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

3 2024

МИНСК
БГУ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор — **ХРУСТАЛЁВ В. В.** – доктор биологических наук, доцент; декан биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: khrustalevvv@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 — **ФИЛИПЦОВА Г. Г.** – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: filiptsova@bsu.by

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.
Демидчик В. В. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Кильчевский А. В. Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.
Костюк В. А. Белорусский государственный университет, 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.
Решетников В. Н. Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Семак И. В. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Стржалка К. Ягеллонский университет, Краков, Польша.
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 — **KHRUSTALEV V. V.**, doctor of science (biology), docent; dean of the faculty of biology, Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: khrustalevvv@bsu.by

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

Executive secretary — **FILIPTSOVA G. G.**, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology, Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: filiptsova@bsu.by

Adamovich B. V. Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Chubanov V. S. Walther Straub Institute of Pharmacology and Toxicology, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Germany.
Demidchik V. V. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
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.
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.
Reshetnikov V. N. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Semak I. V. Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Shabala S. N. University of Tasmania, Hobart, Australia.
Strzalka K. Jagiellonian University, Kraków, Poland.
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.

Физиология и клеточная биология

Physiology and cell biology

УДК 577.33/.34, 577.355, 577.3.32/.36

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИДИСПЕРСНЫХ НАНОЧАСТИЦ ЗЕИНА, СОДЕРЖАЩИХ КВЕРЦЕТИН, И ОЦЕНКА ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

***А. И. ПОТАПОВИЧ*[1)], *Т. В. КОСТЮК*[1)], *Т. Г. ШУТОВА*[2)], *В. А. КОСТЮК*[1)]**

[1)]*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*
[2)]*Институт химии новых материалов НАН Беларуси, ул. Ф. Скорины, 36, 220141, г. Минск, Беларусь*

Аннотация. На основе белка кукурузы зеина получены кверцетинсодержащие наночастицы. Показано, что кверцетин, включенный в матрицу зеина, сохраняет антирадикальную активность в реакции с катион-радикалами 2,2′-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты). Установлено, что как нативный кверцетин, так и структурированный в зеиновых наночастицах кверцетин уменьшают повреждение плазматических мембран

Образец цитирования:
Потапович АИ, Костюк ТВ, Шутова ТГ, Костюк ВА. Получение полидисперсных наночастиц зеина, содержащих кверцетин, и оценка их биологической активности. *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2024;3:4–9.
EDN: MVDGTC

For citation:
Potapovich AI, Kostyuk TV, Shutava TG, Kostyuk VA. Obtaining and assessing the biological activity of quercetin included in polydisperse nanoparticles of zein. *Experimental Biology and Biotechnology.* 2024;3:4–9. Russian.
EDN: MVDGTC

Авторы:
Алла Ивановна Потапович – кандидат биологических наук, доцент; ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.
Татьяна Владимировна Костюк – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.
Татьяна Геннадьевна Шутова – кандидат химических наук, доцент; ведущий научный сотрудник лаборатории органических композиционных материалов.
Владимир Андреевич Костюк – доктор химических наук, профессор; заведующий научно-исследовательской лабораторией физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:
Alla I. Potapovich, PhD (biology), docent; leading researcher at the laboratory of physiology, department of human and animal physiology, faculty of biology.
pot-alla@rambler.ru
Tatyana V. Kostyuk, researcher at the laboratory of physiology, department of human and animal physiology, faculty of biology.
tanyasuhan@mail.ru
Tatsiana G. Shutava, PhD (chemistry), docent; leading researcher at the laboratory of organic composite materials.
shutova@ichnm.basnet.by
Vladimir A. Kostyuk, doctor of science (chemistry), full professor; head of the laboratory of physiology, department of human and animal physiology, faculty of biology.
kostyuk@bsu.by

и ядерной ДНК клеток, вызванное бактерицидным УФ-облучением. Таким образом, белок кукурузы зеин может быть использован для получения кверцетинсодержащих наночастиц, сохраняющих биологическую активность нативного кверцетина.

Ключевые слова: кератиноциты HaCaT; зеин; кверцетин; наноструктуры; окислительный стресс; повреждение ДНК.

OBTAINING AND ASSESSING THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF QUERCETIN INCLUDED IN POLYDISPERSE NANOPARTICLES OF ZEIN

A. I. POTAPOVICH [a], ***T. V. KOSTYUK*** [a], ***T. G. SHUTAVA*** [b], ***V. A. KOSTYUK*** [a]

[a] *Belarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*
[b] *Institute of Chemistry of New Materials, National Academy of Sciences of Belarus, 36 F. Skaryny Street, Minsk 220141, Belarus*

Corresponding author: V. A. Kostyuk (kostyuk@bsu.by)

Abstract. The corn protein zein was used to obtain quercetin-containing nanoparticles. It has been shown that quercetin included in the zein matrix retains antiradical activity in the reaction with 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radical cations. It was found that both native quercetin and structured quercetin in zein nanoparticles reduce damage to plasma membranes and nuclear DNA of cells caused by bactericidal UV irradiation. Thus, corn protein zein can be used to obtain quercetin-containing nanoparticles that retain the biological activity of native quercetin.

Keywords: HaCaT keratinocytes; zein; quercetin; nanostructures; oxidative stress; DNA damage.

Введение

В качестве средств фармакологической коррекции последствий воздействия окислительного стресса на структурно-функциональное состояние клеток большой интерес представляют растительные полифенольные соединения, в частности флавоноиды, обладающие широким спектром биологической активности [1; 2]. Для повышения биодоступности молекулы потенциальных лекарств могут быть включены в липосомы или полимерные нано- и микрочастицы. Благодаря высокой биосовместимости и биоразлагаемости основной проламиновый белок кукурузы зеин используется в качестве матрицы, обеспечивающей пролонгированное высвобождение ферментов, лекарств и эфирных масел [3]. Целью данной работы были получение и оценка антирадикальной активности полидисперсных наночастиц зеина, содержащих кверцетин, а также изучение их влияния на степень повреждения ядерной ДНК и плазматических мембран кератиноцитов человека после воздействия бактерицидного УФ-облучения (УФ-С-облучения).

Материалы и методы исследования

Реагенты. Модифицированная среда Игла (ДМЕМ), этидиум бромид (ЭБ), кверцетин, додецилсульфат натрия, трипсин приобретены у компании *Sigma-Aldrich* (Германия), антибиотики – у фирмы *Gibco* (США), изотонический фосфатный буфер (ИФБ; pH 7,4) куплен у компании *Lonza* (Бельгия), эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС) приобретена у фирмы *Capricorn Scientific* (Польша).

Клеточные культуры. Иммортализованная клеточная линия кератиноцитов человека HaCaT предоставлена доктором Н. Е. Фузенигом (Немецкий центр исследования рака (*Deutsches Krebsforschungszentrum*), Гейдельберг, Германия).

Получение и характеристика полидисперсных наночастиц зеина, содержащих кверцетин. С этой целью применяли метод десольватации 25–30 мг/мл растворов белка в этаноле, содержащих капсулируемое соединение. Размеры наночастиц зеина определяли методами динамического светорассеяния и атомно-силовой микроскопии, содержание кверцетина – методом Фолина – Чокалтеу. В данной работе были использованы наночастицы, в основном имеющие диаметр (150 ± 35) нм и характеризующиеся достаточно высоким значением индекса полидисперсности (табл. 1).

Таблица 1

Параметры используемых в работе наночастиц зеина, содержащих кверцетин

Table 1

Parameters of quercetin-containing zein nanoparticles used in this work

Диаметр, нм	Процент от числа частиц	Индекс полидисперсности
150 ± 35	99	0,479 ± 0,119
150–1000	~1	

Общая схема проведения экспериментов. Клетки культивировали во флаконах T25 (*Sarstedt*, США) в среде ДМЕМ, содержащей 10 % ЭБС, при стандартных условиях (37 °C; 5 % CO_2). Для проведения экспериментов клетки растили в 24-луночных планшетах. Растворы препаратов нативного кверцетина и кверцетина, включенного в наночастицы зеина, добавляли к клеткам сразу после УФ-С-облучения в культуральной среде, не содержащей сыворотки. Целостность клеток оценивали через 20 ч после воздействия. Анализ повреждений ДНК проводили спустя 2 ч после облучения.

Определение антирадикальных свойств. Антирадикальные свойства нативного кверцетина, наночастиц зеина без кверцетина и наночастиц зеина, содержащих кверцетин, оценивали с использованием катион-радикалов 2,2′-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) (АБТС).

УФ-С-облучение. Применяли бактерицидную лампу Sylvania G 30W (Германия), 95 % излучения которой составляет УФ-С-излучение с длиной волны 253,7 нм. Перед облучением среду ДМЕМ заменяли на ИФБ. Сразу после облучения ИФБ заменяли на среду ДМЕМ без сыворотки, содержащую исследуемые соединения.

