия в диапазоне концентраций 1197–2052 ммоль/л.

Установлено, что при глубинном культивировании штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 в среде, содержащей хлорид натрия в концентрации 1197 ммоль/л, соединение не оказывает негативного эффекта. Максимальный титр жизнеспособных клеток штамма *P. megaterium* Cp-1 ($1,17 \cdot 10^8$ КОЕ/мл) достигается через 48 ч культивирования, а максимальный титр жизнеспособных клеток штамма *Rh. jostii* CA-6 ($2,60 \cdot 10^8$ КОЕ/мл) – через 72 ч.

При культивировании штамма *P. megaterium* Cp-1 в среде, содержащей 1197 ммоль/л NaCl и осмолиты пролин, бетаин или сахарозу, установлено, что через 48 ч роста титр клеток равен $1,09 \cdot 10^8$; $1,14 \cdot 10^8$; $1,14 \cdot 10^8$ КОЕ/мл соответственно. Полученные данные свидетельствуют, что клетки *P. megaterium* при низких концентрациях соли в среде способны самостоятельно справляться с осмотическим стрессом, так как осмолиты не оказывают на них стимулирующего влияния (см. табл. 4).

Увеличение числа жизнеспособных клеток *Rh. jostii* CA-6 отмечено при выращивании штамма в среде, содержащей 1197 ммоль/л хлорида натрия и 1 ммоль/л осмолитов. Максимальное число колониеобразующих единиц штамма *Rh. jostii* выявлено при культивировании в среде, содержащей пролин и сахарозу ($4,93 \cdot 10^8$ и $5,20 \cdot 10^8$ КОЕ/мл соответственно) (см. табл. 5).

При концентрации хлорида натрия в среде 1710 ммоль/л для штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 отмечается снижение титра клеток, особенно заметное в первые 24 ч, что свидетельствует о негативном влиянии осмотического шока на бактериальные клетки. Для обоих штаммов характерно уменьшение количества клеток до 10^5 КОЕ/мл через 24 ч культивирования и восстановление их титра до 10^6 КОЕ/мл на 2-е сутки. В процессе культивирования штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 в среде, содержащей осмолиты в концентрации 1 ммоль/л и хлорид натрия в концентрации 1710 ммоль/л, не наблюдается снижения численности бактерий через 24 ч по сравнению с контролем. При глубинном культивировании штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 в средах, содержащих осмолиты, происходит постепенное увеличение титра жизнеспособных клеток. Максимальный титр клеток (10^7 КОЕ/мл) отмечается на 3-е сутки культивирования.

При культивировании штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 в условиях осмотического стресса, вызванного хлоридом натрия в концентрации 2052 ммоль/л, титр клеток через 24 ч падает до 10^5 КОЕ/мл. У штамма *P. megaterium* Cp-1 через 72 ч культивирования титр клеток равен $4,80 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, а у штамма *Rh. jostii* CA-6 – $3,33 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Под действием осмолитов (пролин, бетаин или сахароза в концентрации 1 ммоль/л) численность популяции штамма *P. megaterium* Cp-1 через 72 ч культивирования в среде, содержащей 2052 ммоль/л NaCl, составляет $3,07 \cdot 10^6$; $3,13 \cdot 10^6$ и $3,07 \cdot 10^6$ КОЕ/мл соответственно, а численность популяции штамма *Rh. jostii* CA-6 – $4,07 \cdot 10^6$; $4,87 \cdot 10^6$ и $3,20 \cdot 10^6$ КОЕ/мл соответственно. Можно предположить, что осмолиты обеспечивают выживание клеток исследуемых штаммов бактерий в условиях повышенной минерализации.

Влияние осмолитов различной химической природы
на рост штамма *P. megaterium* Cp-1 при разных уровнях засоления

Table 4

Effect of different chemical osmolytes on growth
of strain *P. megaterium* Cp-1 exposed to diverse salinisation levels

Концентрация NaCl, ммоль/л	Время культивирования, ч	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл			
		Контроль	NaCl + 1 ммоль/л пролина	NaCl + 1 ммоль/л бетаина	NaCl + 1 ммоль/л сахарозы
1197	0	$(3,000 \pm 0,346) \cdot 10^6$	$(2,930 \pm 0,353) \cdot 10^6$	$(3,000 \pm 0,346) \cdot 10^6$	$(3,330 \pm 0,291) \cdot 10^6$
	24	$(5,200 \pm 0,462) \cdot 10^7$	$(5,470 \pm 0,481) \cdot 10^7$	$(6,000 \pm 0,231) \cdot 10^7$	$(5,930 \pm 0,231) \cdot 10^7$
	48	$(1,170 \pm 0,018) \cdot 10^8$	$(1,090 \pm 0,035) \cdot 10^8$	$(1,140 \pm 0,231) \cdot 10^8$	$(1,140 \pm 0,291) \cdot 10^8$
	72	$(1,130 \pm 0,066) \cdot 10^8$	$(1,120 \pm 0,031) \cdot 10^8$	$(1,170 \pm 0,406) \cdot 10^8$	$(1,180 \pm 0,416) \cdot 10^8$
1710	0	$(2,600 \pm 0,306) \cdot 10^6$	$(2,200 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(2,600 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(2,400 \pm 0,231) \cdot 10^6$
	24	$(5,200 \pm 0,611) \cdot 10^5$	$(4,400 \pm 0,462) \cdot 10^6$	$(4,800 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(2,730 \pm 0,291) \cdot 10^6$
	48	$(1,330 \pm 0,291) \cdot 10^6$	$(6,130 \pm 0,176) \cdot 10^7$	$(1,480 \pm 0,046) \cdot 10^7$	$(5,930 \pm 0,291) \cdot 10^7$
	72	$(1,330 \pm 0,133) \cdot 10^7$	$(2,400 \pm 0,115) \cdot 10^7$	$(5,670 \pm 0,240) \cdot 10^7$	$(4,930 \pm 0,481) \cdot 10^7$
2052	0	$(2,400 \pm 0,115) \cdot 10^6$	$(3,070 \pm 0,306) \cdot 10^6$	$(3,000 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(3,200 \pm 0,231) \cdot 10^6$
	24	$(3,200 \pm 0,200) \cdot 10^5$	$(2,730 \pm 0,176) \cdot 10^6$	$(2,400 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(2,400 \pm 0,231) \cdot 10^6$
	48	$(4,830 \pm 0,231) \cdot 10^5$	$(3,100 \pm 0,291) \cdot 10^6$	$(3,150 \pm 0,240) \cdot 10^6$	$(3,100 \pm 0,353) \cdot 10^6$
	72	$(4,800 \pm 0,231) \cdot 10^5$	$(3,070 \pm 0,291) \cdot 10^6$	$(3,130 \pm 0,240) \cdot 10^6$	$(3,070 \pm 0,353) \cdot 10^6$

Влияние осмолитов различной химической природы
на рост штамма *R. jostii* CA-6 при разных уровнях засоления

Effect of different chemical osmolytes on growth
of strain *R. jostii* CA-6 exposed to diverse salinisation levels

Концентрация NaCl, ммоль/л	Время культивирования, ч	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл			
		Контроль	NaCl + 1 ммоль/л пролина	NaCl + 1 ммоль/л бетанина	NaCl + 1 ммоль/л сахарозы
1197	0	$(2,870 \pm 0,467) \cdot 10^6$	$(2,800 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(2,800 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(2,530 \pm 0,353) \cdot 10^6$
	24	$(4,800 \pm 0,231) \cdot 10^7$	$(4,930 \pm 0,481) \cdot 10^7$	$(5,600 \pm 0,462) \cdot 10^7$	$(4,000 \pm 0,231) \cdot 10^7$
	48	$(2,600 \pm 0,346) \cdot 10^8$	$(2,800 \pm 0,462) \cdot 10^8$	$(1,090 \pm 0,029) \cdot 10^8$	$(4,930 \pm 0,291) \cdot 10^8$
	72	$(3,000 \pm 0,346) \cdot 10^8$	$(4,930 \pm 0,291) \cdot 10^8$	$(1,470 \pm 0,353) \cdot 10^8$	$(5,200 \pm 0,231) \cdot 10^8$
1710	0	$(2,870 \pm 0,240) \cdot 10^6$	$(2,800 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(2,600 \pm 0,416) \cdot 10^6$	$(3,000 \pm 0,231) \cdot 10^6$
	24	$(3,530 \pm 0,267) \cdot 10^5$	$(3,000 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(3,470 \pm 0,291) \cdot 10^6$	$(3,400 \pm 0,231) \cdot 10^6$
	48	$(2,870 \pm 0,467) \cdot 10^6$	$(3,000 \pm 0,231) \cdot 10^7$	$(1,050 \pm 0,029) \cdot 10^7$	$(7,000 \pm 0,231) \cdot 10^6$
	72	$(5,200 \pm 0,611) \cdot 10^7$	$(4,670 \pm 0,406) \cdot 10^7$	$(1,000 \pm 0,023) \cdot 10^7$	$(3,130 \pm 0,291) \cdot 10^7$
2052	0	$(2,870 \pm 0,240) \cdot 10^6$	$(2,800 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(3,000 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(2,800 \pm 0,231) \cdot 10^6$
	24	$(3,200 \pm 0,115) \cdot 10^5$	$(3,530 \pm 0,176) \cdot 10^6$	$(3,000 \pm 0,231) \cdot 10^6$	$(3,130 \pm 0,291) \cdot 10^6$
	48	$(3,400 \pm 0,306) \cdot 10^5$	$(4,100 \pm 0,291) \cdot 10^6$	$(4,900 \pm 0,353) \cdot 10^6$	$(3,250 \pm 0,231) \cdot 10^6$
	72	$(3,330 \pm 0,240) \cdot 10^5$	$(4,070 \pm 0,291) \cdot 10^6$	$(4,870 \pm 0,467) \cdot 10^6$	$(3,200 \pm 0,231) \cdot 10^6$

В лабораторной модели установлено влияние засоления на синтез штаммами *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 пролина (рис. 2 и 3) и бетаина (рис. 4 и 5).

В результате масс-спектрометрического анализа биомассы клеток штаммов *P. megaterium* Cp-1 (см. рис. 2) и *Rh. jostii* CA-6 (см. рис. 3) было установлено, что концентрация пролина внутри клеток пропорциональна связана с концентрацией хлорида натрия в среде: при увеличении содержания хлорида натрия с 0 до 1197 ммоль/л отмечается повышение содержания пролина в клетках с 0,089 до 2,105 мкг/мл и с 0,062 до 1,502 мкг/мл соответственно.

Масс-спектрометрический анализ биомассы клеток штаммов *P. megaterium* Cp-1 (см. рис. 4) и *Rh. jostii* CA-6 (см. рис. 5) показал, что концентрация внутриклеточного бетаина пропорционально связана с концентрацией хлорида натрия: при увеличении содержания хлорида натрия в среде до 1197 ммоль/л содержание бетаина в клетках возрастает с 0,055 до 0,219 мкг/мл и с 0,071 до 0,118 мкг/мл соответственно.

В лабораторном опыте изучено влияние штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 на всхожесть семян, рост и развитие проростков редиса розово-красного (*R. sativus* var. *radicula*) в условиях засоления, вызванного хлоридом натрия в диапазоне концентраций 171–855 ммоль/л.

Установлено, что обработка семян редиса 2 % раствором КЖ исследуемых бактерий оказала положительное влияние на всхожесть семян и длину проростков культуры в условиях засоления (табл. 6).

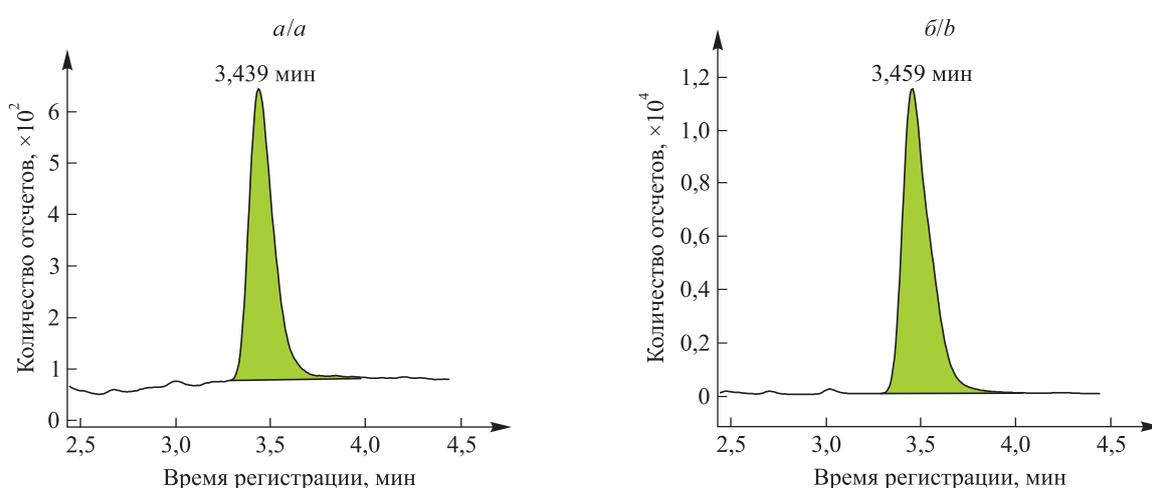


Рис. 2. Внутриклеточное содержание пролина в клетках штамма *P. megaterium* Cp-1: а – без хлорида натрия (контроль); б – в присутствии 1197 ммоль/л NaCl

Fig. 2. Intracellular proline concentration in strain *P. megaterium* Cp-1: а – free from sodium chloride (control); б – in the presence of 1197 mmol/L NaCl

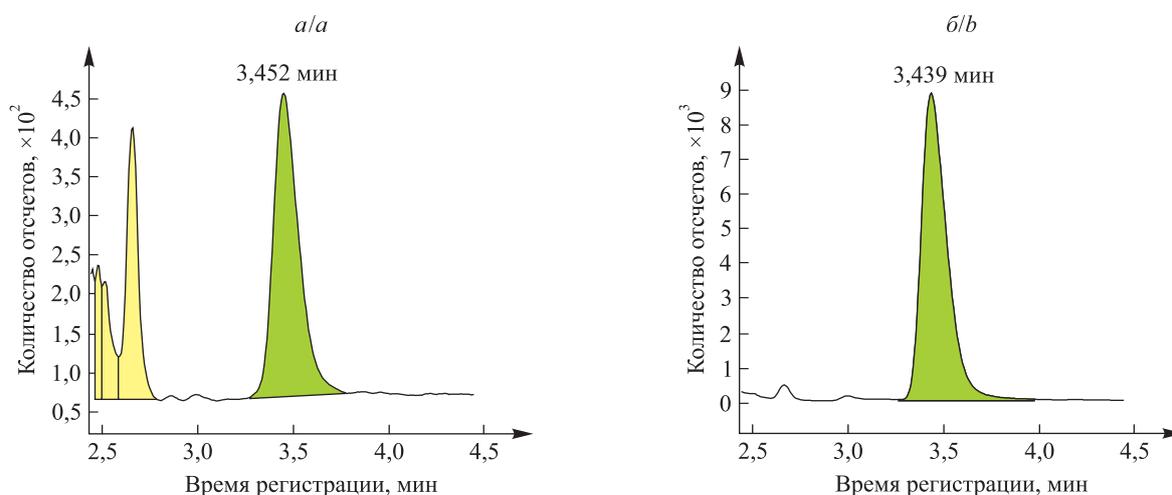


Рис. 3. Внутриклеточное содержание пролина в клетках штамма *Rh. jostii* CA-6: а – без хлорида натрия (контроль); б – в присутствии 1197 ммоль/л NaCl

Fig. 3. Intracellular proline concentration in strain *Rh. jostii* CA-6: а – free from sodium chloride (control); б – in the presence of 1197 mmol/L NaCl