Количественный анализ целостности клеток. Критерием повреждения была степень выхода из клеток лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Активность ЛДГ измеряли прямым спектрофотометрическим методом в 1 мл ИФБ (pH 7,4), содержащего 30 мкмоль/л пирувата и 30 мкмоль/л НАДН, и оценивали по величине изменения оптической плотности при длине волны 340 нм за 1 мин. Процент высвобождения ЛДГ (процент повреждения клеток) рассчитывали путем деления активности ЛДГ в среде культивирования на суммарную активность ЛДГ в среде культивирования и лизатах адгезированных клеток.

Анализ повреждений ДНК с помощью метода ДНК-комет. Щелочной комет-анализ проводили по методике, описанной в работах [4; 5]: клетки трипсинизировали, 50 мкл клеточной суспензии каждой экспериментальной серии добавляли к 300 мкл 0,7 % легкоплавкой агарозы и наносили смесь на предметные стекла, предварительно покрытые агарозой с нормальной температурой плавления. Препараты помещали в лизирующий буфер и выдерживали в темноте при температуре 4 °C в течение 20 ч. Затем предметные стекла инкубировали в щелочном буфере для электрофореза (pH 13), содержащем 0,3 моль/л NaOH и 1 ммоль/л ЭДТА, в течение 20 мин и проводили электрофорез при силе тока 300 мА на протяжении 20 мин. Образцы дважды промывали в нейтрализующем растворе (pH 7,4; 4 °C), фиксировали последовательно в 70 % этаноле и 96 % этаноле в течение 5 мин, сушили на воздухе и окрашивали ЭБ. Кометы наблюдали при 200-кратном увеличении с использованием флуоресцентного микроскопа Axiovert-25 (*Carl Zeiss*, Германия) и документировали с помощью цифровой камеры. Процент ДНК в хвосте (поврежденная ДНК) рассчитывали для каждой кометы с применением инструмента «гистограмма» программы *Photoshop* (версия 7). Результаты трех независимых экспериментов усредняли для каждого экспериментального условия ($n \geq 50$ клеток).

Статистический анализ. Полученные данные были сведены в таблицы и проанализированы программой *Excel*. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистическая значимость (p) оценивалась с использованием двустороннего непарного критерия Стьюдента. Достоверными считались значения $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Характеристика зеиновых наночастиц. На основании кривых взаимодействия наночастиц зеина с катион-радикалами АБТС можно сделать вывод о том, что эти наночастицы проявляют слабую активность в реакции с катион-радикалами АБТС. За 60 мин с наночастицами зеина, не содержащими кверцетин, реагирует только $(8,5 \pm 1,0) \cdot 10^{-8}$ моль/мг катион-радикалов АБТС. В то же время для нативного кверцетина на кинетических кривых обесцвечивания растворов катион-радикалов АБТС наблюдаются два последовательных периода, типичных для реакции полифенолов с катион-радикалами АБТС: быстрое уменьшение оптической плотности (A) и последующее медленное обесцвечивание раствора (рис. 1, *а*). С нативным кверцетином за 6 мин реагирует $(1,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$ моль/мг катион-радикалов АБТС, а за

60 мин эта величина достигает $(2{,}2 \pm 0{,}6) \cdot 10^{-5}$ моль/мг. На кривых взаимодействия наночастиц зеина, содержащих кверцетин, с катион-радикалами АБТС также выявлены участки быстрого обесцвечивания раствора, однако его длительность составляет 20 мин (рис. 1, *б*), что обусловлено медленным высвобождением кверцетина из наночастиц.

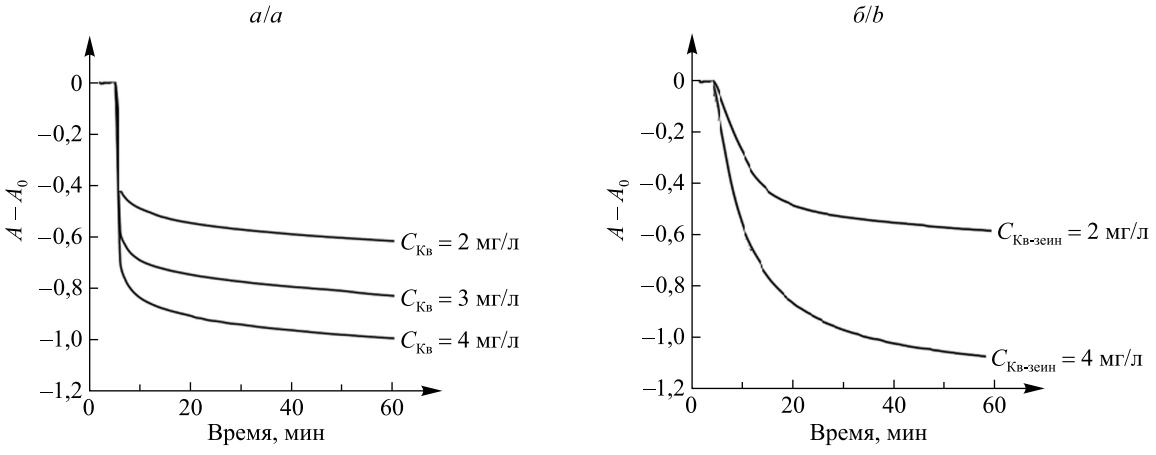


Рис. 1. Кинетические кривые обесцвечивания растворов катион-радикалов АБТС нативным кверцетином (*а*) и кверцетином, включенным в наночастицы зеина (*б*). Концентрации нативного ($C_{Кв}$) и наноструктурированного ($C_{Кв\text{-}зеин}$) кверцетина указаны на рисунке, концентрация катион-радикалов АБТС составляет $8{,}7 \cdot 10^{-5}$ моль/л, температура – 20 °С, длина волны – 734 нм

Fig. 1. Kinetic curves of decolorisation of ABTS radical cation solutions with native quercetin (*a*) and quercetin included in zein nanoparticles (*b*). The concentrations of native ($C_{Кв}$) and nanostructured ($C_{Кв\text{-}зеин}$) quercetin are indicated in the figure, the concentration of ABTS radical cations is $8.7 \cdot 10^{-5}$ mol/L, temperature – 20 °C, wavelength – 734 nm

Влияние кверцетина, включенного в полидисперсные наночастицы зеина, на нарушение структурной целостности кератиноцитов, вызванное УФ-С-облучением. Метод, основанный на определении выхода из клеток цитоплазматического фермента ЛДГ, позволяет оценить структурную целостность клеток и, в частности, целостность плазматической мембраны. Установлено, что воздействие на кератиноциты УФ-С-облучения в дозе 60 мДж/см^2 через 20 ч приводит к повреждению клеточной мембраны и потере клетками более 60 % ЛДГ (табл. 2). Добавление 50 мкмоль/л кверцетина, включенного в наночастицы зеина, непосредственно после УФ-С-экспозиции клеток снижало выход ЛДГ на 70 % по сравнению с ее выходом из облученных клеток без добавления препарата. Нативный кверцетин в этой концентрации практически полностью предотвращал нарушение целостности плазматической мембраны (см. табл. 2).

Таблица 2

Влияние нативного кверцетина и наноструктурированного кверцетина (50 мкмоль/л), внесенных в среду культивирования сразу по окончании УФ-С-облучения (60 мДж/см^2), на структурную целостность кератиноцитов через 20 ч после воздействия

Table 2

Effect of native quercetin and nanostructured quercetin (50 μmol/L), added to the culture medium immediately after UV-C irradiation (60 mJ/cm^2), on the structural integrity of keratinocytes 20 h after exposure

Экспериментальные условия	Выход ЛДГ, %
Контроль (без УФ-С-облучения)	12,4 ± 1,9
УФ-С-облучение	61,2 ± 3,8*
УФ-С-облучение и нативный кверцетин	14,0 ± 2,2**
УФ-С-облучение и наноструктурированный кверцетин	29,5 ± 3,3**

*$p < 0{,}000\,1$ по сравнению с контролем.
**$p < 0{,}000\,1$ по сравнению с УФ-С-облучением.

Влияние кверцетина, включенного в полидисперсные наночастицы зеина, на повреждения ДНК, вызванные УФ-С-облучением. В данной работе было исследовано влияние нативного кверцетина и включенного в зеиновые наночастицы кверцетина, добавленных к кератиноцитам человека сразу по окончании УФ-С-облучения в дозе 60 мДж/см^2, на повреждение ДНК через 2 ч после воздействия. Известно, что УФ-С-облучение инициирует в клетках и тканях быстрые фотохимические процессы. При этом, если мишенью УФ-излучения является ядерный хроматин, ДНК поглощает высокоэнергетическое коротковолновое излучение, в основном УФ-С, что приводит к образованию димеров пиримидина – циклобутановых димеров (CPD) и пиримидин-(6,4)-пиримидиновых фотопродуктов (6,4-фотопродуктов) [6–8]. Клеточная реакция на возникновение повреждения ДНК включает активацию механизмов репарации ДНК [6]. Ранее нами было показано, что нативные полифенолы и микроструктурированный кверцетин (покрытый оболочками на основе полиаллиламингидрохлорида и полистиролсульфоната натрия $(PAH/PPS)_4$ или хитозана и декстрансульфата $(CH/DS)_4$) способны активировать и ускорять репаративный синтез ДНК после воздействия УФ-С-облучения и уменьшать количества CPD и 6,4-фотопродуктов в поврежденной ДНК [9].