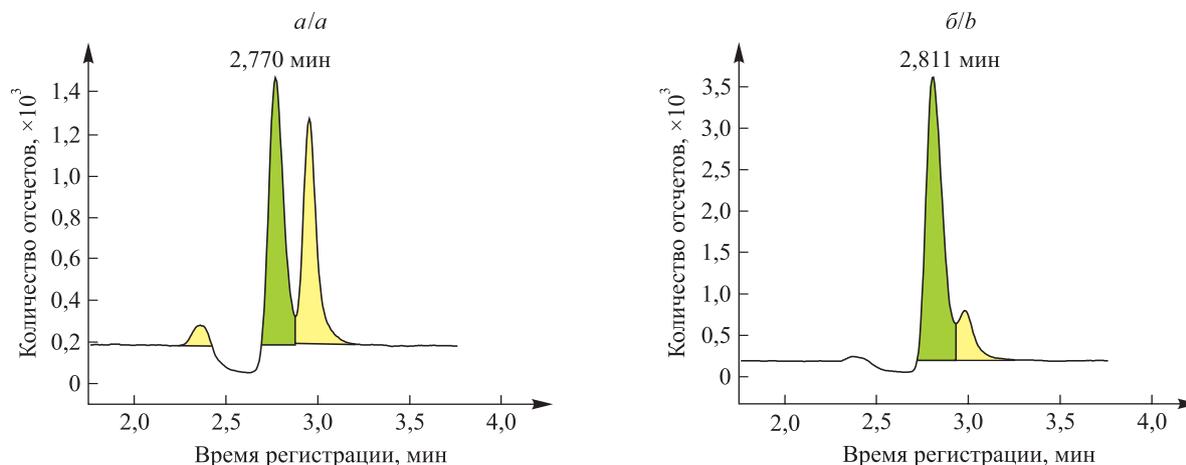


Рис. 4. Внутриклеточное содержание бетаина в клетках штамма *P. megaterium* Cp-1:
а – без хлорида натрия (контроль); б – в присутствии 1197 ммоль/л NaCl

Fig. 4. Intracellular betaine concentration in strain *P. megaterium* Cp-1:
a – free from sodium chloride (control); b – in the presence of 1197 mmol/L NaCl

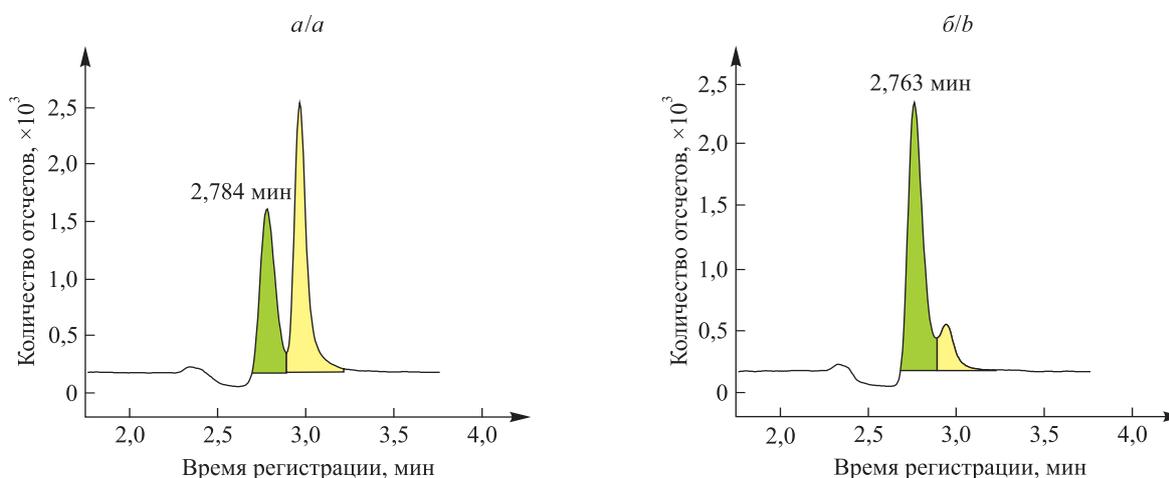


Рис. 5. Внутриклеточное содержание бетаина в клетках штамма *Rh. jostii* CA-6:
а – без хлорида натрия (контроль); б – в присутствии 1197 ммоль/л NaCl

Fig. 5. Intracellular betaine concentration in strain *Rh. jostii* CA-6:
a – free from sodium chloride (control); b – in the presence of 1197 mmol/L NaCl

Таблица 6

Влияние солеустойчивых штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 на всхожесть семян и длину проростков редиса розово-красного

Table 6

Effect of halotolerant strains *P. megaterium* Cp-1 and *Rh. jostii* CA-6 on seed germination and length of small radish seedlings

Вариант опыта	Всхожесть семян, % к контролю	Длина проростков	
		мм	% к контролю
<i>P. megaterium</i> Cp-1			
Без инокуляции (контроль)	100	38,60 ± 0,52	100
Инокуляция штаммом + 171 ммоль/л NaCl	119	46,20 ± 0,44	120
Инокуляция штаммом + 342 ммоль/л NaCl	115	43,80 ± 0,32	114
Инокуляция штаммом + 513 ммоль/л NaCl	113	46,30 ± 0,47	120
Инокуляция штаммом + 855 ммоль/л NaCl	109	40,60 ± 0,81	105

Окончание табл. 6
 Ending table 6

Вариант опыта	Всхожесть семян, % к контролю	Длина проростков	
		мм	% к контролю
<i>Rh. jostii</i> CA-6			
Без инокуляции (контроль)	100	37,70 ± 0,26	100
Инокуляция штаммом + 171 ммоль/л NaCl	114	40,60 ± 0,40	107
Инокуляция штаммом + 342 ммоль/л NaCl	112	41,50 ± 0,32	110
Инокуляция штаммом + 513 ммоль/л NaCl	100	42,10 ± 0,47	114
Инокуляция штаммом + 855 ммоль/л NaCl	105	41,40 ± 0,81	110

Выявлено, что инокуляция семян редиса розово-красного 2 % раствором КЖ солеустойчивого штамма *P. megaterium* Cp-1 максимально увеличивает всхожесть семян по сравнению с контролем на 19 % (171 ммоль/л NaCl), а длину проростков – на 20 % (171 и 513 ммоль/л NaCl). Всхожесть семян и длина проростков редиса, инокулированного штаммом *Rh. jostii* CA-6, возрастает на 14 % (171 и 513 ммоль/л NaCl соответственно).

Инокуляция семян редиса розово-красного 2 % раствором КЖ штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 положительно влияет на накопление проростками сырой (рис. 6, а) и сухой (рис. 6, б) фитомассы. Установлено, что при обработке семян 2 % раствором КЖ солеустойчивого штамма *P. megaterium* Cp-1 наблюдается увеличение сухой и сырой фитомассы на 12 и 29 % соответственно при концентрации хлорида натрия, равной 171 и 855 ммоль/л. При содержании хлорида натрия 171 ммоль/л инокуляция семян редиса 2 % раствором КЖ штамма *Rh. jostii* CA-6 повышает накопление сухой фитомассы на 17 %, сырой – на 76 %. Прирост сухой фитомассы данной сельскохозяйственной культуры семейства капустных в присутствии 513 ммоль/л хлорида натрия составляет 17 %, сырой – 52 %.

Штаммы *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6, сохраняющие свои агрономически ценные свойства в условиях засоления, перспективны для использования в биотехнологии для минимизации негативного влияния засоления на рост и развитие растений.

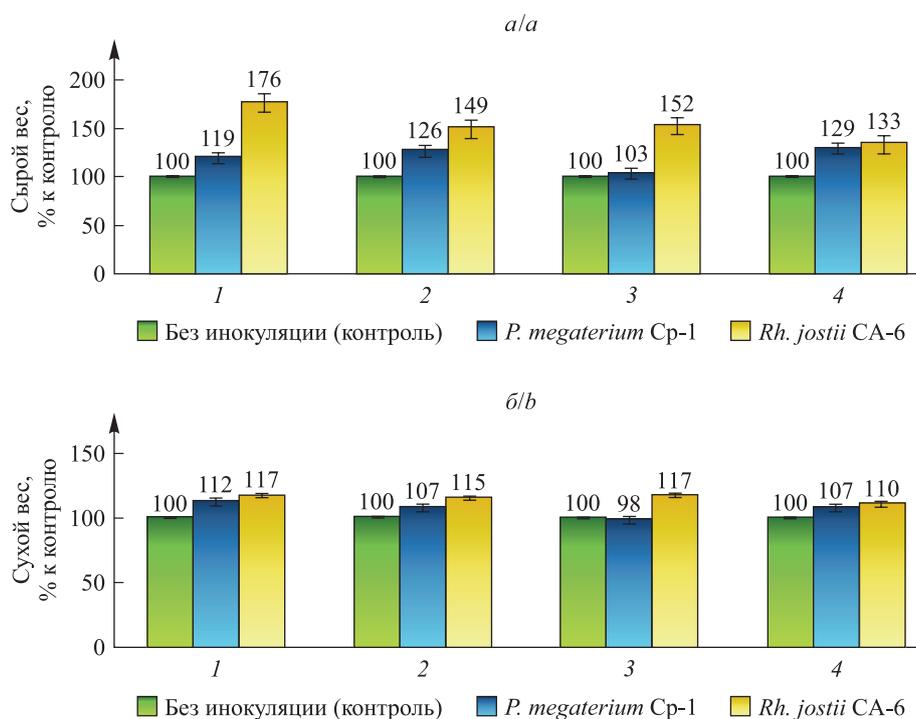


Рис. 6. Влияние штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 на сырую (а) и сухую (б) фитомассу проростков редиса в условиях засоления: 1 – 171 ммоль/л NaCl; 2 – 342 ммоль/л NaCl; 3 – 513 ммоль/л NaCl; 4 – 855 ммоль/л NaCl

Fig. 6. Impact of strains *P. megaterium* Cp-1 and *Rh. jostii* CA-6 on crude (a) and dry (b) phytomass of small radish seedlings in saline media: 1 – 171 mmol/L NaCl; 2 – 342 mmol/L NaCl; 3 – 513 mmol/L NaCl; 4 – 855 mmol/L NaCl

Заключение

Установлено, что в условиях осмотического стресса, вызванного хлоридом натрия в диапазоне концентраций 1197–2052 ммоль/л, исследуемые штаммы *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 сохраняют фосфатсолубилизирующую, азотфиксирующую и ИУК-синтезирующую активность.

Показано, что осмолиты пролин, бетаин и сахараза оказывают положительный эффект на рост штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 и их способность адаптироваться к осмотическому стрессу. Внутриклеточное образование пролина и бетаина у исследуемых штаммов пропорционально связано с концентрацией хлорида натрия: при увеличении содержания хлорида натрия в среде до 1197 ммоль/л уровень пролина повышается с 0,062 до 1,502 мкг/мл (*Rh. jostii* CA-6) и с 0,089 до 2,105 мкг/мл (*P. megaterium* Cp-1), уровень бетаина – с 0,071 до 0,118 мкг/мл (*Rh. jostii* CA-6) и с 0,055 до 0,219 мкг/мл (*P. megaterium* Cp-1).

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что штаммы *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 сохраняют свои агрономически ценные свойства в условиях засоления и положительно влияют на всхожесть семян и развитие проростков редиса розово-красного (*R. sativus* var. *radicula*), являющегося наиболее чувствительной тест-культурой при определении фитотоксичности микроорганизмов и почвы. Штаммы *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 перспективны для использования в биотехнологиях, обеспечивающих минимизацию негативного влияния засоления на рост и развитие растений.

Библиографические ссылки

1. Behera BC, Singdevsachan SK, Mishra RR, Dutta SK, Thatoi HN. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove: a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2014;3(2):97–110. DOI: 10.1016/j.bcab.2013.09.008.
2. Grover M, Ali SkZ, Sandhya V, Rasul A, Venkateswarlu B. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;27:1231–1240. DOI: 10.1007/s11274-010-0572-7.
3. Ramadoss D, Lakkineni VK, Bose P, Ali S, Annapurna K. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *SpringerPlus*. 2013;2(1):6. DOI: 10.1186/2193-1801-2-6.
4. Ha-Tran DM, Nguyen TTM, Hung SH, Huang E, Huang CC. Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(6):3154. DOI: 10.3390/ijms22063154.
5. Arora NK, Fatima T, Mishra J, Mishra I, Verma S, Verma R, et al. Halo-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for improving productivity and remediation of saline soils. *Journal of Advanced Research*. 2020;26:69–82. DOI: 10.1016/j.jare.2020.07.003.
6. Наумович НИ, Алешенкова ЗМ, Ананьева ИН, Сафронова ГВ. Выделение и идентификация микроорганизмов, устойчивых к засолению почв. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 2022;67(1):54–65. DOI: 10.29235/1029-8940-2022-67-1-54-65.
7. Lányi B. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. *Methods in Microbiology*. 1988;19:1–67. DOI: 10.1016/S0580-9517(08)70407-0.
8. Возняковская ЮМ. *Микрофлора растений и урожай*. Ленинград: Колос; 1969. 240 с.
9. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. 2028 p.
10. Sarwar M, Kremer RJ. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant and Soil*. 1995;172:261–269. DOI: 10.1007/BF00011328.
11. Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 1999;170(1):265–270. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x.
12. Murphy J, Riley JP. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 1962;27:31–36. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)88444-5.
13. Горшкова ОМ, Горещкая АГ, Корешкова ТН, Краснушкин АВ, Марголина ИЛ, Потапов АА и др. *Методы лабораторных и полевых исследований [CD-ROM]*. Слипечук МВ, редактор. Москва: МГУ; 2015. 220 с. 1 CD-ROM: текст.
14. Умаров ММ. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях. *Почвоведение*. 1976;11:119–123.
15. Fan D, Smith DL. Characterization of selected plant growth-promoting rhizobacteria and their non-host growth promotion effects. *Microbiology Spectrum*. 2021;9(1):1–20. DOI: 10.1128/Spectrum.00279-21.

References

1. Behera BC, Singdevsachan SK, Mishra RR, Dutta SK, Thatoi HN. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove: a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2014;3(2):97–110. DOI: 10.1016/j.bcab.2013.09.008.
2. Grover M, Ali SkZ, Sandhya V, Rasul A, Venkateswarlu B. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;27:1231–1240. DOI: 10.1007/s11274-010-0572-7.
3. Ramadoss D, Lakkineni VK, Bose P, Ali S, Annapurna K. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *SpringerPlus*. 2013;2(1):6. DOI: 10.1186/2193-1801-2-6.

4. Ha-Tran DM, Nguyen TTM, Hung SH, Huang E, Huang CC. Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(6):3154. DOI: 10.3390/ijms22063154.
5. Arora NK, Fatima T, Mishra J, Mishra I, Verma S, Verma R, et al. Halo-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for improving productivity and remediation of saline soils. *Journal of Advanced Research*. 2020;26:69–82. DOI: 10.1016/j.jare.2020.07.003.
6. Naumovich NI, Aleschenkova ZM, Ananyeva IN, Safronava HV. Solation and identification of microorganism's resistant to soil salinization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2022;67(1):54–65. Russian. DOI: 10.29235/1029-8940-2022-67-1-54-65.
7. Lányi B. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. *Methods in Microbiology*. 1988;19:1–67. DOI: 10.1016/S0580-9517(08)70407-0.
8. Voznyakovskaya YuM. *Mikroflora rastenii i urozhai* [Plant microflora and harvest]. Leningrad: Kolos; 1969. 240 p. Russian.
9. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. 2028 p.
10. Sarwar M, Kremer RJ. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant and Soil*. 1995;172:261–269. DOI: 10.1007/BF00011328.
11. Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 1999;170(1):265–270. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x.
12. Murphy J, Riley JP. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 1962;27:31–36. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)88444-5.
13. Gorshkova OM, Goretskaya AG, Koreshkova TN, Krasnushkin AV, Margolina IL, Potapov AA, et al. *Metody laboratornykh i polevykh issledovaniy* [Laboratory and field research methods] [CD-ROM]. Slipenchuk MV, editor. Moscow: Moscow State University; 2015. 220 p. 1 CD-ROM: text. Russian.
14. Umarov MM. [Acetylene method for studying nitrogen fixation in soil microbiological studies]. *Pochvovedenie*. 1976;11:119–123. Russian.
15. Fan D, Smith DL. Characterization of selected plant growth-promoting rhizobacteria and their non-host growth promotion effects. *Microbiology Spectrum*. 2021;9(1):1–20. DOI: 10.1128/Spectrum.00279-21.

Получена 04.02.2022 / исправлена 28.02.2022 / принята 21.04.2022.
Received 04.02.2022 / revised 28.02.2022 / accepted 21.04.2022.

УДК 595.79(476)

СТРУКТУРА ПЫЛЬЦЕВОГО ГРУЗА ИМАГО ЖАЛОНОСНЫХ ПЕРЕПОНЧАТОКРЫЛЫХ (ACULEATA) – ПОСЕТИТЕЛЕЙ СОЦВЕТИЙ ИНВАЗИВНЫХ ЗОЛОТАРНИКОВ *SOLIDAGO CANADENSIS* L. s. l. В УСЛОВИЯХ БЕЛАРУСИ

Д. О. КОРОТЕЕВА¹⁾, А. А. ШЕЙКО¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

В составе сообществ антофильных жалоносных перепончатокрылых – посетителей соцветий инвазивных золотарников *Solidago canadensis* L. s. l. в условиях Беларуси отмечены 44 вида из 20 родов, 11 семейств и 3 надсемейств. К числу многочисленных видов принадлежат шмели *Bombus terrestris* L. и *B. lapidarius* L., к числу обычных видов – осы *Philanthus triangulum* F., *Polistes dominula* Christ, *P. nimpha* Christ, пчела *Hylaeus communis* NyL. и шмель *B. ruderarius* Müller. Суммарное относительное обилие имаго этих видов составило 67 %. В структуре пыльцевого груза данных антофилов доля неконспецифической пыльцы варьировалась от 17 до 45 пыльцевых зерен на экземпляр и во всех случаях была меньше доли конспецифической пыльцы. В составе последней доли легко утрачиваемой и относительно легко утрачиваемой пыльцы, значимой для осуществления опыления у имаго всех видов, превышали долю трудно утрачиваемой пыльцы.

Ключевые слова: пыльцевой анализ; опыление; Apoidea; Vespoidea; антофильные насекомые; сообщества опылителей.

Образец цитирования:

Коротеева Д.О., Шейко А.А. Структура пыльцевого груза имаго жалоносных перепончатокрылых (Aculeata) – посетителей соцветий инвазивных золотарников *Solidago canadensis* L. s. l. в условиях Беларуси. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;2:73–81. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-73-81>

For citation:

Koroteeva DO, Sheiko AA. Pollen cargo structure on Aculeata – visitors of alien *Solidago canadensis* L. s. l. inflorescences in Belarus. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;2:73–81. Russian. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-73-81>

Авторы:

Дарья Олеговна Коротеева – аспирантка кафедры зоологии биологического факультета. Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор С. В. Буга.
Анна Александровна Шейко – аспирантка кафедры зоологии биологического факультета. Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор С. В. Буга.

Authors:

Daria O. Koroteeva, postgraduate student at the department of zoology, faculty of biology. daryakoroteeva1996@gmail.com <https://orcid.org/0000-0002-3010-6573>
Anna A. Sheiko, postgraduate student at the department of zoology, faculty of biology. sheiko7091@gmail.com <https://orcid.org/0000-0003-2519-5089>

POLLEN CARGO STRUCTURE ON ACULEATA – VISITORS OF ALIEN *SOLIDAGO CANADENSIS* L. s. I. INFLORESCENCES IN BELARUS

D. O. KOROTEEVA^a, A. A. SHEIKO^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: D. O. Koroteeva (daryakoroteeva1996@gmail.com)

Community structure of visitors to inflorescences of invasive goldenrods was investigated by sampling at 9 sites in Minsk city, Minsk and Mogilev regions in Belarus. A total 44 species of Aculeata including 1 species of Chrysoidea, 7 species of Vespoidea and 36 species of Apoidea were registered. Among them 2 species of bumblebees (*Bombus terrestris* L., *B. lapidarius* L.) were numerous, 2 species of Vespoidea (*Polistes dominula* Christ, *P. nimpha* Christ) and 3 species of Apoidea (*Philanthus triangulum* F., *Hylaeus communis* Nyl., *B. ruderarius* Müller) were common. Pollen cargo analysis revealed the predominance of easily lost and relatively easily lost conspecific pollen grains on the bodies of the imago of the all common and numerous species of visitors to inflorescences of invasive goldenrods.

Keywords: pollen cargo analysis; pollination; Apoidea; Vespoidea; anthophilous insects; pollinator communities.

Введение

Внедрение чужеродных для аборигенной флоры видов в растительные сообщества приводит к трансформации их структуры и нарушению стабильности и функционирования соответствующих природных комплексов. В частности, инвазивные виды способны нарушать трофические связи между аборигенными энтомофильными растениями и насекомыми-опылителями [1–3]. Внедрение растений-инвайдеров в естественные биоценозы ведет к изменению структуры гильдии опылителей энтомофильных растений и в целом негативно сказывается на биоразнообразии насекомых [4; 5].

К числу наиболее известных и широко распространенных в Беларуси растений-инвайдеров относится золотарник канадский (*Solidago canadensis* L.) североамериканского происхождения [6, с. 150–159]. Целенаправленные исследования позволили заключить, что произрастающие в Беларуси высокоинвазивные золотарники *S. canadensis* L. s. I. следует рассматривать в качестве самостоятельного таксона, морфологически отличного от родительского таксона *S. canadensis* L. s. str. [7].

Золотарники комплекса *S. altissima* L., к которому принадлежит *S. canadensis* L., – многолетние травянистые растения высотой до 280 см с прямостоячими, обычно опушенными, простыми стеблями и желтыми цветками (краевые цветки ложноязычковые, срединные цветки трубчатые). Корзинки мелкие, собраны в однобокие дугоподобные изогнутые кисти, которые образуют общее верхушечное соцветие пирамидальной формы. Цветение длится с июля по сентябрь, семена обычно созревают с августа по октябрь. Для этих растений характерно распространение семян воздушными потоками (ветром): их семена снабжены хохолками из многочисленных волосков. Они легковоспламеняемы, что определяет высокую пожароопасность невыкошенных участков сплошного произрастания золотарников в осенний период [8].

Золотарники принадлежат к числу насекомоопыляемых цветковых растений, основным способом распространения и воспроизводства которых является семенной [9, с. 355–356]. Очевидно, что эффективность опыления этих инвазивных растений антофильными насекомыми определяет не только их семенную продуктивность, но и формирование пула распространяемых ветром семян.

Для оценки эффективности опыления растений посетителями цветков и соцветий используется в том числе метод пыльцевого анализа [10]. Он предусматривает выяснение состава пыльцевого груза – пыльцы, накапливающейся как на теле насекомого, так и в обножке (при наличии морфологических приспособлений для аккумуляции собранной пыльцы, например корзиночки у медоносных пчел или скопы у пчел-листорезов). Схема анализа предполагает смывание с насекомого пыльцевых зерен и последующий их подсчет и идентификацию под микроскопом [10].

Прочность удержания пыльцевых зерен на теле насекомых-опылителей различна. С учетом этого можно выделить три фракции пыльцы:

- легко утрачиваемую (осыпается уже при полете насекомого);
- относительно легко утрачиваемую (может быть удалена смыванием);
- трудно утрачиваемую (может быть удалена только механически).

Такой вариант дифференциации был использован авторами для анализа пыльцевого груза посетителей соцветий якобеи обыкновенной (*Jacobaea vulgaris* L.) [11].

В задачи выполненных исследований входила оценка объема пыльцевого груза (количество переносимых на теле насекомых и в обножке (при ее наличии) пыльцевых зерен) и доли в нем конспецифической (т. е. принадлежащей модельному растению) пыльцы, а также выяснение соотношения легко утрачиваемой, относительно легко утрачиваемой и трудно утрачиваемой фракций пыльцы.

Материалы и методы исследования

Сбор насекомых производился в 2018 г. во время активного цветения золотарников (летне-осенний период) на территории их массового произрастания, к которой относятся:

- 1) окрестности водохранилища Дрозды (Минск);
- 2) окрестности жилого района по ул. Могилёвской (Минск);
- 3) Центральный ботанический сад НАН Беларуси (Минск);
- 4) окрестности Музея валунов (Минск);
- 5) окрестности Цнянского водохранилища (Минск);
- 6) лесопарковая зона микрорайона Зеленый Луг (Минск);
- 7) окрестности водохранилища Удранка (Молодечненский район, Минская область);
- 8) окрестности учебной географической станции «Западная Березина» (Воложинский район, Минская область);
- 9) окрестности д. Борок (Бобруйский район, Могилёвская область).

Прилегающую к участкам сбора материала местность предварительно обследовали на предмет отсутствия на расстоянии до 3 км сколько-нибудь многочисленных местопроизрастаний аборигенного вида – золотарника обыкновенного (*S. virgaurea* L.), поскольку по морфологическим признакам его пыльца практически неотличима от пыльцы *S. canadensis* и *S. altissima*. Идентификацию пыльцевых зерен выполняли, опираясь на материалы онлайн-базы данных *Palynological Database* (<https://www.paldat.org/>). Дистанция 3 км использована с учетом известных данных о расстояниях полетов фуражирующих особей антофильных перепончатокрылых [12].

Отлов насекомых производили вручную, а также с помощью энтомологического сачка. Коллектированных особей помещали в отдельные полипропиленовые пробирки объемом 10 мл. Для идентификации таксономической принадлежности перепончатокрылых насекомых использовали соответствующие определители [13; 14; 15, S. 19–42].

Ранжирование видов по относительному обилию (на основании структуры энтомологической коллекции) осуществлено с применением предложенной Ю. В. Песенко [16, с. 28–30] пятибалльной ограниченной сверху логарифмической шкалы. Соответствующие пороговые значения представлены в табл. 1.

Таблица 1

Пятибалльная ограниченная сверху логарифмическая шкала для дифференциации по уровню относительного обилия жалоносных перепончатокрылых (Aculeata), коллектированных в числе посетителей соцветий инвазивных золотарников *S. canadensis* L. s. l. в условиях исследуемых местопроизрастаний

Table 1

Five-point logarithmic scale limited by the upper bound for differentiation relative species abundance of Aculeata, collected on alien *S. canadensis* L. s. l. inflorescences in discussed locations

Класс по уровню обилия	Граница интервала класса	
	Нижняя	Верхняя
1 (единичный вид)	1	3
2 (малочисленный вид)	4	9
3 (обычный вид)	10	26
4 (многочисленный вид)	27	78
5 (доминирующий вид)	79	232

Объем пыльцевого груза оценивается количеством пыльцевых зерен на одну особь [10]. Анализ проводился с помощью микроскопа Zeiss Stemi 2000 (*Carl Zeiss*, Германия) и камеры Горяева по методике, аналогичной методике подсчета эритроцитов крови, при этом размер пыльцевых зерен не учитывался.

Использовался ранее предложенный авторами [11] вариант дифференциации пыльцевых зерен на три фракции (легко утрачиваемая, относительно легко утрачиваемая и трудно утрачиваемая пыльца). Количественные данные аккумулировались в электронных таблицах, базовый статистический анализ выполнялся средствами программного обеспечения *PAST* (версия 4.05).

Результаты и их обсуждение

В ходе проведенных исследований на соцветиях золотарников *S. canadensis* L. s. l. были коллектированы имаго 44 видов перепончатокрылых насекомых, принадлежащих к 20 родам, 11 семействам и 3 надсемействам. Их систематическое положение приведено ниже в соответствии с вариантом систематики, использованным в издании «Аннотированный каталог перепончатокрылых насекомых России» [17, p. 118–309].

Надсемейство Chrysoidea: *Hedychrum nobile* (Scopoli, 1763).

Надсемейство Vespoidea: *Ancistrocerus ichneumonideus* (Ratzeburg, 1844); *A. nigricornis* Morawitz, 1889; *A. parietinus* Linnaeus, 1761; *Eumenes coarctatus* (Linnaeus, 1758); *Polistes dominula* (Christ, 1791); *P. nimpha* (Christ, 1791); *Vespa rufa* (Linnaeus, 1758).

Надсемейство Apoidea, секция Spheciformes: *Ammophila terminata* F. Smith, 1856; *Cerceris arenaria* (Linnaeus, 1758); *C. quinquefasciata* (Rossi, 1792); *C. ruficornis* (Fabricius, 1793); *C. rybyensis* (Linnaeus, 1771); *Lestica alata* (Panzer, 1797); *L. clypeata* (Schreber, 1759); *Philanthus triangulum* (Fabricius, 1775).

Надсемейство Apoidea, секция Apiformes: *Andrena chrysopyga* Dours, 1872; *A. flavipes* Panzer, 1799; *A. gallica* Schmiedeknecht, 1883; *A. lepida* Schenck, 1861; *A. pilipes* Fabricius, 1781; *Bombus humilis* Illiger, 1806; *B. hypnorum* (Linnaeus, 1758); *B. lapidarius* (Linnaeus, 1758); *B. lucorum* (Linnaeus, 1761); *B. rudericus* (Müller, 1776); *B. semenoviellus* Skorikov, 1910; *B. terrestris* (Linnaeus, 1758); *Bombus (Psithyrus) barbutellus* (Kirby, 1802); *Epeolus variegatus* (Linnaeus, 1758); *E. cruciger* (Panzer, 1799); *Colletes similis* Schenck, 1853; *Hylaeus annularis* (Kirby, 1802); *H. communis* Nylander, 1852; *Halictus maculatus* (Smith, 1848); *H. tumulorum* (Linnaeus, 1758); *Lasioglossum calceatum* (Scopoli, 1763); *L. costulatum* (Kriechbaumer, 1873); *L. leucopus* (Kirby, 1802); *L. morio* (Fabricius, 1793); *L. sexnotatum* (Nylander, 1852); *Sphcodes puncticeps* Thomson, 1870; *Heriades truncorum* (Linnaeus, 1758); *Macropis europaea* Warncke, 1973.

Все отмеченные насекомые были зарегистрированы в качестве посетителей соцветий инвазивных золотарников на территории Беларуси впервые.

Рассматривая структуру исследуемого сообщества (гильдии) посетителей соцветий инвазивных золотарников, следует обратить внимание на ее резкие различия в аспектах видового богатства и относительного обилия. Так, к группе многочисленных отнесены 2 вида пчелиных семейства Apidae – шмели *B. lapidarius* L. и *B. terrestris* L., к группе обычных – 5 видов, таких как шмель *B. rudericus* Müller, пчела *H. communis* Nyl. и осы *Ph. triangulum* F., *P. dominula* Christ, *P. nimpha* Christ. Все перечисленные виды являются широко распространенными на территории Беларуси [18] и, как следует из рис. 1, а, составляют 67 % (41 и 26 % соответственно) особей анализируемой выборки. В то же время рис. 1, б, указывает, что на них приходится около 16 % совокупного видового богатства. Это заставляет сфокусироваться на составе названных двух групп антофилов и оценке их возможного вклада в осуществление трансфера пыльцы.