Одним из наиболее распространенных и точных методов, применяемых для оценки разнообразных эффектов генотоксических агентов и выявления генопротекторного действия потенциальных фармакологических препаратов, является комет-анализ. Впервые он был предложен О. Остлингом и К. Йохансоном в 1984 г. [10]. В данной работе использована щелочная версия комет-анализа, позволяющая выявить однонитевые повреждения ДНК [4; 5]. В результате УФ-С-облучения и последующей щелочной денатурации ДНК образующиеся фрагменты в ходе электрофореза двигаются с различной скоростью, что при окрашивании проявляется в виде так называемых комет. При этом чем больше было исходных повреждений ДНК, тем большим оказывался процент фрагментов ДНК в хвосте комет. Окрашенные ЭБ предметные стекла наблюдали с помощью флуоресцентного микроскопа и фотографировали цифровой камерой (рис. 2, *а*). Процент поврежденной ДНК в хвосте комет (среднее значение ± стандартное отклонение) рассчитывался по результатам трех независимых экспериментов ($n \geq 50$ клеток для каждого эксперимента) (рис. 2, *б*).

Согласно данным, представленным на рис. 2, процент ДНК в хвосте комет через 2 ч после УФ-С-облучения составлял почти 67 %. При инкубации облученных кератиноцитов с кверцетином, включенным в наночастицы зеина, было обнаружено частичное устранение повреждений ДНК, о чем свидетельствовало уменьшение процента ДНК в хвосте комет. Сравнение действия нативного кверцетина и кверцетина, содержащегося в наночастицах зеина, не выявило достоверной разницы в их способности устранять повреждения ДНК.

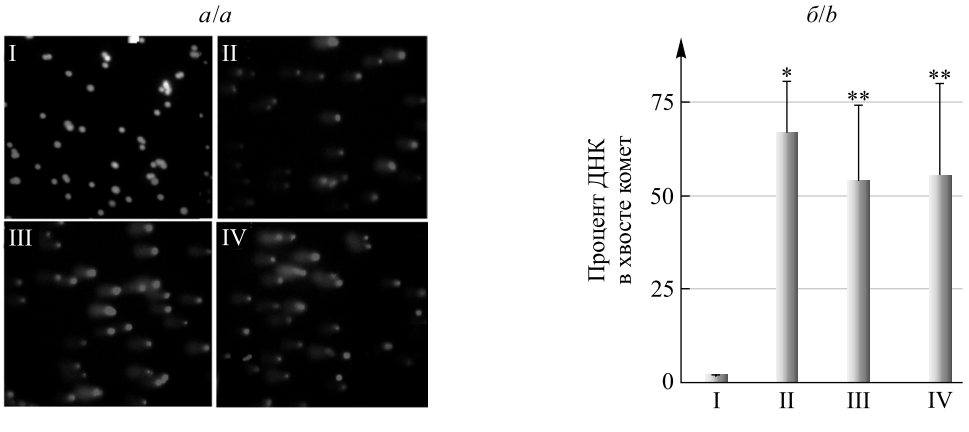


Рис. 2. Влияние нативного и наноструктурированного кверцетина (50 мкмоль/л) на повреждение ДНК культивируемых кератиноцитов через 2 ч после УФ-С-облучения в дозе 60 мДж/см^2: *а* – репрезентативные флуоресцентные микрофотографии ДНК-комет; *б* – процент ДНК в хвосте комет (I – контроль (без УФ-С-облучения), II – УФ-С-облучение, III – УФ-С-облучение и нативный кверцетин, IV – УФ-С-облучение и наноструктурированный кверцетин). Знаком * отмечены значения $p < 0{,}000\,1$ по сравнению с контролем, знаком ** – значения $p < 0{,}000\,1$ по сравнению с УФ-С-облучением

Fig. 2. Effect of native and nanostructured quercetin (50 μmol/L) on DNA damage of cultured keratinocytes 2 h after UV-C irradiation at a dose of 60 mJ/cm^2: *a* – representative fluorescent micrographs of DNA comets; *b* – percentage of DNA in the tail of comets (I – control (without UV-C irradiation), II – UV-C irradiation, III – UV-C irradiation and native quercetin, IV – UV-C irradiation and nanostructured quercetin). The sign * indicates values $p < 0.000\,1$ compared to control, the sign ** indicates values $p < 0.000\,1$ compared to UV-C irradiation

В настоящей работе для инициирования повреждения ДНК применялось УФ-С-излучение с длиной волны 254 нм. Преимущество такого подхода, по сравнению с использованием перекиси водорода и других окислителей, инициирующих в клетках окислительный стресс, заключается в том, что УФ-С-излучение способно напрямую модифицировать ДНК, благодаря чему можно не учитывать антиоксидантную активность тестируемых соединений при исследовании их влияния на степень повреждения ДНК и пути ее репарации.

Заключение

При воздействии на кератиноциты УФ-С-облучения в дозе 60 мДж/см^2 были обнаружены значительное повреждение и гибель клеток через 20 ч. В случае добавления в культуральную среду нативного или наноструктурированного кверцетина в дозе 50 мкмоль/л сразу после облучения повреждение и гибель клеток снижались. Поскольку выделение кверцетина из матрицы зеина носит пролонгированный характер, антирадикальная активность наноструктурированного кверцетина в реакции с катион-радикалами АБТС и его цитопротекторные свойства в условиях клеточного оксидативного стресса несколько ниже аналогичных параметров нативного кверцетина. Следует отметить, что цитопротекторный эффект при воздействии УФ-излучения на клетки кожи без защиты ДНК может обусловливать увеличение частоты возникновения опухолей кожи после облучения [11]. С использованием комет-анализа установлено, что добавление нативного или наноструктурированного кверцетина в дозе 50 мкмоль/л достоверно снижает количество поврежденной ДНК в хвосте комет через 2 ч после УФ-С-облучения (60 мДж/см^2).

Результаты исследования показывают, что как нативный кверцетин, так и наноструктурированный в зеиновых частицах кверцетин уменьшают повреждение плазматических мембран и ядерной ДНК клеток, вызванное УФ-С-облучением. Таким образом, белок кукурузы зеин может быть использован для получения кверцетинсодержащих наночастиц, сохраняющих биологическую активность нативного кверцетина.

Библиографические ссылки

1. Костюк ВА, Потапович АИ. *Биорадикалы и биоантиоксиданты*. Минск: БГУ; 2004. 174 с.

2. Korkina LG, De Luca C, Kostyuk VA, Pastore S. Plant polyphenols and tumors: from mechanisms to therapies, prevention, and protection against toxicity of anti-cancer treatments. *Current Medicinal Chemistry.* 2009;16(30):3943–3965. DOI: 10.2174/09298 6709789352312.

3. Zou Y, Qian Y, Rong X, Cao K, McClements DJ, Hu K. Encapsulation of quercetin in biopolymer-coated zein nanoparticles: formation, stability, antioxidant capacity, and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids.* 2021;120:106980. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2021. 106980.

4. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research.* 1988;175(1):184–191. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.

5. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2000;35(3):206–221. DOI: 10.1002/(sici) 1098-2280(2000)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j.

6. Farrell AW, Halliday GM, Lyons JG. Chromatin structure following UV-induced DNA damage – repair or death? *International Journal of Molecular Sciences.* 2011;12(11):8063–8085. DOI: 10.3390/ijms12118063.

7. Setlow RB. Cyclobutane-type pyrimidine dimers in polynucleotides. *Science.* 1966;153(3734):379–386. DOI: 10.1126/science. 153.3734.379.

8. Rolfsmeier ML, Laughery MF, Haseltine CA. Repair of DNA double-strand breaks following UV damage in three *Sulfolobus solfataricus* strains. *Journal of Bacteriology.* 2010;192(19):4954–4962. DOI: 10.1128/JB.00667-10.

9. Potapovich AI, Kostyuk TV, Ishutina OV, Shutava TG, Kostyuk VA. Effects of native and particulate polyphenols on DNA damage and cell viability after UV-C exposure. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 2023;396(9):1923–1930. DOI: 10.1007/s00210-023-02443-3.

10. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1984;123(1):291–298. DOI: 10.1016/0006-291x(84)90411-x.

11. Dose M, Emmanuel AO, Chaumeil J, Zhang J, Sun T, Germar K, et al. β-Catenin induces T-cell transformation by promoting genomic instability. *PNAS.* 2014;111(1):391–396. DOI: 10.1073/pnas.1315752111.

Получена 30.05.2024 / исправлена 12.09.2024 / принята 12.09.2024.
Received 30.05.2024 / revised 12.09.2024 / accepted 12.09.2024.