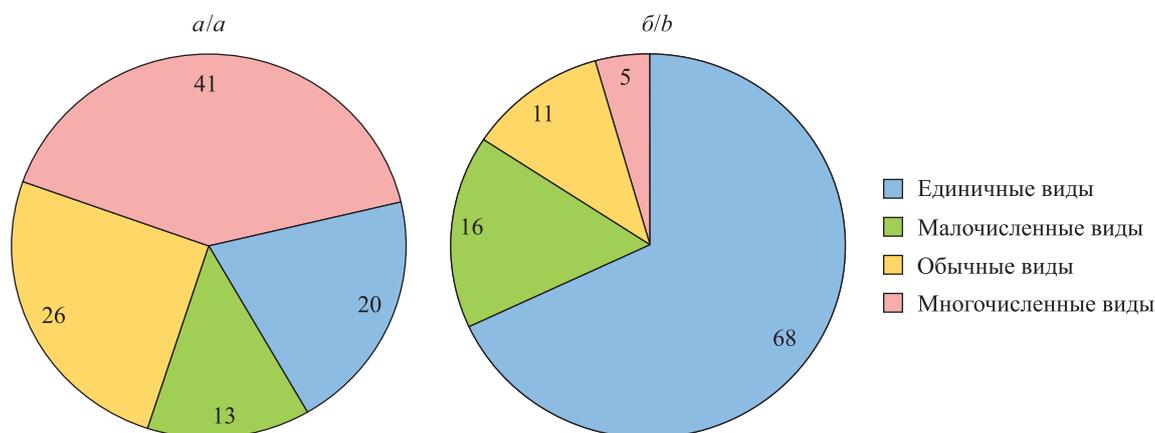


Рис. 1. Структура сообщества (гильдии) энтомофильных жалоносных перепончатокрылых (Aculeata) – посетителей соцветий инвазивных золотарников *S. canadensis* L. s. l. в аспектах относительного обилия (а) и видового богатства (б), %

Fig. 1. The composition of communities of entomophilous Aculeata – visitors of alien *S. canadensis* L. s. l. inflorescences in terms of relative species abundance (a) and species diversity (b), %

Существенным аспектом экологической структуры рассматриваемой гильдии является представленность группы антофильных перепончатокрылых насекомых с разной шириной спектра посещаемых энтомофильных растений. Наибольшим видовым богатством характеризуется группа полилектов, фуражирующих на соцветиях растений многих эколого-таксономических групп. Олиголектом в составе исследуемого сообщества является пчела *M. europaea*, посещающая также соцветия вербейников (*Lysimachia* L.) [19]. На соцветиях золотарников авторами было зарегистрировано всего 2 экземпляра *M. europaea*, что позволяет предположить, что эти пчелы посещали золотарники не для питания, а для отдыха или груминга.

Все представители групп многочисленных и обычных видов принадлежат к числу полилектов, а значит, на участках сплошного произрастания золотарников способны посещать цветки и соцветия иных энтомофильных растений и, следовательно, нести не только конспецифическую пыльцу золотарников.

На рис. 2 представлен общий объем пыльцевого груза, а на рис. 3 – доля в нем конспецифической и неконспецифической пыльцы.

Таким образом, обнаруживается значительное преобладание конспецифической пыльцы в пыльцевых грузах многочисленных и обычных видов рассматриваемых сообществ. Это объясняется проявлением известного для пчелиных правила цветочной константности, которое выражается в том, что насекомые посещают цветки одного и того же вида растения так долго, насколько это возможно. Правило цветочной константности базируется на восприятии пчелами и другими насекомыми сходства и различия морфологических признаков посещаемых цветков [20, с. 47–57].

Также следует отметить, что наибольшее число конспецифических пыльцевых зерен выявлено в пыльцевых грузах шмелей (*Bombus* Latr.). Доказано, что шмели являются распространенными опылителями широкого спектра цветковых растений, это отражено во многих работах, опубликованных за последние годы [18; 21].

Пыльца энтомофильных растений зачастую обладает различными приспособлениями для фиксации на теле антофильных насекомых, последние в ряде случаев также приспособлены к аккумуляции на себе пыльцевых зерен для последующего их сбора и использования в качестве пищевого ресурса, в том числе для своего потомства [20, с. 17–47].

В результате часть пыльцевых зерен настолько надежно закрепляются на теле насекомых, что могут быть удалены лишь целенаправленным механическим воздействием. Они могут быть конспецифическими, но не являются ресурсом для опыления целевых энтомофильных растений (в данном случае – инвазивных золотарников). Более того, фракция трудно утрачиваемых пыльцевых зерен формирует пул заблокированной для участия в опылении пыльцы, ее превалирование в структуре пыльцевого груза характеризует посетителей соцветий в качестве неэффективных опылителей.

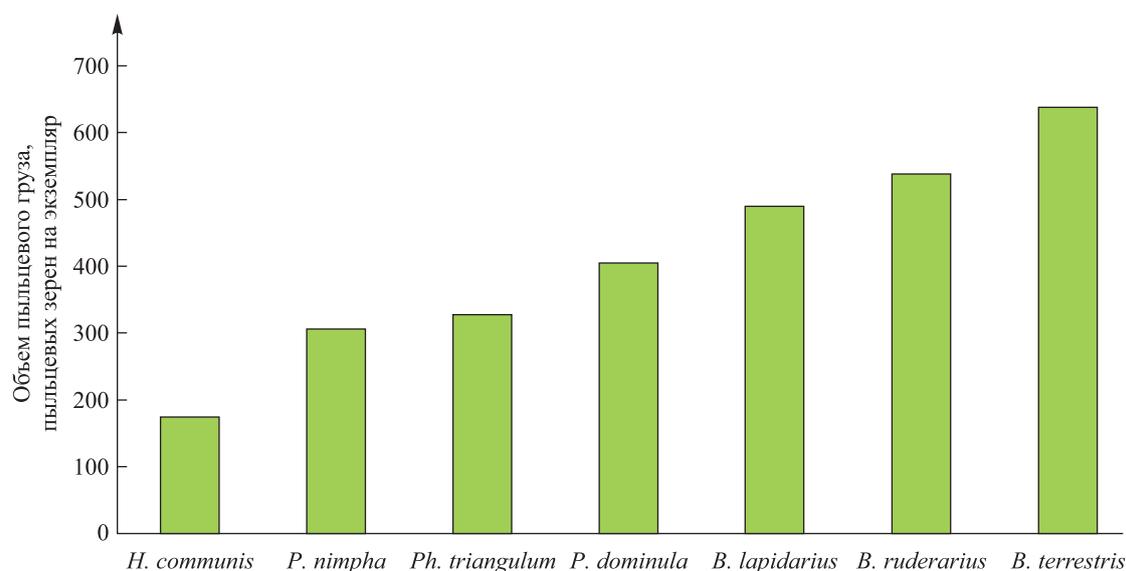


Рис. 2. Объем пыльцевого груза имаго многочисленных и обычных видов жалоносных перепончатокрылых (Aculeata) – посетителей соцветий золотарников *S. canadensis* L. s. l.

Fig. 2. Pollen cargo on numerous and common species of Aculeata – visitors of *S. canadensis* L. s. l. inflorescences

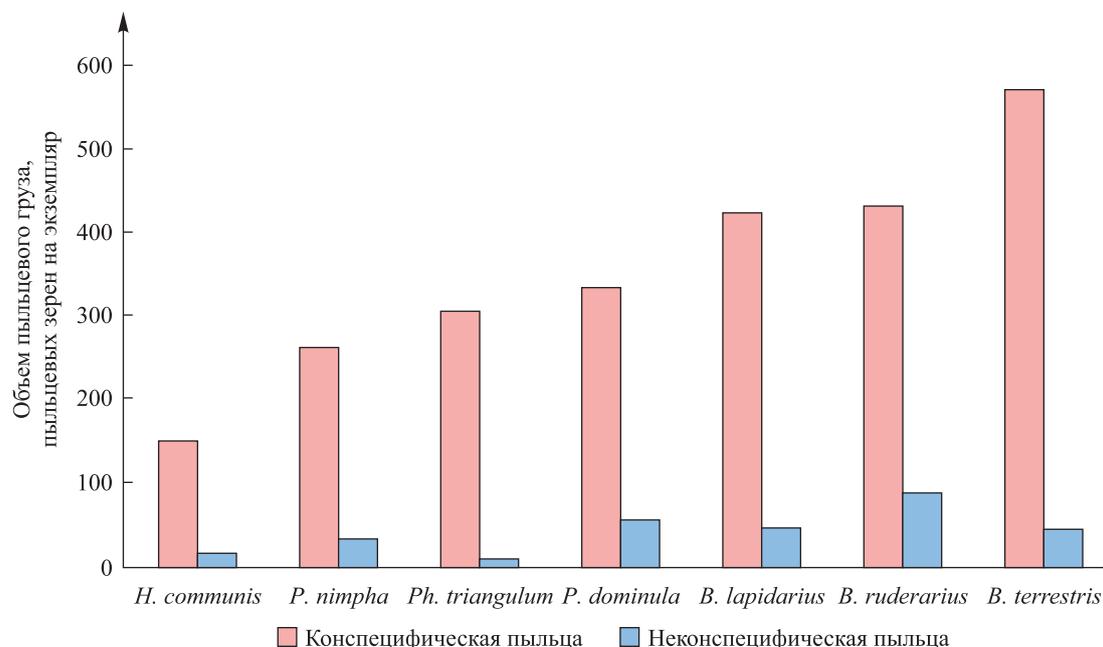


Рис. 3. Соотношение различных фракций пыльцы в пыльцевом грузе многочисленных и обычных видов жалоносных перепончатокрылых (Aculeata) – посетителей соцветий золотарников *S. canadensis* L. s. l.

Fig. 3. Distribution of different pollen fractions in pollen cargo of numerous and common species of Aculeata – visitors of *S. canadensis* L. s. l. inflorescences

В табл. 2 представлены результаты анализа фракционного состава пыльцевого груза имаго перепончатокрылых из групп многочисленных и обычных посетителей соцветий золотарников.

Таблица 2

Объем и структура пыльцевого груза имаго многочисленных и обычных видов жалоносных перепончатокрылых (Aculeata) – посетителей соцветий золотарников *S. canadensis* L. s. l. в условиях исследуемых местопроизрастаний

Table 2

Volume and structure of pollen cargo of numerous and common species of Aculeata – visitors of *S. canadensis* L. s. l. inflorescences in discussed locations

Вид	Фракция пыльцы, пыльцевых зерен на экзemplяре		
	Легко утрачиваемая	Относительно легко утрачиваемая	Трудно утрачиваемая
<i>B. lapidarius</i>	96,00 ± 20,00	177,00 ± 22,41	167,00 ± 19,26
<i>B. terrestris</i>	184,00 ± 62,00	203,00 ± 49,55	204,00 ± 62,84
<i>B. ruderarius</i>	77,00 ± 24,42	232,00 ± 64,26	139,00 ± 41,56
<i>H. communis</i>	16,00 ± 6,63	111,00 ± 73,77	29,00 ± 10,29
<i>Ph. triangulum</i>	77,00 ± 66,26	147,00 ± 36,40	94,00 ± 35,87
<i>P. dominula</i>	125,00 ± 49,01	137,00 ± 46,62	84,00 ± 32,69
<i>P. nimpha</i>	66,00 ± 20,50	113,00 ± 29,70	93,00 ± 20,32

Визуализация полученных данных позволяет сделать заключение о преобладании в составе пыльцевого груза имаго всех многочисленных и обычных видов перепончатокрылых конспецифических пыльцевых зерен (рис. 4). Более того, доля фракции конспецифической трудно утрачиваемой пыльцы у всех видов намного меньше доли фракций легко утрачиваемой и относительно легко утрачиваемой пыльцы, которая пригодна для опыления.

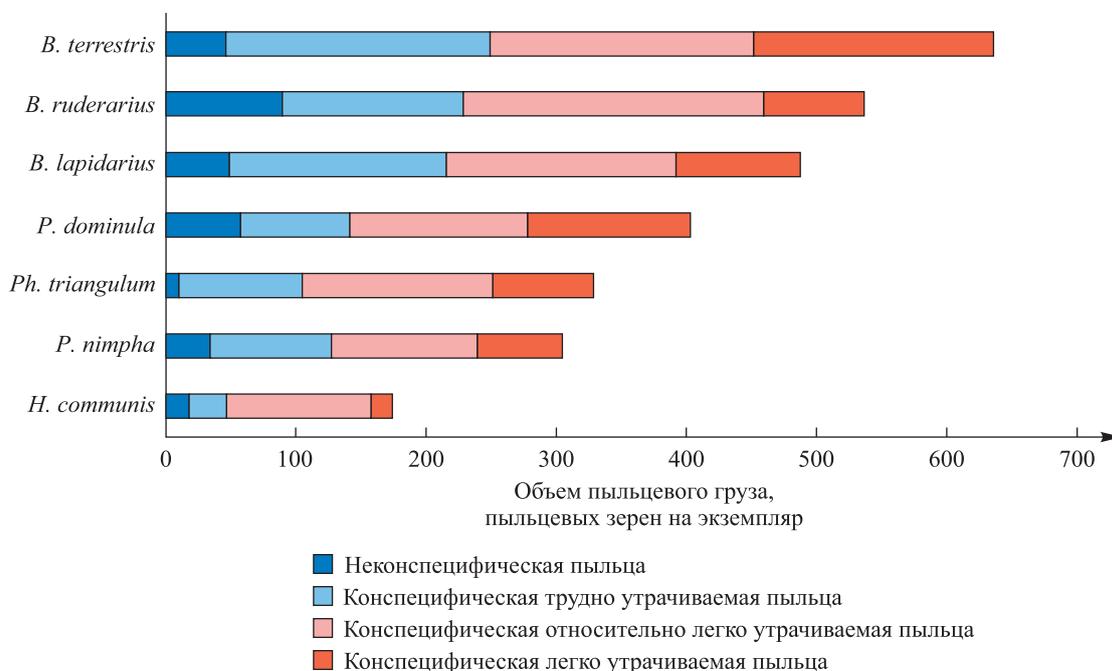


Рис. 4. Соотношение различных фракций пыльцы в пыльцевом грузе имаго многочисленных и обычных видов жалоносных перепончатокрылых (Aculeata) – посетителей соцветий инвазивных золотарников *S. canadensis* L. s. l.

Fig. 4. Distribution of different pollen fractions in pollen cargo of numerous and common species of Aculeata – visitors of alien *S. canadensis* L. s. l. inflorescences

Большое количество пыльцевых зерен, переносимых имаго бумажных ос *P. dominula* и *P. nimpha*, может быть объяснено особенностями их этологии: ввиду социальности и формирования крупных семей полисты, посещающая соцветия золотарников для питания и (или) охоты, накапливают и переносят на своих телах пыльцу.

Наибольшие объемы пыльцевого груза ожидаемо были констатированы для имаго многочисленных (*B. terrestris*, *B. lapidarius*) и обычных (*B. ruderarius*) видов шмелей, что хорошо коррелирует с данными предыдущих исследований [18].

Высокая плотность фуражирующих особей этих шмелей в местах произрастания золотарников делает их, предположительно, основными переносчиками пыльцы золотарников в данных местопроизрастаниях. Также следует обратить внимание на то, что *B. terrestris* проявляет тенденцию к доминированию в комплексах опылителей цветковых растений, и это подтверждается результатами исследований [21]. Довольно широкий радиус фуражирования, характерный для этих видов (312–2800 м для *B. terrestris*, 450 м для *B. lapidarius* [21]), также способствует частому посещению соцветий золотарников даже особями, гнезда которых расположены на значительном расстоянии от зарослей золотарников на рассматриваемом местопроизрастании.