УДК 577.355.3

ВЛИЯНИЕ ПРАЙМИНГА СЕМЯН 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТОЙ НА АДАПТАЦИЮ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ К ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХЕ

***Т. Г. КУРЬЯНЧИК*[1)], *Н. В. КОЗЕЛ*[2)]**

[1)]*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,*
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь
[2)]*Крестьянское (фермерское) хозяйство «Серебряный ручей»,*
222202, д. Сосновая, Озерицко-Слободской с/с,
Смолевичский р-н, Минская обл., Беларусь

Аннотация. Показано, что прайминг семян 5-аминолевулиновой кислотой существенно влияет на адаптационные механизмы фотосинтетического аппарата листьев растений ячменя сорта Аванс при действии почвенной засухи. Предварительная обработка семян 5-аминолевулиновой кислотой в условиях стресса снижает накопление в листьях активных форм кислорода и оказывает стабилизирующее действие на пигментный аппарат, поддерживая высокое содержание β-каротина. Кроме того, прайминг семян 5-аминолевулиновой кислотой приводит к увеличению количества белка Lhca2 светособирающего комплекса фотосистемы I, но не оказывает существенного влияния на количество белков фотосистемы II как при засухе, так и при нормальном поливе, что может способствовать перераспределению энергии поглощенных квантов света в пользу фотосистемы I и является эффективным защитным механизмом, снижающим фотоповреждение фотосистемы II при окислительном стрессе. Предпосевная обработка семян 5-аминолевулиновой кислотой стабилизирует фотохимическую активность фотосистем листьев растений ячменя в условиях засухи, уменьшая при этом подавление регулируемой составляющей нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла как важного защитного механизма при стрессе.

Ключевые слова: почвенная засуха; 5-аминолевулиновая кислота; прайминг семян; окислительный стресс; активные формы кислорода; фотосинтетический аппарат; ячмень.

Образец цитирования:
Курьянчик ТГ, Козел НВ. Влияние прайминга семян 5-аминолевулиновой кислотой на адаптацию фотосинтетического аппарата растений ячменя к почвенной засухе. *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2024;3:10–21.
EDN: NBNVNW

For citation:
Kuryanchyk TG, Kozel NV. Influence of seed priming with 5-aminolevulinic acid on adaptation of the photosynthetic apparatus of barley plants to soil drought. *Experimental Biology and Biotechnology.* 2024;3:10–21. Russian.
EDN: NBNVNW

Авторы:
Татьяна Геннадьевна Курьянчик – научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.
Николай Владимирович Козел – кандидат биологических наук, доцент; главный технолог.

Authors:
Tatsiana G. Kuryanchyk, researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.
t.kuryanchyk@gmail.com
https://orcid.org/0000-0001-7727-3451
Nikolay V. Kozel, PhD (biology), docent; chief technologist.
kozel.mikalai@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-2958-7645

INFLUENCE OF SEED PRIMING WITH 5-AMINOLEVULINIC ACID ON ADAPTATION OF THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF BARLEY PLANTS TO SOIL DROUGHT

***T. G. KURYANCHYK*[a], *N. V. KOZEL*[b]**

[a]*Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus, 27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus*
[b]*Peasant (farm) economy «Serebryanyj ruchej», Sasnovaja 222202, Aziarycka-Slabadski village council, Smaliavichy District, Minsk Region, Belarus*
Corresponding author: T. G. Kuryanchyk (t.kuryanchyk@gmail.com)

Abstract. It has been shown that seed priming with 5-aminolevulinic acid significantly affects the adaptation mechanisms of the photosynthetic apparatus of leaves of barley plants of the Avans variety under the influence of soil drought. Pre-treatment of seeds with 5-aminolevulinic acid under stress conditions reduces the accumulation of reactive oxygen species in leaves and has a stabilising effect on the pigment apparatus, maintaining a high β-carotene content. Priming of seeds with 5-aminolevulinic acid leads to an increase in the content of the protein Lhca2 of the light-harvesting complex of photosystem I against the background of the absence of a significant effect of 5-aminolevulinic acid on the content of photosystem II proteins both under drought conditions and under normal watering, which can contribute to the redistribution of the energy of absorbed light quanta in benefits photosystem I and is an effective protective mechanism that reduces photodamage to photosystem II under oxidative stress. Seed priming with 5-aminolevulinic acid stabilises the photochemical activity of barley leaf photosystems under drought conditions, while reducing the suppression of the regulated component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence as an important protective mechanism under stress.

Keywords: soil drought; 5-aminolevulinic acid; seed priming; oxidative stress; reactive oxygen species; photosynthetic apparatus; barley.

Введение

Глобальное изменение климата отрицательно сказывается на сельскохозяйственном производстве во многих регионах планеты [1; 2]. Сопутствующая климатическим изменениям засуха является сегодня наиболее значимым стрессовым фактором, способным приводить к образованию в клетках растений активных форм кислорода (АФК), таких как синглетный молекулярный кислород ($^1O_2$), супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$), гидроксильный радикал ($OH^{\bullet}$) и пероксид водорода (H_2O_2), которые обладают высокой реакционной способностью и цитотоксичностью. Накопление в клетках избыточных количеств АФК, в свою очередь, служит причиной повреждения биологически важных макромолекул и вызывает нарушение ключевых физиолого-биохимических процессов в растительном организме. В таких условиях изменяется метаболический и окислительный гомеостаз растительной клетки, что в конечном итоге может привести к ее гибели. Кроме того, чрезмерное накопление АФК в листьях растений может вызвать их старение из-за распада фотосинтетических пигментов [3]. Степень повреждения растительной клетки в результате действия факторов абиотического стресса, в том числе засухи, зависит от продолжительности воздействия, вида и сорта растения, его стрессоустойчивости [4].

При засухе ключевую роль играют адаптивные механизмы, которые позволяют растению преодолевать стрессовое воздействие [5]. Важным аспектом повышения эффективности сельскохозяйственного производства в условиях стремительного изменения климата, в том числе при частых засухах, является разработка экологически безопасных регуляторов роста и антистрессоров, позволяющих снизить негативное воздействие факторов биотического и абиотического стресса. Экзогенное применение различных небольших молекул или регуляторов роста – хорошо известный метод повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды [6]. Среди множества идентифицированных гормонов, регуляторов роста и развития или малых сигнальных молекул 5-аминолевулиновая кислота (АЛК) является эффективной против пагубных последствий, вызываемых у растений абиотическим стрессом, в частности засухой [7].

Ранее нами было показано, что обработка листьев растений ячменя сорта Аванс, характеризующегося относительно низкой засухоустойчивостью, АЛК методом опрыскивания приводит к более интенсивному развитию окислительного стресса в растениях данного сорта при действии почвенной засухи, чем в растениях засухоустойчивого сорта Бровар [8], это указывает на сортоспецифичность действия АЛК при

опрыскивании и неэффективность такого способа обработки для неустойчивых к засухе сортов. Одним из предполагаемых механизмов, определяющих снижение эффективности данного регулятора роста, является усиление в клетках растений менее засухоустойчивых сортов фотоокислительного стресса, который наряду со стабилизирующим действием может инициировать АЛК, попадая непосредственно в листья при опрыскивании.

Однако в работах лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси было показано, что альтернативным способом повышения стрессоустойчивости сельскохозяйственных культур с использованием АЛК является предпосевная обработка (прайминг) семян растворами этого естественного метаболита растительной клетки [9]. Авторы настоящей статьи предполагают, что прайминг семян ячменя сорта Аванс АЛК позволит увеличить устойчивость растений этого сорта к действию почвенной засухи путем снижения уровня АФК в клетках растительного организма и, как следствие, уменьшения окислительного повреждения основных структурных компонентов фотосинтетического аппарата (ФСА), а также стабилизации фотохимической активности фотосистем в условиях засухи. Такие исследования позволят получить дополнительную информацию о механизмах действия АЛК, что в перспективе может лечь в основу разработки новых подходов к повышению урожайности сельскохозяйственных культур при засухе, основанных на применении АЛК как эффективного экологически безопасного стрессопротектора и стимулятора роста растений.

Таким образом, актуальной задачей представляется изучение использования прайминга семян АЛК, являющейся препаратом естественного происхождения, для повышения продуктивности растений в стрессовых условиях, в том числе при засухе, за счет более быстрого развития защитных реакций. Целью данной работы было исследование влияния прайминга семян АЛК на адаптацию ФСА растений ячменя к засухе.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования в данной работе использовали проростки растений ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Аванс, выращенные в строго контролируемых лабораторных условиях в режиме 14 ч света (интенсивность 6 тыс. лк; люминесцентные лампы Philips TL-D 36W/765 (Германия)) и 10 ч темноты при температуре (23 ± 1) °С и относительной влажности воздуха (35 ± 2) % при ежедневном поливе водопроводной водой и при засухе (растения не поливали с момента посадки). Предпосевную обработку семян ячменя проводили в дистиллированной воде ($H_2O_{дист}$) или растворе АЛК с концентрацией 10 мг/л при температуре (4 ± 2) °С в течение 20 ч.