Заключение

Структура сообществ (гильдий) антофильных жалоносных перепончатокрылых (Aculeata) – посетителей соцветий инвазивных золотарников *S. canadensis* L. s. l. в условиях Беларуси, установленная по результатам анализа данных для девяти участков местопроизрастаний на территории Минска, Минской и Могилёвской областей в аспектах видового богатства и относительного обилия отдельных видов, конкретна: на группы многочисленных и обычных видов приходится около 16 % видового богатства и 67 % совокупного обилия. В группу многочисленных видов вошли шмели *B. terrestris* L. и *B. lapidarius* L., в группу обычных видов – шмель *B. ruderarius* Müller, пчела *H. communis* Nyl., осы *Ph. triangulum* F., *P. dominula* Christ, *P. nimpha* Christ. В составе пыльцевого груза этих антофилов доля конспецифической пыльцы варьировалась от 83,43 до 96,95 % и у всех видов превышала долю неконспецифической пыльцы. Дифференциация конспецифической пыльцы на легко утрачиваемую, относительно легко утрачиваемую (доступны для трансфера и последующего опыления) и трудно утрачиваемую (фактически изъята из пула пыльцевых зерен) выявила преобладание в структуре пыльцевого груза важных фракций конспецифической пыльцы. Высокая доля конспецифической пыльцы, а также ее легко утрачиваемой

и относительно легко утрачиваемой фракций у многочисленных и обычных видов шмелей *B. terrestris*, *B. lapidarius* и *B. ruderarius* хорошо согласуется с их статусом эффективных опылителей энтомофильных растений.

Библиографические ссылки

1. Дубовик ДВ, Скуратович АН, Миллер Д, Спиридович ЕВ, Горбунов ЮН, Виноградова ЮК. Инвазионная активность *Solidago canadensis* на территории заказника «Прилепский» (Беларусь). *Nature Conservation Research. Zapovednaya nauka*. 2019; 4(2):48–56. На англ. DOI: 10.24189/ncr.2019.013.
2. Шмелев ВМ, Панкрушина АН. Особенности распространения инвазионных *Solidago* (Asteraceae) и их воздействие на природные виды. *Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология*. 2019;3:130–135. DOI: 10.26456/vtbio105.
3. Moron D, Lenda M, Skórka P, Szentgyörgyi H, Settele J, Woyciechowski W. Wild pollinator communities are negatively affected by invasion of alien goldenrods in grassland landscapes. *Biological Conservation*. 2009;142(7):1322–1332. DOI: 10.1016/j.biocon.2008.12.036.
4. Kajzer-Bonk J, Szpiłyk D, Woyciechowski M. Invasive goldenrods affect abundance and diversity of grassland ant communities (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Insect Conservation*. 2016;20(1):99–105. DOI: 10.1007/s10841-016-9843-4.
5. van Hengstum T, Hoofman DAP, Oostermeijer JGB, van Tienderen PH. Impact of plant invasions on local arthropod communities: a meta-analysis. *Journal of Ecology*. 2014;102(1):4–11. DOI: 10.1111/1365-2745.12176.
6. Дубовик ДВ, Дмитриева СА, Ламан НА, Лебедько ВН, Левкович АВ, Масловский ОМ и др. *Черная книга флоры Беларуси: чужеродные вредоносные растения*. Парфенов ВИ, Пугачевский АВ, редакторы. Минск: Беларуская навука; 2020. 407 с.
7. Тихомиров ВН, Ровенская ИА. Внутри- и межпопуляционная изменчивость *Solidago canadensis* L. s. l. в Беларуси. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;3:67–78. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-3-67-78.
8. Мотыль ММ, Гаранович ИМ. Разнообразие золотарника в Беларуси и биорациональные способы ограничения его инвазионного распространения. *Наука и инновации*. 2014;4:65–67.
9. Маевский ПФ. *Флора средней полосы европейской части России*. 11-е издание. Москва: Товарищество научных изданий КМК; 2014. 635 с.
10. Хвир ВИ. *Сообщества антофильных насекомых сорных и рудеральных растений. Комплексный подход в оценке эффективности опыления*. Саарбрюккен: Lambert Academic Publishing; 2010. 156 с.
11. Коротеева ДО. Жалоносные перепончатокрылые как опылители якобеи обыкновенной (*Jacobaea vulgaris* L.). В: Сафонов ВГ, главный редактор. *Материалы 76-й научной конференции студентов и аспирантов Белорусского государственного университета. Часть 1; 13–24 мая 2019 г.; Минск, Беларусь* [Интернет]. Минск: БГУ; 2019 [процитировано 21 марта 2022 г.]. с. 315–318. Доступно по: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/232629>.
12. Zurbuchen A, Landert L, Klaiber J, Müller A, Hein S, Dorn S. Maximum foraging ranges in solitary bees: only few individuals have the capability to cover long foraging distances. *Biological Conservation*. 2010;143(3):669–676. DOI: 10.1016/j.biocon.2009.12.003.
13. Тобиас ВИ, составитель. Надсемейство Vespoidea – складчатокрылые осы. В: Медведев ГС, редактор. *Определитель насекомых европейской части СССР. Том 3. Перепончатокрылые (часть 1)*. Ленинград: Наука; 1978. с. 147–173.
14. Осычнюк АЗ, Панфилов ДВ, Пономарева АА, составители. Надсемейство Apoidea – пчелиные. В: Медведев ГС, редактор. *Определитель насекомых европейской части СССР. Том 3. Перепончатокрылые (часть 1)*. Ленинград: Наука; 1978. с. 279–519.
15. Gokcezade JF, Gereben-Krenn B-A, Neumayer J, Krenn HW. *Feldbestimmungsschlüssel für die Hummeln Deutschlands, Österreichs und der Schweiz (Hymenoptera, Apidae)*. Leipzig: Quelle & Mayer; 2010. 42 S.
16. Песенко ЮА. *Принципы и методы количественного анализа в фаунистических исследованиях*. Москва: Наука; 1982. 288 с.
17. Белокобыльский СА, Лелей АС, редакторы. *Аннотированный каталог перепончатокрылых насекомых России. Том 1. Сидячебрюхие (Symphyla) и жалоносные (Arosrita: Aculeata)*. Санкт-Петербург: Зоологический институт Российской академии наук; 2017. 475 с. (Труды Зоологического института Российской академии наук; том 321, приложение 6). На англ. DOI: 10.31610/trudyzin/2017.supl.6.5.
18. Шейко АА, Коротеева ДО. Одиночные пчелиные (Hymenoptera: Apoidea) – эффективные опылители различных растений флоры Беларуси. В: Дерунков АВ, Кулак АВ, Прищепчик ОВ, редакторы. *Итоги и перспективы развития энтомологии в Восточной Европе. Сборник статей III Международной научно-практической конференции, посвященной памяти В. А. Цинкевича; 19–21 ноября 2019 г.; Минск, Беларусь*. Минск: Издатель А. Н. Варакин; 2019. с. 429–432.
19. Triponez Y, Arrigo N, Espíndola A, Alvarez N. Decoupled post-glacial history in mutualistic plant-insect interactions: insights from the yellow loosestrife (*Lysimachia vulgaris*) and its associated oil-collecting bees (*Macropis europaea* and *M. fulvipes*). *Journal of Biogeography*. 2015;42(4):630–640. DOI: 10.1111/jbi.12456.
20. Гринфельд ЭК. *Происхождение и развитие антофилии у насекомых*. Ленинград: Издательство Ленинградского университета; 1978. 208 с.
21. Herbertsson L, Khalaf R, Johnson K, Bygebjerg R, Blomqvist S, Persson AS. Long-term data shows increasing dominance of *Bombus terrestris* with climate warming. *Basic and Applied Ecology*. 2021;53:116–123. DOI: 10.1016/j.baec.2021.03.008.

References

1. Dubovik DV, Skuratovich AN, Miller D, Spiridovich EV, Gorbunov YuN, Vinogradova YuK. The invasiveness of *Solidago canadensis* in the reserve «Prilepsky» (Belarus). *Nature Conservation Research. Zapovednaya nauka*. 2019;4(2):48–56. DOI: 10.24189/ncr.2019.013.
2. Shmelev VM, Pankrushina AN. Spreading of invasive *Solidago* (Asteraceae) and their impact on native species. *Vestnik Tverskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya i ekologiya*. 2019;3:130–135. Russian. DOI: 10.26456/vtbio105.

3. Moron D, Lenda M, Skórka P, Szentgyörgyi H, Settele J, Woyciechowski W. Wild pollinator communities are negatively affected by invasion of alien goldenrods in grassland landscapes. *Biological Conservation*. 2009;142(7):1322–1332. DOI: 10.1016/j.biocon.2008.12.036.
4. Kajzer-Bonk J, Szpiłyk D, Woyciechowski M. Invasive goldenrods affect abundance and diversity of grassland ant communities (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Insect Conservation*. 2016;20(1):99–105. DOI: 10.1007/s10841-016-9843-4.
5. van Hengstum T, Hoofman DAP, Oostermeijer JGB, van Tienderen PH. Impact of plant invasions on local arthropod communities: a meta-analysis. *Journal of Ecology*. 2014;102(1):4–11. DOI: 10.1111/1365-2745.12176.
6. Dubovik DV, Dmitrieva SA, Laman NA, Lebed'ko VN, Levkovich AV, Maslovskii OM, et al. *Chernaya kniga flory Belarusi: chuzherodnye vredonosnye rasteniya* [Black book of the flora of Belarus: alien harmful plants]. Parfenov VI, Pugachevskii AV, editors. Minsk: Belaruskaja navuka; 2020. 407 p. Russian.
7. Tikhomirov VN, Ravenskaya IA. Intra- and interpopulation variability of *Solidago canadensis* L. s. l. in Belarus. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;3:67–78. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-3-67-78.
8. Motyl MM, Garanovich IM. [Goldenrod diversity in Belarus and biorational methods to limit its invasion]. *Nauka i innovatsii*. 2014;4:65–67. Russian.
9. Maevskii PF. *Flora srednei polosy evropeiskoi chasti Rossii* [Flora of middle part of European Russia]. 11th edition. Moscow: Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK; 2014. 635 p. Russian.
10. Khvir VI. *Soobshchestva antofil'nykh nasekomykh sornykh i ruderal'nykh rastenii. Kompleksnyi podkhod v otsenke effektivnosti opyleniya* [Communities of anthophilous insects and their interaction with weed ruderal plants. An integrated approach to assessing the effectiveness of pollination]. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing; 2010. 156 p. Russian.
11. Koroteeva DO. [Aculeata as *Jacobaea vulgaris* L. pollinators]. In: Safonov VG, chief editor. *Materialy 76-i nauchnoi konferentsii studentov i aspirantov Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Chast' 1; 13–24 maya 2019 g.; Minsk, Belarus* [Proceedings of the 76th scientific conference of students and postgraduate students of the Belarusian State University. Part 1; 2019 May 13–24; Minsk, Belarus] [Internet]. Minsk: Belarusian State University; 2019 [cited 2022 March 21]. p. 315–318. Available from: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/232629>. Russian.
12. Zurbuchen A, Landert L, Kläiber J, Müller A, Hein S, Dorn S. Maximum foraging ranges in solitary bees: only few individuals have the capability to cover long foraging distances. *Biological Conservation*. 2010;143(3):669–676. DOI: 10.1016/j.biocon.2009.12.003.
13. Tobias VI, compiler. [Superfamily Vespoidea – fold-winged wasps]. In: Medvedev GS, editor. *Opredelitel' nasekomykh evropeiskoi chasti SSSR. Tom 3. Pereponchatokrylye (chast' 1)* [Identification key for insects of the European part of the USSR. Volume 3. Hymenoptera (part 1)]. Leningrad: Nauka; 1978. p. 147–173. Russian.
14. Osychnyuk AZ, Panfilov DV, Ponomareva AA, compilers. [Superfamily Apoidea – bees]. In: Medvedev GS, editor. *Opredelitel' nasekomykh evropeiskoi chasti SSSR. Tom 3. Pereponchatokrylye (chast' 1)* [Identification key for insects of the European part of the USSR. Volume 3. Hymenoptera (part 1)]. Leningrad: Nauka; 1978. p. 279–519. Russian.
15. Gokcezade JF, Gereben-Krenn B-A, Neumayer J, Krenn HW. *Feldbestimmungsschlüssel für die Hummeln Deutschlands, Österreichs und der Schweiz (Hymenoptera, Apidae)*. Leipzig: Quelle & Mayer; 2010. 42 S.
16. Pesenko YuA. *Printsipy i metody kolichestvennogo analiza v faunisticheskikh issledovaniyakh* [Principles and methods of quantitative analysis in faunistic research]. Moscow: Nauka; 1982. 288 p. Russian.
17. Belokobyl'skij SA, Lelej AS, editors. *Annotated catalogue of the Hymenoptera of Russia. Volume 1. Symphyta and Apocrita: Aculeata*. Saint Petersburg: Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences; 2017. 475 p. (Proceedings of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences; volume 321, supplement 6). DOI: 10.31610/trudyzin/2017.supl.6.5.
18. Sheiko AA, Koroteeva DO. [Wild bees (Hymenoptera: Apoidea) as effective pollinators of various plants of Belarus]. In: Derunkov AV, Kulak AV, Prishchepchik OV, editors. *Itogi i perspektivy razvitiya entomologii v Vostochnoi Evrope. Sbornik statei III Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi pamyati V. A. Tsinkevicha; 19–21 noyabrya 2019 g.; Minsk, Belarus* [Results and prospects for the development of entomology in Eastern Europe. A collection of articles of the 3rd International scientific and practical conference dedicated to the memory of V. A. Tsinkevich; 2019 November 19–21; Minsk, Belarus]. Minsk: Izdatel' A. N. Varaksin; 2019. p. 429–432. Russian.
19. Triponez Y, Arrigo N, Espindola A, Alvarez N. Decoupled post-glacial history in mutualistic plant-insect interactions: insights from the yellow loosestrife (*Lysimachia vulgaris*) and its associated oil-collecting bees (*Macropis europaea* and *M. fulvipes*). *Journal of Biogeography*. 2015;42(4):630–640. DOI: 10.1111/jbi.12456.
20. Grinfeld EK. *Proiskhozhdenie i razvitie antofilii u nasekomykh* [The origin and development of anthophylite of insects]. Leningrad: Izdatel'stvo Leningradskogo universiteta; 1978. 208 p. Russian.
21. Herbertsson L, Khalaf R, Johnson K, Bygebjerg R, Blomqvist S, Persson AS. Long-term data shows increasing dominance of *Bombus terrestris* with climate warming. *Basic and Applied Ecology*. 2021;53:116–123. DOI: 10.1016/j.baec.2021.03.008.

Получена 09.05.2022 / исправлена 31.05.2022 / принята 31.05.2022.
Received 09.05.2022 / revised 31.05.2022 / accepted 31.05.2022.

УДК 577.11,543.544.3,543.51

ГАЗОВЫЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АЦЕТОНОВОГО ЭКСТРАКТА КОРНЕЙ *LACTUCA TATARICA* (L.) С. А. МЕУ.

Э. Н. ШУКЮРЛИ¹⁾

¹⁾Институт ботаники НАН Азербайджана,
Бадамдарское шоссе, 40, AZ1004, г. Баку, Азербайджан

Методом газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией изучены корни *Lactuca tatarica* (L.) С. А. Меу. В неочищенном экстракте, который получают из корней, обнаружено присутствие природных соединений различных групп. В результате из твердой массы объекта исследования идентифицированы 25 различных веществ, в том числе ациклические соединения (метилмиристал, метилпальмитат, этилпальмитат, метилэлаидат, метилстеарат, этилолеат и др.). Наиболее распространенными эфирами жирных кислот являются метилолеат (6,831 %) и метилпальмитат (2,902 %). Кроме того, выявлены характерные для *L. tatarica* тритерпеноидные соединения (ацетат лупеола, ацетат циклоартенола, ацетат 3 β ,13 β ,14 β -13,27-циклоурсан-3-ола), среди которых ацетат лупеола является преобладающим компонентом и составляет 56,35 % от общего количества полученных веществ. Также обнаружены элаидиновая кислота, бис(2-этилгексил)фталат и другие соединения. Некоторые идентифицированные вещества ранее были обнаружены у других видов рода *Lactuca* L., однако в *L. tatarica* они (ацетат лупеола, ацетат 3 β ,13 β ,14 β -13,27-циклоурсан-3-ола, ацетат олеан-12-ен-3-ила) впервые выявлены в рамках настоящего исследования, что делает его значимым с химической точки зрения. Изучаемое растение широко распространено во флоре низменных и приморских районов Азербайджана. Таким образом, полученные результаты открывают новые горизонты для будущих исследований в различных областях, в том числе и в фармацевтике.