Выращивание растений, определение всхожести семян и морфометрических показателей проростков. Исследование влияния засухи на зеленые проростки ячменя проводили с использованием культуры, выращенной в почве. Для этого семена ячменя предварительно проращивали на пластиковых асептически обработанных сетках при температуре (23 ± 1) °С в течение 1 сут. Затем отобранные по размеру корней семена высаживали в сосуды, заполненные 300 г почвогрунта «Восторг» (ООО «Карио», Беларусь) с начальной массовой долей воды (50 ± 1) %, которая на 7-е сутки выращивания в условиях засухи снижалась в среднем на (13 ± 1) %. Варианты экспериментов были следующими:

1) контроль (растения, обработанные методом прайминга семян $H_2O_{дист}$, ежедневный полив водопроводной водой из расчета 25 мл воды на 300 г влажного грунта);

2) АЛК + H_2O (растения, обработанные методом прайминга семян АЛК, ежедневный полив водопроводной водой);

3) засуха (растения, обработанные методом прайминга семян $H_2O_{дист}$, без полива);

4) АЛК + засуха (растения, обработанные методом прайминга семян АЛК, без полива).

Всхожесть семян определяли визуально по наличию либо отсутствию первого листа на 1-е сутки после высадки семян в грунт. Длину зеленых проростков измеряли от зерновки через 7 сут после посадки в почву.

Определение сухой массы листьев растений ячменя, или массовой доли воды. Сухую массу листьев, или массовую долю воды, определяли согласно методу, описанному в работе [10]. Навески листьев растений ячменя массой 1 г помещали в стеклянные бюксы, масса которых предварительно была измерена на аналитических весах CE224-C (ООО «Сартогосм», Россия). Бюксы с навесками листьев помещали в вакуумный сушильный шкаф Vacucell 111 Standard (*MMM Medcenter Einrichtungen*, Германия) и высушивали образцы при температуре 100 °С и давлении 0,05 атм в течение 2 ч. Через 1,0; 1,5 и 2,0 ч от начала сушки бюксы с навесками листьев взвешивали, чтобы зафиксировать сухую массу, которая в последних двух измерениях не менялась, что свидетельствовало о полной потере воды образцами. Массовую долю воды рассчитывали по разнице между начальной и конечной массой бюксов с образцами.

Определение общего содержания АФК. Общее содержание АФК определяли *in vitro* с помощью флуоресцентного зонда – 2,7-дихлорфлуоресцеина диацетата (ДХФ-ДА), который после деацетилирования окисляется до флуоресцентного соединения ДХФ такими АФК, как H_2O_2, $OH^{\bullet}$, пероксирадикалы ($ROO^{\bullet}$) и др. [11].

Для получения экстракта навески листьев растений ячменя массой 0,2 г помещали в фарфоровую ступку и, приливая 1,6 мл 0,2 н. $HClO_4$, растирали до получения гомогената, который затем центрифугировали 10 мин при ускорении 17 000 *g* и температуре 4 °С, используя центрифугу с охлаждением Sigma 1-15K (Германия). Нейтрализацию кислотного значения pH до 7,5–7,6 осуществляли с помощью 4 моль/л KOH. Затем все пробы инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 20 мин.

Определение общего количества АФК проводили, регистрируя флуоресценцию ДХФ ($\lambda_{возб}$ = 496 нм, $\lambda_{набл}$ = 524 нм). Среда измерения содержала 0,15 моль/л буфер трис-HCl (pH 7,5), нейтрализованный супернатант и 0,5 ммоль/л раствор ДХФ-ДА. Контролем служила проба, состоящая из 0,15 моль/л буфера трис-HCl (pH 7,5) и 0,5 ммоль/л раствора ДХФ-ДА [12]. Флуориметрический анализ проводили с использованием спектрофлуориметра Solar CM2203 (Беларусь). По количеству образовавшегося в ходе реакции ДХФ судили о накоплении АФК. Концентрацию ДХФ рассчитывали в относительных единицах в пересчете на сухую массу растений, контрольный вариант принимали за единицу.

Определение содержания H_2O_2 в листьях растений ячменя. Содержание пероксида водорода в экстрактах листьев растений ячменя определяли с помощью флуоресцентного метода, в основе которого лежит реакция окисления скополетина в присутствии H_2O_2, катализируемая пероксидазой хрена [13].

Навески листьев растений ячменя (0,2 г) помещали в фарфоровую ступку и, приливая 1,6 мл 0,2 н. $HClO_4$, растирали до гомогената, который затем центрифугировали в течение 10 мин при ускорении 17 000 *g* и температуре 4 °С с использованием центрифуги Sigma 1-15K. Для нейтрализации кислотного значения pH супернатанта добавляли 4 моль/л KOH и центрифугировали 5 мин при ускорении 17 000 *g* и температуре 4 °С.

Определение содержания H_2O_2 проводили, регистрируя убыль флуоресценции скополетина ($\lambda_{возб}$ = = 370 нм, $\lambda_{набл}$ = 464 нм) на спектрофлуориметре Solar CM2203. Среда измерения содержания H_2O_2 состояла из 0,1 моль/л буфера трис-HCl (pH 7,0), раствора пероксидазы хрена (200 ед. на 1 мл) и 0,1 ммоль/л раствора скополетина. Реакцию запускали добавлением нейтрализованного супернатанта. Первым контролем служила проба, состоящая из 0,1 моль/л буфера трис-HCl и супернатанта, вторым контролем – проба, состоящая из 0,1 моль/л буфера трис-HCl, раствора пероксидазы хрена (5 ед. на 10 мкл) и 0,1 ммоль/л раствора скополетина. Концентрацию пероксида водорода рассчитывали в относительных единицах в пересчете на сухую массу растений, контрольный вариант принимали за единицу [14].

Определение содержания хлорофиллов (Хл), феофитинов (Фео) и каротиноидов (Кар). Содержание Хл *a* и Хл *b*, Фео *a* и Фео *b*, а также Кар в листьях растений ячменя определяли с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа (ВЭЖХ) Shimadzu LC-20 Prominence (Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см) фирмы *Macherey-Nagel* (Германия) по методике, разработанной в лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси согласно работам [15; 16].

Экстракцию пигментов из растений осуществляли с помощью 100 % ацетона. Разделение пигментов на колонке проводили с использованием раствора А (ацетонитрил 90,0 %, вода 9,9 %, триэтиламин 0,1 %) и раствора Б (этилацетат 100 %) со скоростью потока 0,5 мл/мин. Пигменты регистрировали с помощью спектрофотометрического детектора с диодной матрицей Shimadzu SPD-M20A (Япония) в диапазоне длин волн 200–800 нм. Визуализацию профиля хроматограммы осуществляли по спектрам поглощения при длине волны 440 нм (для Хл *a* и Хл *b*, а также Кар) и 410 нм (для Фео *a* и Фео *b*). Для количественного определения пигментов использовали площади пиков хроматограммы и коэффициенты, полученные для каждого пигмента с помощью стандартов. Расчет содержания пигментов производили по формуле

$$C_{пигм} = \frac{S_{440} \cdot F_{пигм} \cdot V}{V_{аликв} \cdot m},$$

где $C_{пигм}$ – содержание пигмента, мкг/г сухой массы; S_{440} – площадь пика поглощения при длине волны 440 нм (410 нм для Фео); $F_{пигм}$ – фактор (коэффициент) для расчета; V – объем супернатанта, мкл; $V_{аликв}$ – аликвота, мкл; m – масса навески, г.

В работе были использованы следующие реагенты: ацетон квалификации «х. ч.» (≥ 99,8 %) производства АО «Экос-1» (Россия), ацетонитрил для ВЭЖХ (≥ 99,9 %) и этилацетат для ВЭЖХ (≥ 99,7 %) производства компании *Honeywell* (Германия), триэтиламин (≥ 99,5 %) производства фирмы *AppliChem* (Германия), стандарты фотосинтетических пигментов производства компании *Sigma-Aldrich* (Германия).

Определение содержания белковых компонентов пигмент-белковых комплексов фотосистем с помощью вестерн-блоттинга. Выделение из растений белков, их электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинг выполняли, как описано в работе [17]. Навеску листьев растений ячменя массой 0,1 г растирали в жидком азоте до порошка, переносили в пробирку типа «эппендорф», приливали среду выделения, содержащую 56 ммоль/л дитиотреитола, 56 ммоль/л Na_2CO_3, 12 % сахарозы, 2 ммоль/л этилендиаминтетраацилацетата, 2 % додецилсульфата натрия, и тщательно перемешивали, используя вортекс Vortex-Genie 2 (*Scientific Industries*, США). После этого пробы в течение 10 мин инкубировали при температуре 80 °С на термошейкере TS-100 (*Biosan*, Латвия). Затем снова перемешивали и центрифугировали 5 мин при ускорении 17 000 *g* на центрифуге Biofuge Pico (*Thermo Fisher Scientific*, США). В полученном экстракте определяли содержание белка по методу Брэдфорда [18] и при необходимости разбавляли пробы буфером для экстракции в целях выравнивания в них содержания белка.