Ключевые слова: эфиры жирных кислот; метод ГХ-МС; *Lactuca tatarica*; ацетат лупеола; тритерпеноид.

Образец цитирования:

Шукюрли Э.Н. Газовый хромато-масс-спектрометрический анализ ацетонового экстракта корней *Lactuca tatarica* (L.) С. А. Меу. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;2:82–87 (на англ.).
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-82-87>

For citation:

Shukurlu EN. Gas chromatography – mass spectrometry analysis of acetone extract of *Lactuca tatarica* (L.) С. А. Mey. roots. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;2:82–87.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-82-87>

Автор:

Эмиль Намик Шукюрли – младший научный сотрудник отдела растительных ресурсов.

Author:

Emil Namik Shukurlu, junior researcher at the department of plant resources.
geneticsster@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-2805-6298>

GAS CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY
ANALYSIS OF ACETONE EXTRACT
OF *LACTUCA TATARICA* (L.) C. A. MEY. ROOTSE. N. SHUKURLU^a^a*Institute of Botany, Azerbaijan National Academy of Sciences,
40 Badamdar Highway, Baku AZ1004, Azerbaijan*

Research work is devoted to the chemical investigation of the roots of the *Lactuca tatarica* (L.) C. A. Mey. by gas chromatography – mass spectrometry method. From the crude extract that is obtained from the roots, the presence of natural compounds of various groups has been detected. As a result, 25 different substances including acyclic compounds (methyl myristate, palmitic acid methyl ester, ethyl palmitate, methyl elaidate, methyl stearate, ethyl oleate, etc.) have been identified from the solid mass of the research object. The most abundant fatty acid esters are methyl oleate (6.831 %) and palmitic acid methyl ester (2.902 %). In addition, the triterpenoid compounds (lupeol acetate, cycloartenol acetate, 3 β ,13 β ,14 β -13,27-cycloursan-3-ol acetate) which are characteristic of the *L. tatarica* have been identified. Lupeol acetate is the predominant component which makes up 56.35 % of the whole obtained substances. Elaidic acid which belongs to the fatty acids group, bis(2-ethylhexyl)phthalate which belongs to the aromatic dicarboxylic acid esters and other compounds have also been identified. Among the identified substances, some are found previously from the other species of the genus *Lactuca* L. but with regards to the *L. tatarica* to the best of our knowledge the majority of them are firstly being reported in this study. The investigated plant is widespread in the lowlands and coastal areas of Azerbaijani flora. The availability of some pharmacological effective compounds (lupeol acetate, 3 β ,13 β ,14 β -13,27-cycloursan-3-ol acetate, olean-12-en-3-yl acetate) makes the research significant in terms of chemical aspect. Therefore, the results of this investigation open up new horizons for future studies in various fields including the pharmaceutical one.

Keywords: fatty acid esters; GC-MS method; *Lactuca tatarica*; lupeol acetate; triterpenoid.

Introduction

Increasing demand of herbal medicines puts chemical investigation of plants forward. The presence of pharmacological active substances in triterpenoid derivatives and their wide distribution in species of Asteraceae makes their research important [1]. The genus *Lactuca* L. (Asteraceae Bercht. & J. Presl) is characterised by the presence of sesquiterpene lactones [2]. Also 15 species in the Caucasus and 10 species in Azerbaijani flora have been found of the genus *Lactuca* L. [3, p. 551–557]. *Lactuca tatarica* is a perennial bare plant, stalk is straight, simple panicle branched inflorescence, 5–50 cm tall. Sessile leaves, lanceolate in outline, notched pinnate into triangular whole-marginal or short-edged, back facing lateral lobes, upper lobe usually elongated. Outer leaves are lanceolate, inner from a triangular base. In Azerbaijan *L. tatarica* is distributed in Caspian seashores, Absheron – Kur – Araz lowlands, Lankaran, in slightly saline grounds, along coastal sands [3, p. 551–557]. In terms of its chemical substances, plants of the genus *Lactuca* L. have been found to produce sesquiterpene lactones, including guaianolides, along with germacranolides and eudesmanolides [4]. Still lack of chemical research of *Lactuca* species performed in Azerbaijan.

Traditionally *L. tatarica* has been used in folk medicine, such as decoction of whole plant was used for joint pains [5]. Its leaves used for headache, internal wounds, fever and vomiting in Indian folk medicine [6]. In China, its whole herb has been used as a folk medicine for the cure of some ailments, including erysipelas, extravasated blood, appendicitis, red leucorrhea properties and abdominal distension [7].

In general, sesquiterpene lactones and their various derivatives (sesquiterpene lactone glycosides contained guaianolide and germacrolide derivatives) have been extracted from *L. tatarica* plant species according to the world literature findings [8]. From the roots of the *L. tatarica* lactucopicrin, 8-deoxylactucin, crepidiaside B, jacquinelin, lactucin, 11 β ,13-dihydrolactucin, vernoflexuoside (glucozaluzanin C) and lactuside A are obtained [9]. Tataroside, a germacrolide glucoside, was isolated from the roots of *L. tatarica* [10]. 11 β H,13-dihydrolactucin-8-O-*p*-methoxyphenylacetate, picriside C, sonchuside A, 11 β H,13-dihydroglucozaluzanin C, benzyl- β -glucopyranoside, cichorioside B, macrocliniside A and ixerin F were isolated from the roots of *L. tatarica* [8]. Additionally, deacetylmatricarin, 2-oxo-11 β ,13-dihydrosantamarin and 11 β ,13-dihydrosantamarin have been isolated from the whole part of the respective plant [11].

L. tatarica is rich in flavonoids, triterpenoids and sesquiterpene lactones and some of these compounds are medically effective. Therefore, the goal of this research is the determination of chemical components of roots of *L. tatarica* which is omnipresent in Southern Caucasus region. A brief description of the investigation of the issue and justification of the novelty of the questions that the author considers in the article are given.

Materials and research methods

Collection of plant material. As a research object roots of the *L. tatarica* were collected on summer (2017) during the blossoming period, from the Shabran region (41°12' 32.9"N; 48°58' 08.2"E). They have been chopped into small pieces and dried at room temperature.

Preparation of extracts. A portion of small-scale chopped and dried research object (820 g) has been extracted with acetone at room temperature for nine days [12]. The extract was decanted, filtered and concentrated by rotary evaporator on the water bath (evaporator model: ROVA-N2L (MRC, Israel); water bath model: WB-2000 (ANM Industries, India)). Also 10.2 g dried extract were obtained and extraction percentage was 1.24 %. Extractive substances have been separated into fractions through the column chromatography.

Column chromatography. As a mobile phase *n*-hexane-benzene in the volume ratio of 1 : 1 was used and the respective extract was separated into fractions by silica gel (mesh 70–230 (i. e., 63–200 μm); pore size 60 Å) which was the stationary phase. The column was eluted with abovementioned solvent, collecting 100 mL fractions, a total of 62 fractions. Each 100 mL fraction (in some cases more than 2 fractions were gathered together) was collected in a 250 mL flask and the solvent was evaporated under reduced pressure using a rotary evaporator. Substances that are obtained from the 13–16th fractions then solidified in *n*-hexane-benzene (in the volume ratio of 1 : 1) solution. Weight of the solid mass was 0.04 g.

Thin layer chromatography (TLC). As a solvent for TLC analysis benzene was used. Visualisation of spots was conducted by chromatoscope. TLC plates (Silufol UV-254, Kavalier, Czech) were observed under UV light at 366 nm. Solid mass was found to have a polycomponent nature during the TLC analysis. Therefore, qualitative and quantitative analysis of solid mass precipitated from the 13–16th fractions was performed using gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) method and its spectrum confirmed the presence of different components.

GC-MS analysis. GC-MS analysis has been performed as described previously by Shukurlu [13]. Gas chromatography – mass spectra were obtained using an Agilent Technologies 6890 N (USA) network GC system equipped with an Agilent Technologies 5975 inert mass selective detector. Compound identification has been conducted using the NIST library database (the NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (version 2.0.g) build 19 May 2011). The statistical analysis has not been carried out in this research.

Results and discussion

The GC-MS spectrum illustrated in figure and totally 25 different compounds were identified. As shown in the table, the main characteristic compounds of the 13–16th fractions are triterpenoids. The triterpenoid profile of *L. tatarica* was characterised by the high concentrations of lupeol acetate (56.35 %), 3β,13β,14β-13,27-cyclo-ursan-3-ol acetate (20.31 %), while the lowest amounts were detected for olean-12-en-3-yl acetate (1.92 %) and cycloartenol acetate (1.11 %). The following fatty acid esters have been obtained: methyl myristate, methyl palmitoleate, palmitic acid methyl ester, ethyl palmitate, methyl linoleate, methyl oleate, methyl elaidate, methyl stearate, methyl linolelaidate, ethyl-9,12-octadecadienoate, ethyl oleate, methyl 9-*cis*,11-*trans*-octadecadienoate, 10,13-eicosadienoic acid methyl ester, 11-eicosenoic acid methyl ester, methyl arachisate, oleic acid 3-hydroxypropyl ester, bis(2-ethylhexyl)sebacate. Among them the highest abundant ones are methyl oleate (6.831 %), palmitic acid methyl ester (2.902 %), methyl linoleate (2.826 %) and the least abundant ones are 10,13-eicosadienoic acid methyl ester (0.075 %) and methyl myristate (0.047 %). Elaidic acid (0.303 %) which is a monounsaturated *trans* fatty acid is identified. The other identified compounds are phthalic acid butyl hept-4-yl ester (belongs to aromatic dicarboxylic acid esters); bis(2-ethylhexyl)phthalate (belongs to aromatic dicarboxylic acid derivatives) and a diterpene 4-(3-hydroxy-3-methylpentyl)-3,4a,8,8-tetramethyldecahydro-1-naphthalenol are obtained. To the best of our knowledge, the fatty acid profile of the roots *L. tatarica* has never been reported previously.

Compounds identified in the crystalline mass obtained from the 13–16th fractions by column chromatography from the roots of *L. tatarica* by GC-MS method

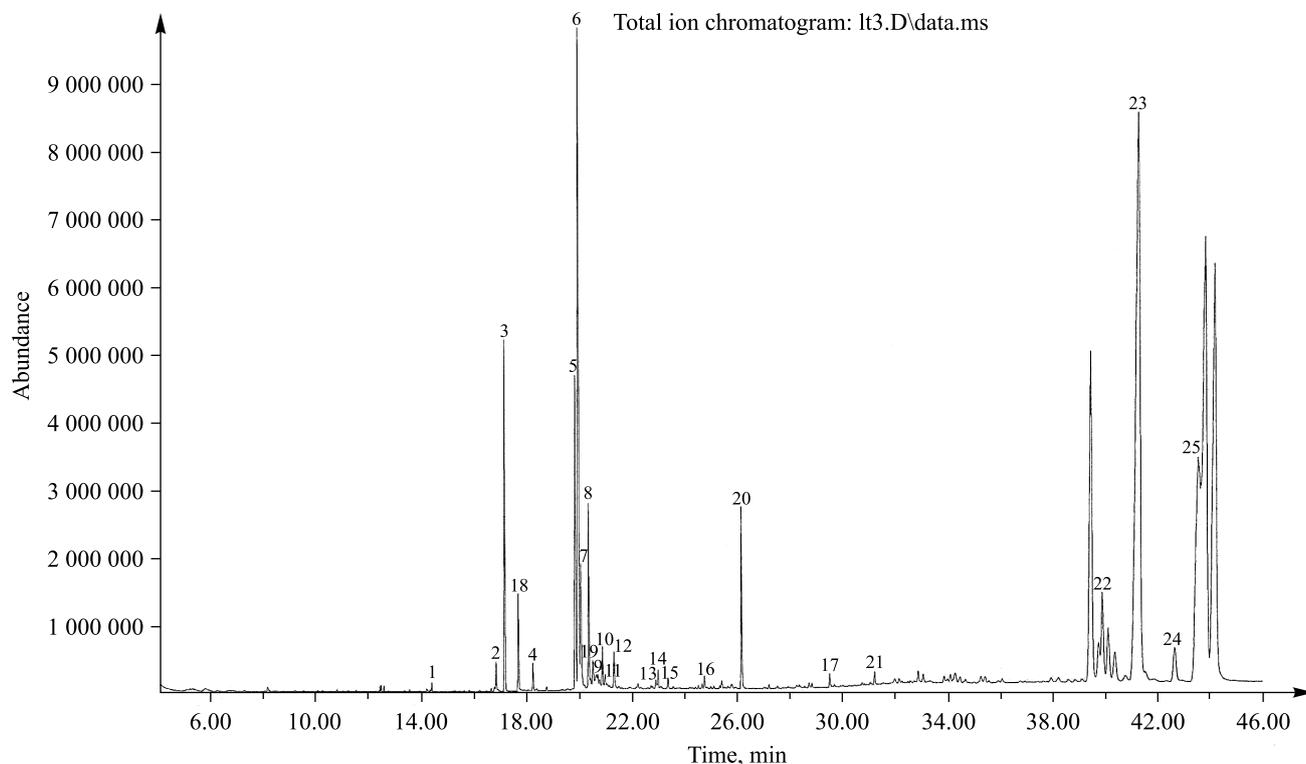
Peak	Retention time, min	Fragments	Molecular weight, g/mol	Name	Percentage of total
<i>Fatty acid esters</i>					
1	14.392	143, 88, 75, 69, 57, 55, 43, 41, 29	242	Methyl myristate	0.047
2	16.824	98, 97, 88, 84, 75, 70, 56, 42	268	Methyl palmitoleate	0.256
3	17.155	227, 143, 88, 75, 69, 57, 55, 43, 41	270	Palmitic acid methyl ester	2.902

Ending table

Peak	Retention time, min	Fragments	Molecular weight, g/mol	Name	Percentage of total
4	18.214	102, 89, 73, 69, 57, 55, 43, 41, 29	284	Ethyl palmitate	0.214
5	19.825	109, 96, 83, 82, 79, 68, 56, 41	294	Methyl linoleate	2.826
6	19.952	98, 96, 87, 84, 75, 70, 56, 43, 41	296	Methyl oleate	6.831
7	20.032	98, 96, 87, 84, 75, 70, 56, 43, 42	296	Methyl elaidate	1.373
8	20.329	298, 143, 88, 75, 69, 57, 55, 43, 41	298	Methyl stearate	1.534
9	20.618	96, 82, 81, 79, 68, 56, 43, 42, 29	294	Methyl linolelaidate	0.297
10	20.852	96, 83, 82, 69, 68, 56, 55, 42	308	Ethyl-9,12-octadecadienoate	0.312
11	20.949	101, 97, 96, 89, 84, 70, 56, 44, 42	310	Ethyl oleate	0.082
12	21.288	109, 96, 82, 79, 69, 68, 55	294	Methyl 9- <i>cis</i> ,11- <i>trans</i> -octadecadienoate	0.375
13	22.887	109, 97, 96, 83, 82, 69, 68, 70, 56, 41	322	10,13-Eicosadienoic acid methyl ester	0.075
14	22.976	292, 98, 96, 84, 74, 70, 67, 56	324	11-Eicosenoic acid methyl ester	0.165
15	23.359	326, 143, 88, 75, 57, 55, 44, 41	326	Methyl arachisate	0.095
16	24.746	265, 99, 81, 70, 67, 60, 57, 44, 42, 31	340	Oleic acid 3-hydroxypropyl ester	0.091
17	29.507	186, 112, 98, 83, 71, 70, 58, 55, 43, 41	426	Bis(2-ethylhexyl)sebacate	0.124
<i>Aromatic dicarboxylic acid ester</i>					
18	17.663	224, 206, 151, 150, 104, 98, 76, 57, 56, 41	320	Phthalic acid butyl hept-4-yl ester	0.765
<i>Monounsaturated trans fatty acid</i>					
19	20.491	98, 96, 84, 70, 57, 56, 43	282	Elaidic acid	0.303
<i>Aromatic dicarboxylic acid derivative</i>					
20	26.163	279, 167, 150, 71, 70, 57, 55, 43, 41	390	Bis(2-ethylhexyl)phthalate	1.505
<i>Diterpenoid</i>					
21	31.210	190, 154, 137, 136, 124, 110, 96, 83, 70, 56	310	4-(3-Hydroxy-3-methylpentyl)-3,4a,8,8-tetramethyldecahydro-1-naphthalenol	0.123
<i>Triterpenoids</i>					
22	39.863	219, 203, 189, 136, 110, 96, 82, 69, 44	468	Olean-12-en-3-yl acetate	1.925
23	41.323	190, 121, 110, 108, 96, 94, 82, 70, 56, 44	468	Lupeol acetate	56.35
24	42.644	121, 109, 107, 95, 93, 81, 70, 55, 44, 42	468	Cycloartenol acetate	1.113
25	43.576	469, 206, 139, 136, 124, 122, 110, 96, 70, 44	468	13,27-cycloursan-3-ol, acetate, (3 β ,13 β ,14 β)-	20.314

Lupeol acetate has been isolated from the aerial parts of *Lactuca sativa* L. [14] and from *L. denticulata* [15]. Olean-12-en-3-yl acetate was obtained from the leaves of *L. sativa* L. [16].

As a fatty acid ester methyl palmitoleate, methyl linoleate, palmitic acid methyl ester have been isolated from *L. saligna* L. [17]. Methyl oleate and palmitic acid methyl ester are also found in the seeds of *L. tatarica* [18]. Methyl myristate, methyl oleate, palmitic acid methyl ester, methyl linoleate, methyl stearate, methyl arachisate have been obtained from the seeds of *L. sativa* L. [19].



GC-MS chromatogram of crystalline mass obtained from the 13–16th fractions by column chromatography from the roots of *L. tatarica*

Among these components lupeol acetate, $3\beta,13\beta,14\beta$ -13,27-cycloursan-3-ol acetate and olean-12-en-3-yl acetate are pharmacologically effective substances. Lupeol acetate has an antiarthritic effect [20]. Obtained pentacyclic triterpenoid $3\beta,13\beta,14\beta$ -13,27-cycloursan-3-ol acetate possesses antibacterial, antioxidant and anticarcinogenic properties [21]. Olean-12-en-3-yl acetate has an antiinflammatory, antidepressant and anticancer activity [22]. Due to the availability of pharmacological active components in *L. tatarica* roots, it can be recommended for further investigations onto the respective area.

Conclusion

In this study, the chemical investigation of *L. tatarica* root extract was performed using column chromatography and GC-MS technique. Briefly 25 components are identified (4 of them belong to triterpenoids, whereas 17 of them are defined as fatty acid esters, 1 of them is aromatic dicarboxylic acid ester, 1 is monounsaturated trans fatty acid, 1 is aromatic dicarboxylic acid derivative and 1 belongs to the diterpenoid group). In accordance with the literature data, there is a lack of information on this species. Acquired outcomes, together with the previous information, could support further investigations, including in the pharmaceutical area.

References

1. Muley BP, Khadabadi SS, Banarase NB. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (*Asteraceae*): a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2009;8(5):455–465. DOI: 10.4314/tjpr.v8i5.48090.
2. Khalil AT, Abd El-Fattah H, Mansour ES. Guaianolides from *Lactuca saligna*. *Planta Medica*. 1991;57(2):190–191. DOI: 10.1055/s-2006-960064.
3. Karyagin II, editor. *Flora Azerbaidzhana. Tom 8. Rubiaceae – Compositae* [Flora of Azerbaijan. Volume 8. *Rubiaceae – Compositae*]. Askerova RK, Akhundov GF, Isaev YaM, Karyagin II, Irilipko LI, Sofieva RM, compilers. Baku: Publishing House of the Academy of Sciences of the Azerbaijan SSR; 1961. 690 p. Russian.
4. Beharav A, Ben-David R, Malarz J, Stojakowska A, Michalska K, Doležalová I, et al. Variation of sesquiterpene lactones in *Lactuca aculeata* natural populations from Israel, Jordan and Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2010;38(4):602–611. DOI: 10.1016/j.bse.2010.07.007.
5. Devi U, Seth MK, Sharma P, Rana JC. Study on ethnomedicinal plants of Kibber Wildlife Sanctuary: a cold desert in Trans Himalaya, India. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2013;7(47):3400–3419. DOI: 10.5897/JMPR2013.5298.
6. Namtak S, Sharma RC. Medicinal plant resources in Skuru watershed of Karakoram wildlife sanctuary and their uses in traditional medicines system of Ladakh, India. *International Journal of Complementary & Alternative Medicine*. 2018;11(5):294–302. DOI: 10.15406/ijcam.2018.11.00415.

7. Wu ZY. *Xinhua Bencao Gangyao*. Shanghai: Science Technical Publishing Press; 1990. 435 p.
8. Kisiel W, Barszcz B, Szneler E. Sesquiterpene lactones from *Lactuca tatarica*. *Phytochemistry*. 1997;45(2):365–368. DOI: 10.1016/S0031-9422(96)00820-5.
9. Michalska K, Stojakowska A, Malarz J, Doležalová I, Lebeda A, Kisiel W. Systematic implications of sesquiterpene lactones in *Lactuca* species. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2009;37(3):174–179. DOI: 10.1016/j.bse.2009.02.001.
10. Kisiel W, Barszcz B. A germacrolide glucoside from *Lactuca tatarica*. *Phytochemistry*. 1998;48(1):205–206. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)01106-0.
11. Wang X-X, Gao X, Jia Z-J. Sesquiterpenoids from *Lactuca tatarica*. *Fitoterapia*. 2010;81(1):42–44. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.07.001.
12. Serkerov SV, Kasumova GK, Jahangirova IR. Study of qualitative composition of chemical components of leaves and fruits *Laser trilobum* L. by gas chromatography – mass spectrometry. *Plant & Fungal Research*. 2018;1(1):33–37. DOI: 10.29228/plantfungales.30.
13. Shukurlu EN. Chemical content of *Lactuca serriola* L.: fatty acid esters and triterpene compounds from the roots. *Plant & Fungal Research*. 2020;3(1):61–65. DOI: 10.29228/plantfungales.70.
14. Mahmoud ZF, Kassem FF, Abdel-Salam NA, Zdero C. Sesquiterpene lactones from *Lactuca sativa*. *Phytochemistry*. 1986;25(3):747–748. DOI: 10.1016/0031-9422(86)88039-6.
15. Hui WH, Lee WK. Triterpenoid and steroid constituents of some *Lactuca* and *Ageratum* species of Hong Kong. *Phytochemistry*. 1971;10(4):899–901. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)97171-1.
16. Mughrbi HN, Auzi AA. *Lactuca sativa* stems as the source of bioactive compounds as well as the leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2020;8(5):143–150. DOI: 10.17265/2328-2150/2020.05.003.
17. Abd El-Fattah H, Khalil AT, Mansour ES, Waight ES. Triterpenes and triterpene esters from *Lactuca saligna*. *International Journal of Pharmacognosy*. 1992;30(1):21–26. DOI: 10.3109/13880209209054625.
18. Shukurlu EN, Vitalini S, Iriti M, Garzoli S. Chemical characterization by GC/MS analysis of *Lactuca tatarica* (L.) C. A. Mey. aerial parts and seeds. *Natural Product Research* [Internet]. 2021 November 11 [cited 2021 November 11]. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2021.2003356?scroll=top&needAccess=true>. DOI: 10.1080/14786419.2021.2003356.
19. Afsharypuor S, Ranjbar M, Mazaheri M, Shakibaei F, Aslani A. Analysis of fatty acid composition of crude seed oil of *Lactuca sativa* L. by GC-MS and GC methods. *Trends in Pharmaceutical Sciences*. 2018;4(2):95–98.
20. Kweifio-Okai G, Carroll AR. Antiarthritic effect of lupeol acetate. *Phytotherapy Research*. 1993;7(2):213–215. DOI: 10.1002/ptr.2650070227.
21. Jacob DR, Viganini N. Radical scavenging activity and *in vitro* anticarcinogenic potential of dried and powdered mangosteen (*Garcinia mangostana*) Pericarp. *International Journal of Scientific Research*. 2016;5(10):255–258.
22. Eswaraiah G, Peele KA, Krupanidhi S, Indira M, Kumar RB, Venkateswarulu TC. GC-MS analysis for compound identification in leaf extract of *Lumnitzera racemosa* and evaluation of its *in vitro* anticancer effect against MCF7 and HeLa cell lines. *Journal of King Saud University – Science*. 2020;32(1):780–783. DOI: 10.1016/j.jksus.2019.01.014.

Received 09.04.2022 / revised 15.06.2022 / accepted 21.06.2022.

ПАМЯТИ УЧЕНОГО

TO THE MEMORY OF SCIENTIST



**Василий Васильевич
КАРПУК**

**Vasilii Vasil'evich
KARPUK**

23 января 2022 г. на 68-м году жизни безвременно скончался доктор биологических наук профессор кафедры ботаники биологического факультета БГУ Василий Васильевич Карпук – замечательный ученый и талантливый исследователь, внесший большой вклад в понимание механизмов иммунитета и фитохимию лекарственных растений.

В. В. Карпук родился 25 апреля 1954 г. в д. Кустын Брестского района Брестской области в семье железнодорожных служащих. Он был старшим из трех сыновей. Чтобы содержать семью, родители были вынуждены после ночной смены в Бресте днем работать в колхозе. На старшего сына Василия возлагалась забота о доме и младших братьях. Он должен был принимать серьезные продуманные решения и в отсутствие родителей полагаться только на свои силы. Как-то зимой в метель, когда родители были на работе, ему, ученику второго класса, пришлось вечером идти 3 км через поле, чтобы вызвать врача для брата с очень высокой температурой.

В детстве Василий Васильевич был очень внимательным и успешным грибником. Он находил

грибы, мимо которых проходили другие, не замечая их. В будущем микология, наука о грибах, станет его профессией.

Девятый и десятый классы В. В. Карпук оканчивал в Мотыкальской средней школе, которая находилась в 10 км от его дома. Василий Васильевич ходил более 2 км до автобусной остановки к 7:30 утра в любую погоду. Когда были снежные заносы, автобусы переставали курсировать, и он добирался пешком к 6:30 утра до пригородного поезда Высоко-Литовск – Брест. В 1971 г., несмотря на все трудности, В. В. Карпук окончил школу с отличием.

В 1972 г. он поступил на биологический факультет БГУ, который успешно окончил в 1977 г., защитив дипломную работу под руководством профессора кафедры ботаники А. С. Шуканова и доцента кафедры физиологии растений Л. В. Кахнович. Это была первая для В. В. Карпука попытка рассмотреть проблемы патологии растения с позиции физиологии растительного организма. В том же году Василий Васильевич начал работать в лаборатории физиологии большого растения Института

экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича АН БССР, которой заведовала физиолог-фитопатолог, доктор биологических наук, профессор З. Я. Серова. В 1980 г. В. В. Карпук женился на Алле Валентиновне Макаревич, у них родился сын Александр.

В 1981 г. Василий Васильевич прошел по конкурсу в целевую аспирантуру Главного ботанического сада АН СССР в Москве. Ему пришлось оставить в Минске жену и маленького ребенка, о которых он очень заботился и которым всегда был предан.

В Москве Василий Васильевич полностью окунулся в исследовательскую работу, не жалея ни времени, ни сил. Он внимательно следил за научной литературой, много работал экспериментально, благодаря чему стал эрудированным специалистом в своей области. В. В. Карпук был очень требователен к себе, проверяя и перепроверяя полученные данные. Научная истина для него была превыше всего.

Результатом стала успешная защита диссертации «Цитофизиологические особенности взаимоотношений растения-хозяина и патогена при поражении ржи и пшеницы стеблевой ржавчиной» на соискание ученой степени кандидата биологических наук в 1986 г. Руководителями диссертационной работы В. В. Карпука были член-корреспондент РАН Л. Н. Андреев и доктор биологических наук Ю. М. Плотникова. В 1986 г. Василий Васильевич возвратился в Минск в лабораторию физиологии большого растения Института экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича АН БССР. Почти сразу после возвращения В. В. Карпук был мобилизован и на 3 месяца направлен на ликвидацию чернобыльской аварии во главе подразделения из 12 человек. Они работали в пределах опасной 10-километровой зоны. Василию Васильевичу тогда было 32 года. По возвращении из Чернобыля у него начались проблемы со здоровьем, на которые Василий Васильевич старался не обращать внимания, отдавая себя исследовательской работе и заботе о семье. Живой интерес к научному поиску, огромная работоспособность, упорство в достижении результатов всегда выделяли его среди молодых специалистов.

Василий Васильевич исследовал взаимоотношения патогенных грибов с клетками растения-хозяина у наиболее вредоносных болезней культурных злаков, возбудителей стеблевой ржавчины пшеницы (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) и ржи (*P. graminis* f. sp. *secalis*). Он сделал крупный вклад в понимание механизмов структурной интеграции растений и грибов в патосистемах и закономерностей их формирования. Проанализировав различия

в механизмах некротрофного и биотрофного паразитизма, В. В. Карпук доказал, что сбалансированность совместного существования гриба и растения достигается при биотрофном типе отношений между ними. Изменение или прекращение сопряженности метаболических процессов ведет к прекращению биотрофных и началу некротрофных отношений. Василий Васильевич подчеркивал ведущую роль экзо- и эндоцитоза в развитии взаимоотношений патогена и растения-хозяина.

В. В. Карпук выявил участие гидролитических ферментов в ступенчатой деградации липидов при прорастании уредоспор и дифференциации инфекционных структур возбудителей ржавчины пшеницы и ржи *in vitro* и *in vivo*. Он доказал, что утилизация запасных веществ спор патогенных грибов при прорастании и дифференциации инфекционных структур обеспечивает им трофическую автономность от хозяина на период, необходимый для установления паразитических отношений и перехода грибов на альтернативный метаболический путь питания за счет клеток растения.

В 2000 г. В. В. Карпук защитил диссертацию «Структурная организация патогенеза злаков, вызываемого грибной инфекцией» на соискание ученой степени доктора биологических наук.

Будучи зрелым и признанным ученым в своей области, Василий Васильевич успешно совершил крутой поворот в своей карьере и стал известным специалистом, педагогом, автором учебных пособий для университетов. В 2001 г. В. В. Карпук перешел для работы на новый факультет фундаментальной и нетрадиционной медицины БГУ, с 2001 по 2006 г. являлся доцентом кафедры фармации. С 2006 г. и до конца жизни Василий Васильевич работал на кафедре ботаники биологического факультета БГУ. Здесь он читал общие курсы «Растениеводство» и «Фармакогнозия» для студентов биологического факультета, а также в течение 3 лет для студентов химического факультета по вновь открывшимся специальностям «химия (фармацевтическая деятельность)» и «химия лекарственных соединений». Для обоих курсов им были написаны учебные пособия¹. Кроме того, Василий Васильевич проводил лабораторные занятия по курсу «Фармакогнозия», летнюю ботаническую практику, руководил курсовыми и дипломными работами, входил в состав государственной экзаменационной комиссии. Под его руководством выполнены ряд дипломных работ по фитохимии лекарственных растений, научно-исследовательская тема «Фитохимическое изучение произрастающих в Беларуси и культивируемых суккулентных растений как продуцентов биологически активных веществ».

¹Растениеводство : учеб. пособие для студентов учреждений высш. образования по биол. специальностям / В. В. Карпук, С. Г. Сидорова. Минск : БГУ, 2011. 352 с. ; Карпук В. В. Фармакогнозия : учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений по биол. специальностям. Минск : БГУ, 2011. 340 с.