Разделение белков выполняли с помощью денатурирующего гель-электрофореза на установке для вертикального гель-электрофореза Mini-PROTEAN Tetra System (*Bio-Rad*, США), используя коммерческие препараты разделяющего и концентрирующего гелей. После разделения белков осуществляли их электроперенос с геля на нитроцеллюлозную мембрану фирмы *Bio-Rad* с порами размером 0,45 мкм. Для этого гель помещали на мембрану и укладывали на поверхность системы турбоблоттинга Trans-Blot Turbo Transfer System (*Bio-Rad*) между слоями хроматографической бумаги, предварительно смоченной в анодном буфере.

Иммунохимическое окрашивание белков, иммобилизованных на нитроцеллюлозной мембране, проводили с помощью поликлональных антител фирмы *Agrisera* (Швеция) к белку D1 реакционного центра (РЦ) фотосистемы II (ФС II) (PsbA), а также к белкам светособирающего комплекса (ССК) фотосистемы I (ФС I) (Lhca2) и ФС II (Lhcb2 и Lhcb4). Количество белков рассчитывали денситометрически в относительных единицах по площади и интенсивности полос после их визуализации, используя программу *TotalLab* (версия 2.01).

Измерение индукции флуоресценции Хл и редокс-состояния первичного донора ФС I (P700). Фотохимическую активность фотосистем листьев растений ячменя регистрировали с помощью измерительного комплекса Dual-PAM-100 (*Heinz Walz*, Германия) с модулем регистрации флуоресценции ФС II и двухволновым (830 и 875 нм) модулем регистрации сигнала P700 [19]. Параметры активности ФС I и ФС II листьев растений ячменя рассчитывали согласно работе [20]. Темновую адаптацию листьев осуществляли в течение 15 мин. Интенсивность измерительного света составляла 0,048 мкмоль квантов на 1 м^2 за 1 с ($\lambda_{возб}$ = 460 нм), интенсивность актиничного (фотосинтетически активного) света – 131 мкмоль квантов на 1 м^2 за 1 с, интенсивность насыщающих вспышек – 10 000 мкмоль квантов на 1 м^2 за 1 с. В качестве актиничного света использовали излучение с длиной волны 635 нм. Регистрировали фоновую флуоресценцию Хл после темновой адаптации (F_0) и при включении актиничного света (F_0'), максимальный уровень флуоресценции (F_m), а также изменение интенсивности флуоресценции с уровня F до уровня F_m' после насыщающей вспышки на фоне действия актиничного света. Рассчитывали вариабельную флуоресценцию ($F_v = F_m - F_0$), потенциальный квантовый выход фотохимии ФС II ($\frac{F_v}{F_m}$), эффективный квантовый выход фотохимии ФС II ($Y(\text{II}) = \frac{F_m - F}{F_m'}$), коэффициент фотохимического ($qP = \frac{F_m' - F}{F_m' - F_0}$) и нефотохимического ($qN = \frac{F_m - F_m'}{F_m - F_0'}$) тушения флуоресценции Хл, а также скорость транспорта электронов ($\text{ETR(I)} = Y(\text{I}) \cdot \text{PAR} \cdot c \cdot 0{,}5$, $\text{ETR(II)} = Y(\text{II}) \cdot \text{PAR} \cdot c \cdot 0{,}5$, где PAR – интенсивность фотосинтетически активной радиации (131 мкмоль квантов на 1 м^2 за 1 с); c – часть абсорбированного света (84 %); 0,5 – часть фотосинтетически активной радиации, приходящейся на одну фотосистему [21; 22]). Параметр NPQ, который является мерой нефотохимического тушения флуоресценции, отражающей подавление ФС II как защитный механизм от избыточной интенсивности света, рассчитывали по формуле $\text{NPQ} = \frac{F_m - F_m'}{F_m'}$ [23].

Для оценки редокс-состояния РЦ ФС I регистрировали сигнал P700 (P), который представляет собой разницу между интенсивностями модулированного измерительного света с длинами волн 875 и 830 нм ($\Delta(I_{875} - I_{830})$), достигающего фотодетектора, и может варьировать от минимального (P700 полностью восстановлен) до максимального (P700 полностью окислен) уровня. Значение P_m (P700 полностью окислен) было определено с помощью насыщающей вспышки (10 000 мкмоль квантов на 1м^2 за 1 с) после предварительного освещения листа дальнекрасным светом (730 нм), поглощаемым ФС I. Значение P_m' определяли аналогично значению P_m, но с использованием в качестве фонового актиничного света (635 нм)

вместо дальнекрасного. Эффективный квантовый выход фотохимии ФС I ($Y(\mathrm{I}) = \frac{P'_m - P}{P_m}$) определяется долей от общего количества P700, который в данном состоянии был восстановлен независимо от акцепторной стороны. Значение $Y(\mathrm{ND}) = \frac{P}{P_m}$ представляет собой долю от общего количества P700, окисленного в данном состоянии. Значение $Y(\mathrm{NA}) = \frac{P_m - P'_m}{P_m}$ представляет собой долю от общего количества P700, который не может быть окислен насыщающей вспышкой в данном состоянии из-за отсутствия окисленных акцепторов [22].

Световые кривые для ETR(I) и ETR(II) регистрировали при интенсивностях актиничного света 11; 18; 27; 58; 100; 131; 221; 344; 536 и 830 мкмоль квантов на 1 м^2 за 1 с (длина интервала между насыщающими вспышками составляла 30 с).

Статистическая обработка полученных результатов. Для статистической обработки экспериментальных данных и регистрации полученных результатов использовали программы *Excel 2019* (*Microsoft*) и *SigmaPlot* (версия 12.5) (*Systat Software*), а также статистические методы, принятые в области биологических исследований[1]. Основными статистическими характеристиками служили среднее значение (x), среднеквадратическое отклонение (s), ошибка средней величины (S_x). На графиках и в таблицах приведены средние значения и ошибки средней величины ($x \pm S_x$). Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (t) для принятого уровня значимости ($p \leq 0{,}05$) и данного числа степеней свободы (df). Все описанные в работе эксперименты проводили в 3–7-кратной биологической повторности на 7-е сутки после высадки пророщенных семян в почву.

Результаты и их обсуждение

Влияние прайминга семян АЛК на морфофизиологические показатели проростков ячменя, выращенных в условиях почвенной засухи. В рамках проведенных опытов было проанализировано воздействие почвенной засухи на всхожесть семян, морфометрические показатели растений и содержание воды в проростках ячменя в случае предпосевной обработки семян АЛК в концентрации 10 мг/л.

Так, в ходе исследования была выявлена высокая (более 95 %) всхожесть семян сорта Аванс независимо от условий выращивания и праймирования (табл. 1). Достоверных различий между всхожестью семян в экспериментальных и контрольных вариантах не зафиксировано.

Таблица 1

Всхожесть семян ячменя сорта Аванс, обработанных АЛК методом прайминга

Table 1

Germination of barley seeds of the Avans variety treated with 5-aminolevulinic acid (ALA) using the priming method

Вариант	Общее количество семян	Количество взошедших семян	Всхожесть, %
Контроль	130	126	96,9 ± 1,4
АЛК + H_2O	130	126	96,9 ± 1,4
Засуха	130	124	95,4 ± 1,9
АЛК + засуха	130	124	95,4 ± 1,9

Изучение морфометрических показателей первого листа растений ячменя, определяемых по длине проростков от зерновки, показало, что дефицит воды приводит к достоверному уменьшению длины проростков (в среднем на 13 %) у необработанных и обработанных АЛК методом прайминга семян растений ячменя сорта Аванс по сравнению с длиной проростков у контрольных растений (табл. 2).

Анализ массовой доли воды в проростках ячменя показал незначительное, но достоверное снижение этого показателя в условиях засухи (в среднем на 2 % по сравнению с растениями, выращенными при нормальном поливе (см. табл. 2)).

[1] *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика : учеб. пособие для биол. фак. ун-тов. 3-е изд., испр. Минск : Выш. шк., 1973. С. 28–50.

Таблица 2

Изменение длины 7-дневных проростков ячменя сорта Аванс, а также массовой доли воды в них под влиянием почвенной засухи

Table 2

Changes in the length of 7-day-old barley seedlings of the Avans variety, as well as the mass fraction of water in them under the influence of soil drought

Вариант	Длина проростков от зерновки, см	Массовая доля воды, %
Контроль	15,1 ± 0,2	91,9 ± 0,2
АЛК + H_2O	15,3 ± 0,2	91,9 ± 0,1
Засуха	13,1 ± 0,2*	90,0 ± 0,1*
АЛК + засуха	13,3 ± 0,2*	90,1 ± 0,2*

*Достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Отметим, что прайминг семян АЛК не оказывает существенного влияния на морфометрические показатели растений ячменя сорта Аванс как при почвенной засухе, так и при нормальном водообеспечении.

Влияние прайминга семян АЛК на накопление АФК в листьях растений ячменя, выращенных в условиях почвенной засухи. Для оценки степени стрессового воздействия на растения ячменя почвенной засухи было проанализировано накопление в листьях опытных и контрольных вариантов АФК (их общее количество и содержание H_2O_2 в отдельности).