Как авторитетный ученый, В. В. Карпук входил в экспертную группу ВАК Беларуси, был членом ряда советов по защите диссертаций по специальностям «защита растений», «физиология и биохимия растений», «ботаника», «экология». Также он входил в состав программных комитетов международных научных конференций «Актуальные проблемы изучения и сохранения фито- и микобиоты» (2014, 2021).

В. В. Карпук – автор более 115 научных и учебно-методических работ, в том числе коллективной монографии «Структурные основы системы иммунитета злаков»².

Особым эмоциональным увлечением Василия Васильевича была музыка, а народные песни род-

ной Брестчины и мелодичные украинские песни трогали его до глубины души.

В последние годы В. В. Карпук стал работать с архивами семьи и собрал много материалов о своей родословной.

Василия Васильевича ценили на кафедре за его эрудицию, добросердечие, умение поддерживать хорошие отношения в коллективе.

В. В. Карпук был истинным ученым, преданным науке до последнего дыхания, и новатором в науке. Его идеи, которыми он охотно делился с коллегами, будут жить и претворяться в жизнь будущими поколениями ученых.

*В. В. Демидчик³, Ю. М. Плотникова⁴,
М. В. Карпук⁵, В. Н. Тихомиров⁶, В. Д. Поликсенова⁷*

²Карпук В. В. Структурные основы системы иммунитета злаков // Физиология патогенеза и болезнеустойчивости растений : монография / А. П. Вольнец [и др.] ; науч. ред. В. Н. Решетников. Минск : Беларус. навука, 2016. С. 100–155.

³Вадим Викторович Демидчик – член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, доцент; декан биологического факультета Белорусского государственного университета.

Vadim V. Demidchik, corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (biology), docent; dean of the faculty of biology, Belarusian State University.

E-mail: dzemidchik@bsu.by

⁴Юлия Марковна Плотникова – доктор биологических наук, профессор; независимый исследователь (Москва, Россия).

Yuliya M. Plotnikova, doctor of science (biology), full professor; independent researcher (Moscow, Russia).

⁵Михаил Васильевич Карпук – кандидат физико-математических наук; независимый исследователь (Минск, Беларусь).

Michael V. Karpuk, PhD (physics and mathematics); independent researcher (Minsk, Belarus).

⁶Валерий Николаевич Тихомиров – кандидат биологических наук, доцент; заведующий кафедрой ботаники биологического факультета Белорусского государственного университета.

Valery N. Tikhomirov, PhD (biology), docent; head of the department of botany, faculty of biology, Belarusian State University.

E-mail: tikhomirov_v_n@list.ru

⁷Валентина Дмитриевна Поликсенова – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент; доцент кафедры ботаники биологического факультета Белорусского государственного университета.

Valentina D. Polyksenova, PhD (agricultural sciences), docent; associate professor at the department of botany, faculty of biology, Belarusian State University.

E-mail: polyksenova@gmail.com

АННОТАЦИИ ДЕПОНИРОВАННЫХ В БГУ РАБОТ INDICATIVE ABSTRACTS OF THE PAPERS DEPOSITED IN BSU

УДК 574(075.8)+502.171(075.8)

Гричик В. В. Экология и рациональное природопользование [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)» / В. В. Гричик ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2021. 118 с. : ил. Библиогр.: с. 117–118. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/276061>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 21.02.2022, № 001521022022.

Электронный учебно-методический комплекс предназначен для студентов специальности 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», включает в себя разделы: теоретический, контроля знаний и вспомогательный, содержащий учебно-программные материалы и список рекомендованной литературы. Курс «Экология и рациональное природопользование» предполагает изучение основных разделов современной экологии, включая ее прикладные аспекты и анализ глобальных и региональных экологических проблем.

УДК 577.1.087(075.8)

Новиков Д. А. Прикладная биохимия [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 80 11 «Биохимия» / Д. А. Новиков ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2022. 172 с. : ил. Библиогр.: с. 171–172. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/277181>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 30.03.2022, № 003030032022.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальности 1-31 80 11 «Биохимия». Содержание ЭУМК предполагает формирование и развитие у магистрантов представлений о методах современной биохимии, получивших широкое применение в различных областях производства, медицины, судебной экспертизы, формировании навыков самостоятельного проведения аналитических исследований с использованием современных методов биохимии. Дисциплиной предусмотрено выполнение практических работ, направленных на овладение комплексом знаний и умений для решения научных и прикладных задач в области прикладной биохимии.

УДК 576.3(075.8)+611.018(075.8)

Цитология и гистология [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец.: 1-31 01 01 «Биология», 1-31 01 02 «Биохимия», 1-33 01 01 «Биоэкология», 1-31 01 03 «Микробиология» / БГУ ; сост.: С. В. Глушен, В. В. Гринев, Ю. И. Кожуро. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2022. 110 с. : табл. Библиогр.: с. 109–110. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/277791>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 13.04.2022, № 004113042022.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальностей 1-31 01 01 «Биология», 1-31 01 02 «Биохимия», 1-33 01 01 «Биоэкология» и 1-31 01 03 «Микробиология» биологического факультета Белорусского государственного университета. Предлагаемый ЭУМК включает изучение техники микроскопии клеток и тканей, структурно-функциональной организации эукариотической клетки на уровне субклеточных органелл и макромолекулярных комплексов, разнообразия клеток, их дифференцировку и объединение в надклеточные ансамбли – ткани.

УДК 615.3.07(075.8)

Анализ и контроль качества лекарственных средств [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 02 «Биохимия» / БГУ ; сост. С. В. Гриневич. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2022. 39 с. : ил. Библиогр.: с. 38–39. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/278775>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 28.04.2022, № 004528042022.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальности 1-31 01 02 «Биохимия». Содержание ЭУМК предполагает изучение следующих вопросов: общих понятий (лекарственные средства, фармацевтические субстанции, биологически активные вещества), источников и способов получения лекарственных средств, принципов классификации лекарственных средств, используемых в фармацевтической химии, современных требований к лекарственным средствам

(безопасность, эффективность и качество), физических свойств лекарственных веществ, химических методов идентификации, нормативной документации, регламентирующей качество лекарственных средств, пробоотбора и пробоподготовки, методов аналитической химии и биохимии, применяемых в анализе лекарственных средств.

УДК 577.204(075.8)+576.33.04(075.8)

Качан А. В. Молекулярные механизмы биосигнализации [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 80 01 «Биология» профилизации «Функциональная биология» / А. В. Качан, Е. А. Николайчик, А. М. Ходосовская ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2022. 104 с. : ил. Библиогр.: с. 103–104. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/278910>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 05.05.2022, № 004705052022.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов магистратуры, обучающихся по специальности 1-31 80 01 «Биология» профилизации «Функциональная биология».

Содержание ЭУМК предполагает изучение наиболее актуальных вопросов молекулярной биологии передачи сигналов в клетках прокариот, растений и животных. ЭУМК включает также практический раздел, содержащий задания, позволяющие студентам провести самостоятельный анализ результатов экспериментов. На практических занятиях также закрепляется материал, изложенный в ходе лекций. Раздел контроля знаний призван облегчить подготовку к итоговой аттестации по дисциплине.

УДК 579.011(075.8)

Методология микробиологических исследований [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 80 12 «Микробиология» профилизации «Фундаментальная и прикладная микробиология» / БГУ ; сост. М. И. Мандрик. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2022. 35 с. : ил. Библиогр.: с. 29–30. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/278995>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 10.05.2022, № 004810052022.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов 2-й степени высшего образования специальности 1-31 80 12 «Микробиология» (профилизация «Фундаментальная и прикладная микробиология»). Содержание ЭУМК посвящено теоретическим и практическим основам постановки цели и задач исследования, правилам работы с литературными источниками, порядку планирования и постановки эксперимента, обработке и графическому представлению данных, оформлению квалификационных работ, научных публикаций и подготовке устных и стендовых докладов.

УДК 577.15(075.8)

Энзимология [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 02 «Биохимия» / БГУ ; сост. Т. А. Кукулянская. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2022. 71 с. : ил., табл. Библиогр.: с. 70–71. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/279812>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 18.05.2022, № 005118052022.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальности 1-31 01 02 «Биохимия» биологического факультета Белорусского государственного университета. Содержание ЭУМК предполагает изучение следующих вопросов: особенностей биокаталитических процессов, структурно-функциональной организации ферментов и механизма их действия, внутриклеточной локализации и организации ферментов, а также молекулярных механизмов регуляции активности ферментов *in vivo*.

УДК 575.1/.2(075.8)

Романовская Т. В. Эпигенетика [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 80 01 «Биология» / Т. В. Романовская ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2022. 88 с. : ил. Библиогр.: с. 86–88. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/280326>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 31.05.2022, № 005831052022.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальности 1-31 80 01 «Биология». Содержание ЭУМК предполагает формирование и развитие у магистрантов представлений о разнообразных эпигенетических феноменах, представленных в живой природе, и о механизмах, которыми эти феномены обусловлены.

УДК 573.22(075.8)

Введение в системную биологию [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец.: 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», направления спец.: 1-31 01 01 01 «Биология (научно-производственная деятельность)», 1-31 01 01 02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)», 1-31 01 01 03 «Биология (биотехнология)»; 1-31 01 02 «Биохимия»; 1-31 01 03 «Микробиология» / О. В. Недзьведь [и др.] ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2022. 134 с. : ил. Библиогр.: с. 133–134. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/280838>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 07.06.2022, № 006107062022.

Электронный учебно-методический комплекс по учебной дисциплине «Введение в системную биологию» предназначен для студентов специальностей 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», направления специальности 1-31 01 01 01 «Биология (научно-производственная деятельность)», 1-31 01 01 02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)», 1-31 01 01 03 «Биология (биотехнология)»; 1-31 01 02 «Биохимия»; 1-31 01 03 «Микробиология».

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

- Гриусевич П. В., Самохина В. В., Демидчик В. В. Стресс-индуцируемая потеря электролитов клетками корня высших растений: история вопроса, механизм и физиологическая роль 4

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

- Кушнерова Е. В., Мигас А. А., Клыч А. В., Ласюков Е. А., Мелешко А. Н. Нокаут генов Т-клеточного рецептора и HLA класса I в клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9 19
- Недзвецкая Д. Э., Котова С. А., Забавская Т. В., Рыбакова В. И., Гребенчук А. Е., Цыбовский И. С. Разработка микросателлитной панели для идентификации биологических образцов лося (*Alces alces*) в судебно-экспертных исследованиях 27

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

- Титова А. Д., Кулешова Ю. М., Потапович М. И., Прокулевич В. А. Накопление и антигенность укороченного белка капсида цирковируса свиней 2-го типа в клетках *Escherichia coli* 37
- Охремчук Е. В., Скоповец Е. Я., Охремчук А. Э., Кирсанова Н. П., Сидоренко А. В., Валентович Л. Н. Динамика кишечной микробиоты пациентов с онкогематологическими заболеваниями после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток 48
- Наумович Н. И., Алещенкова З. М., Ананьева И. Н., Сафронова Г. В. Характеристика штаммов *Priestia megaterium* Cp-1 и *Rhodococcus jostii* CA-6, устойчивых к солевому стрессу 60

БИОРАЗНООБРАЗИЕ

- Коротеева Д. О., Шейко А. А. Структура пыльцевого груза имаго жалоносных перепончатокрылых (Aculeata) – посетителей соцветий инвазивных золотарников *Solidago canadensis* L. s. l. в условиях Беларуси 73

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Шукюрли Э. Н. Газовый хромато-масс-спектрометрический анализ ацетонового экстракта корней *Lactuca tatarica* (L.) С. А. Меу. 82

ПАМЯТИ УЧЕНОГО

- Василий Васильевич Карпук 88
- Аннотации депонированных в БГУ работ 91

CONTENTS

REVIEWS

- Hryvusevich P. V., Samokhina V. V., Demidchik V. V.* Stress-induced electrolyte leakage from root cells of higher plants: background, mechanism and physiological role..... 4

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

- Kushniarova L. V., Migas A. A., Klych H. V., Lasiukov Y. A., Meleshko A. N.* Knockout of the T-cell receptor and HLA class I genes in human cells using the CRISPR/Cas9 system 19
- Nedzvedskaya D. E., Kotava S. A., Zabauskaya T. V., Rybakova V. I., Hrebianchuk A. Ya., Tsybovsky I. S.* Development of a microsatellite panel for identification of biological samples of moose (*Alces alces*) in forensic research..... 27

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

- Titova A. D., Kuleshova Y. M., Potapovich M. I., Prokulevich V. A.* Accumulation and antigenicity of truncated porcine circovirus type 2 capsid protein in *Escherichia coli* cells 37
- Akhremchuk K. V., Skapavets K. Y., Akhremchuk A. E., Kirsanova N. P., Sidarenka A. V., Valentovich L. N.* Dynamics of gut microbiota in patients suffering from hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation 48
- Naumovich N. I., Aleschenkova Z. M., Ananyeva I. N., Safronava H. V.* Characteristic of strains *Priestia megaterium* Cp-1 and *Rhodococcus jostii* CA-6 demonstrating increased salt resistance 60

BIODIVERSITY

- Koroteeva D. O., Sheiko A. A.* Pollen cargo structure on Aculeata – visitors of alien *Solidago canadensis* L. s. l. inflorescences in Belarus..... 73

SHORT COMMUNICATIONS

- Shukurlu E. N.* Gas chromatography – mass spectrometry analysis of acetone extract of *Lactuca tatarica* (L.) C. A. Mey. roots 82

TO THE MEMORY OF SCIENTIST

- Vasilii Vasil'evich Karpuk..... 88

- Indicative abstracts of the papers deposited in BSU..... 91

Журнал включен в библиографическую базу данных научных публикаций «Российский индекс научного цитирования» (РИНЦ).

**Экспериментальная биология
и биотехнология.
№ 2. 2022**

Учредитель:
Белорусский государственный университет

Юридический адрес: пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск.

Почтовый адрес: пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск.

Тел. (017) 259-70-74, (017) 259-70-75.

E-mail: jbiol@bsu.by

URL: <https://journals.bsu.by/index.php/biology>

«Экспериментальная биология
и биотехнология» издается с января 1969 г.
С 1969 по 2016 г. выходил под названием «Вестник БГУ.
Серия 2, Химия. Биология. География»,
с 2017 по 2021 г. – под названием
«Журнал Белорусского государственного
университета. Биология».

Редакторы *О. А. Семенец, М. А. Подголина*
Технический редактор *В. В. Пишкова*
Корректор *Л. А. Меркуль*

Подписано в печать 30.06.2022.
Тираж 100 экз. Заказ 5145.

Издательско-полиграфическое частное
унитарное предприятие «Донарит».
Свидетельство о государственной регистрации
издателя, изготовителя, распространителя
печатных изданий № 1/289 от 17.04.2014.
Ул. Октябрьская, 25, 220030,
г. Минск, Республика Беларусь.

© БГУ, 2022

**Experimental Biology
and Biotechnology.
No. 2. 2022**

Founder:
Belarusian State University

Registered address: 4 Niezaliežnasci Ave.,
Minsk 220030.

Correspondence address: 4 Niezaliežnasci Ave.,
Minsk 220030.

Tel. (017) 259-70-74, (017) 259-70-75.

E-mail: jbiol@bsu.by

URL: <https://journals.bsu.by/index.php/biology>

«Experimental Biology and Biotechnology»
published since January, 1969.
From 1969 to 2016 named «Vestnik BGU.
Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya»,
from 2017 to 2021 named «Journal of the Belarusian
State University. Biology».

Editors *O. A. Semenets, M. A. Podgolina*
Technical editor *V. V. Pishkova*
Proofreader *L. A. Merkul'*

Signed print 30.06.2022.
Edition 100 copies. Order number 5145.

Publishing and printing private
unitary enterprise «Donarit».
Certificate of state registration of the publisher,
manufacturer, distributor of printed publications
No. 1/289 dated 17.04.2014.
25 Kastyryčnickaja Str.,
Minsk 220030, Republic of Belarus.

© BSU, 2022