Установлено, что предпосевная обработка семян ячменя сорта Аванс раствором АЛК с концентрацией 10 мг/л приводит к снижению общего уровня АФК на 13 % по сравнению с контролем для варианта «АЛК + H_2O» и на 19 % по сравнению с вариантом «засуха» для варианта «АЛК + засуха» (рис. 1, *а*), это указывает на снижение степени окислительного стресса в растительной клетке и способствует повышению устойчивости растений ячменя к засухе, чего не наблюдалось при обработке растений АЛК методом опрыскивания [8].

При анализе данных накопления H_2O_2 в растениях ячменя установлено отсутствие изменения его количества на фоне увеличения общего уровня АФК при действии почвенной засухи (рис. 1, *б*), что, вероятно, указывает на инициацию окислительного стресса по пути образования синглетного кислорода, а не супероксидного радикала, являющегося предшественником H_2O_2. Прайминг семян ячменя АЛК также не влиял на накопление H_2O_2 ни при нормальном поливе, ни при засухе.

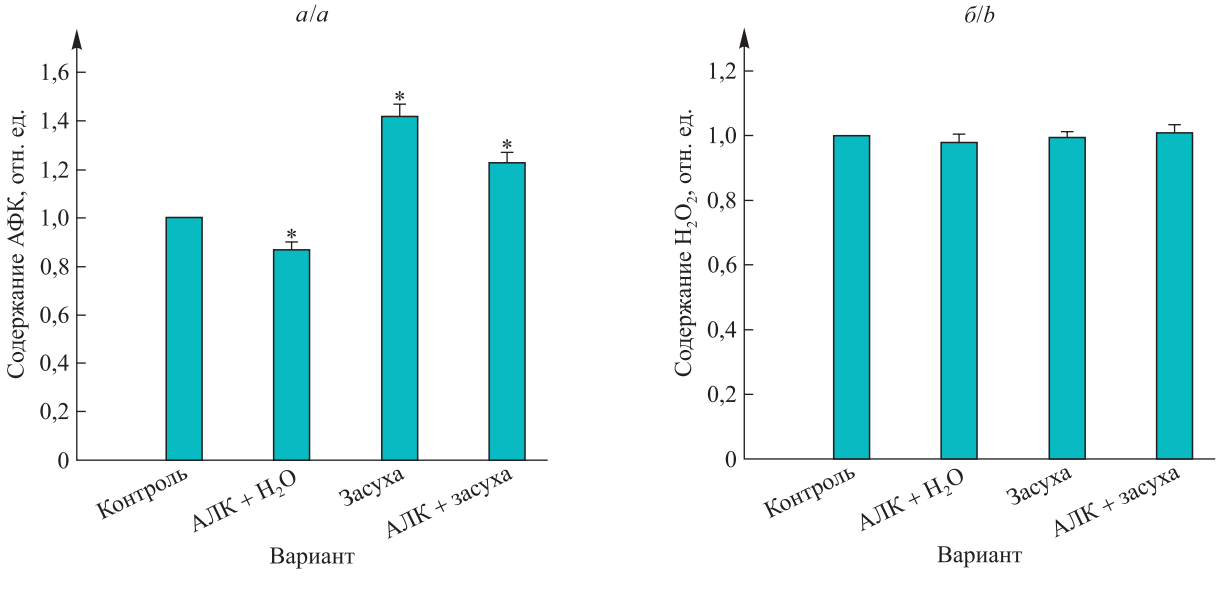


Рис. 1. Влияние предпосевной обработки семян АЛК на накопление в листьях растений ячменя сорта Аванс АФК (*а*) и H_2O_2 (*б*). Знаком * отмечены достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$)

Fig. 1. The influence of pre-sowing treatment of seeds with ALA on the accumulation of reactive oxygen species (*a*) and H_2O_2 (*b*) in leaves of barley plants of the Avans variety. The sign * indicates significant differences compared with the control ($p \leq 0.05$)

Дальнейшие исследования были направлены на выявление особенностей ответа хлоропластных компонентов при действии почвенной засухи на растения ячменя, обработанные АЛК методом прайминга семян.

Влияние прайминга семян АЛК на содержание Хл, Фео и Кар в листьях растений ячменя, выращенных в условиях почвенной засухи. С помощью ВЭЖХ был проанализирован качественный и количественный состав фотосинтетических пигментов листьев растений ячменя сорта Аванс в условиях почвенной засухи. Анализ пигментных экстрактов позволил выявить во всех исследуемых вариантах наличие Кар (неоксантина, виолаксантина, лютеина и β-каротина), а также Хл *a* и Хл *b*, Фео *a* и следовые количества Фео *b* [15].

Ранее нами было показано, что обработка растений ячменя сорта Аванс раствором АЛК с концентрацией 10 мг/л методом опрыскивания в условиях засухи отрицательно влияла на накопление пигментов в растительных клетках и приводила к снижению содержания хлорофилльных пигментов по сравнению с их содержанием в необработанных раствором АЛК растениях [8]. По этой причине в ходе данного исследования изучалось изменение содержания Хл *a* и Хл *b*, а также Кар в 7-дневных проростках ячменя, выращенных в условиях дефицита влаги в почве, после прайминга семян АЛК.

Установлено, что предпосевная обработка семян ячменя сорта Аванс раствором АЛК с концентрацией 10 мг/л не приводила к значительным изменениям общего содержания Хл (Хл *a* + Хл *b*) относительно контроля (табл. 3). При этом стоит отметить, что при обработке растений ячменя раствором АЛК методом прайминга семян наблюдается незначительное (на 3 %) снижение соотношения Хл *a* : Хл *b* (см. табл. 3), это может быть следствием изменения соотношения пигментов в светособирающей антенне фотосистемы.

Таблица 3

Изменение содержания Хл, Фео и Кар в листьях растений ячменя сорта Аванс, обработанных АЛК методом прайминга семян, в условиях почвенной засухи

Table 3

Changes in the content of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in the leaves of barley plants of the Avans variety treated with ALA seed priming under soil drought conditions

Вариант	Содержание, мкг/г сухой массы						
	Неоксантин	Виолаксантин	Лютеин	Хл *a*	Хл *b*	Фео *a*	β-Каротин
Контроль	722 ± 22	302 ± 13	19 628 ± 80	19 729 ± 769	8333 ± 364	121 ± 7	2649 ± 106
АЛК + H_2O	667 ± 16*	288 ± 7	1856 ± 83	18 721 ± 813	7882 ± 362	113 ± 5	2488 ± 117
Засуха	622 ± 24*	222 ± 7*	1860 ± 33	18 366 ± 316	7899 ± 123	120 ± 8	2431 ± 49*
АЛК + засуха	629 ± 25*	234 ± 9*	1872 ± 69	18 519 ± 687	7934 ± 301	120 ± 6	2454 ± 101

*Достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0{,}05$).

Также было проанализировано влияние недостатка воды в почве на содержание Кар (см. табл. 3). Установлено, что растения ячменя сорта Аванс, выращенные в условиях почвенной засухи, отличаются от контроля пониженным содержанием данных соединений в среднем на 8 и 10 % при наличии и отсутствии предпосевной обработки семян АЛК соответственно. При этом наблюдается уменьшение количества ксантофилов неоксантина и виолаксантина. Достоверное снижение содержания β-каротина зарегистрировано только в варианте «засуха». Содержание Фео *a* в опыте достоверно не изменялось.

В целом приведенные выше данные указывают на то, что в отличие от метода опрыскивания листьев растений [8] прайминг семян АЛК не оказывает негативного влияния на содержание фотосинтетических пигментов Хл *a* и Хл *b*, а также β-каротина в растениях ячменя сорта Аванс при действии засухи: достоверных различий в их содержании между контрольными и опытными растениями не выявлено.

Влияние прайминга семян АЛК на содержание структурных белков фотосистем в листьях растений ячменя, выращенных в условиях почвенной засухи. Для определения количества основных структурных белков фотосистем в листьях проростков ячменя, обработанных АЛК методом прайминга семян, в условиях засухи проводили вестерн-блоттинг с использованием антител к белкам PsbA (белок D1 РЦ ФС II), Lhcb2 и Lhcb4 (белки антенны ФС II), а также Lhca2 (белок антенны ФС I).

Анализ содержания структурных белков ФС II (PsbA, Lhcb2 и Lhcb4) и ФС I (Lhca2) в листьях растений ячменя сорта Аванс как при наличии предпосевной обработки семян АЛК, так и без нее показал, что синтез белков внешней антенны ФС II (Lhcb2 и Lhcb4) во всех вариантах оставался в пределах контроля (рис. 2). При этом отмечено некоторое снижение содержания белка РЦ ФС II (PsbA) в растениях, выращенных в условиях засухи (на 14 % в варианте «засуха» и на 7 % в варианте «АЛК + засуха»),

по сравнению с контролем, что может указывать на стабилизирующее действие прайминга семян АЛК в регуляции работы ФСА растений при недостатке влаги в почве. В то же время отмечено увеличение количества белка антенны ФС I (Lhca2) в растениях ячменя, обработанных АЛК методом прайминга семян (как при нормальном поливе, так и при засухе), в среднем на 15 % по сравнению с контрольным вариантом. Повышение содержания данного белка ССК ФС I на фоне отсутствия существенного влияния АЛК на содержание белков ФС II может способствовать перераспределению энергии поглощенных квантов света в пользу ФС I, что является эффективным защитным механизмом, снижающим фотоповреждение ФС II в условиях засухи.

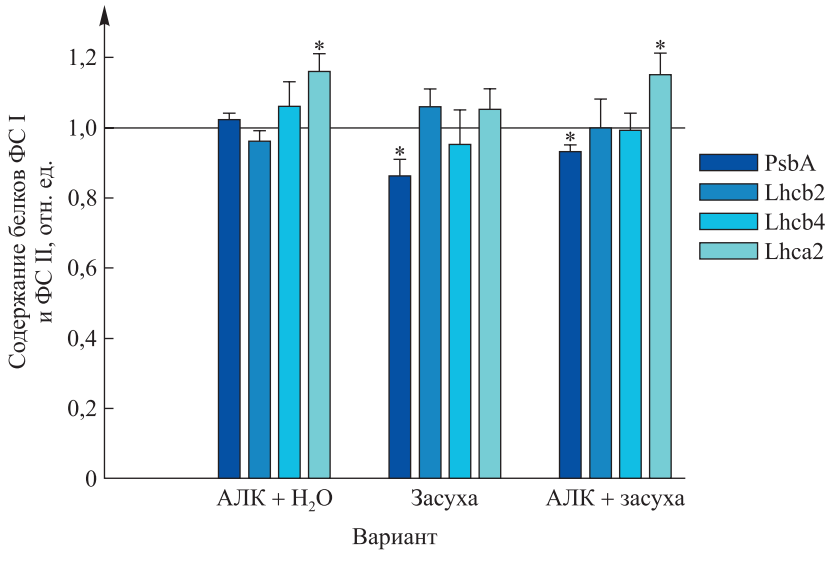


Рис. 2. Содержание белков пигмент-белковых комплексов ФС I и ФС II в листьях растений ячменя сорта Аванс, обработанных АЛК методом прайминга семян, в условиях почвенной засухи.
Контроль принят за единицу и представлен в виде базовой линии.
Знаком * отмечены достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0{,}05$)

Fig. 2. Content of proteins of pigment-protein complexes of photosystem I and photosystem II in leaves of barley plants of the Avans variety treated with ALA seed priming under soil drought conditions.
Control is taken as one and represented by the baseline.
The sign * indicates significant differences compared with the control ($p \leq 0.05$)

Влияние прайминга семян АЛК на фотохимическую активность фотосистем листьев растений ячменя, выращенных в условиях почвенной засухи. Установлено, что прайминг семян АЛК при действии засухи приводит к достоверному снижению уровня фоновой флуоресценции Хл (F_0) и максимального уровня флуоресценции (F_m) адаптированных к темноте листьев растений ячменя в среднем на 20 % по сравнению с контролем (табл. 4). Такая же тенденция к снижению (в среднем на 11 %) зарегистрирована для уровня сигнала P700 (параметры P_m и P'_m), что, вероятно, связано с адаптивным изменением структуры хлорофилльных пигментов в фотосинтетических мембранах в ответ на почвенную засуху для предотвращения повреждения ФСА.

Анализ параметров, характеризующих фотохимическую активность фотосистем, – потенциального квантового выхода фотохимии ФС II ($\frac{F_v}{F_m}$), эффективного квантового выхода фотохимии ФС II (Y(II)) и ФС I (Y(I)), значений Y(ND), Y(NA), коэффициента фотохимического тушения флуоресценции Хл (qP), а также скорости транспорта электронов (ETR(I) и ETR(II)) – не выявил достоверного влияния на них засухи при прайминге семян АЛК, что указывает на отсутствие нарушения работы ССК и электрон-транспортной цепи хлоропластов в условиях стресса (см. табл. 4). При этом важно отметить, что в варианте «АЛК + H_2O» зарегистрировано достоверное увеличение показателей Y(I) и ETR(I), это согласуется с данными вестерн-блоттинга (см. рис. 2), демонстрирующими увеличение при прайминге семян АЛК количества белка Lhca2 ССК ФС I. В варианте «засуха» показатели Y(I) и ETR(I), наоборот, снижались по отношению к контролю, что указывает на подавление в условиях стресса фотохимической активности ФС I. Однако при использовании АЛК (вариант «АЛК + засуха») негативное влияние засухи нивелировалось: показатели Y(I) и ETR(I) соответствовали контролю.

Метод индукции флуоресценции Хл, кроме фотохимической активности фотосистем, позволяет также оценить вклад в тушение флуоресценции нефотохимических процессов. Показатели *qN* и NPQ являются мерой нефотохимического тушения флуоресценции Хл, отражая его общую и регулируемую составляющие соответственно. Согласно полученным данным (см. табл. 4) для всех вариантов экспериментов общая составляющая нефотохимического тушения флуоресценции Хл (*qN*) практически полностью определяется его регулируемой составляющей (NPQ), что указывает на отсутствие либо крайне малый вклад нерегулируемой диссипации энергии в фотосинтетической мембране, которая обычно является следствием деструктивных процессов [21; 23]. Регулируемая диссипация энергии обусловлена в основном работой ксантофилового цикла [24]. При этом в условиях засухи достоверно регистрируется уменьшение значений *qN* и NPQ на 12 и 19 % относительно контроля соответственно. Снижение параметров нефотохимического тушения флуоресценции Хл, в большей степени его регулируемой составляющей (NPQ), при засухе может быть обусловлено уменьшением содержания в листьях растений ячменя ксантофиловых Кар – неоксантина и виолаксантина (см. табл. 3). При обработке семян АЛК в условиях засухи снижение параметров *qN* и NPQ было несколько меньшим, чем без использования АЛК, а именно 8 и 11 % по отношению к контролю соответственно, что также коррелирует с данными об уменьшении содержания ксантофиловых Кар, которое для варианта «АЛК + засуха» было менее значительным, чем для варианта «засуха».

Таблица 4

Параметры индукции флуоресценции Хл и P700 в листьях растений ячменя, обработанных АЛК методом прайминга семян, в нормальных условиях (контроль) и при засухе

Table 4

Parameters of fluorescence induction of chlorophyll and P700 in leaves of barley plants treated with ALA seed priming under normal conditions (control) and under drought

Параметры	Вариант			
	Контроль	АЛК + H_2O	Засуха	АЛК + засуха
F_0	0,81 ± 0,02	0,80 ± 0,02	0,64 ± 0,01*	0,69 ± 0,03*
F_m	4,18 ± 0,11	4,24 ± 0,12	3,28 ± 0,08*	3,49 ± 0,11*
$\frac{F_v}{F_m}$	0,81 ± 0,01	0,81 ± 0,01	0,81 ± 0,01	0,80 ± 0,01
Y(II)	0,68 ± 0,01	0,68 ± 0,01	0,67 ± 0,01	0,69 ± 0,01
ETR(II)	37,43 ± 0,08	37,49 ± 0,12	36,94 ± 0,32	37,74 ± 0,14
Y(NO)	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,26 ± 0,01
Y(NPQ)	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
NPQ	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,21 ± 0,01*	0,23 ± 0,01*
qN	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,21 ± 0,01*	0,22 ± 0,01
qP	0,89 ± 0,01	0,88 ± 0,01	0,88 ± 0,01	0,90 ± 0,01
1 – *qP*	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01
P_m	1,58 ± 0,08	1,49 ± 0,08	1,40 ± 0,07*	1,38 ± 0,06*
P'_m	1,41 ± 0,04	1,36 ± 0,03	1,25 ± 0,03*	1,25 ± 0,02*
Y(I)	0,85 ± 0,01	0,88 ± 0,01*	0,82 ± 0,01*	0,85 ± 0,01
ETR(I)	46,85 ± 0,20	48,20 ± 0,17*	45,33 ± 0,27*	46,92 ± 0,17
Y(ND)	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,01*	0,05 ± 0,01
Y(NA)	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01

Примечания: 1. Параметры *Y*(NPQ) и *Y*(NO) – квантовые выходы регулируемой и нерегулируемой диссипации энергии в ФС II соответственно. 2. Знаком * отмечены достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Приведенные данные указывают на то, что прайминг семян АЛК способствует поддержанию стабильного функционирования ФСА растений ячменя в условиях засухи, обеспечивая устойчивость фотохимической активности фотосистем и при этом снижая подавление регулируемой составляющей нефотохимического тушения флуоресценции Хл как важного защитного механизма при стрессе.

Заключение

Таким образом, прайминг семян АЛК приводит к уменьшению в листьях растений ячменя общего содержания АФК (на 13 % по сравнению с контролем для варианта «АЛК + H_2O» и на 19 % по сравнению с вариантом «засуха» для варианта «АЛК + засуха»), что указывает на снижение степени окислительного стресса в растительной клетке и способствует повышению устойчивости растений ячменя сорта Аванс к засухе.

Показано, что прайминг семян АЛК, в отличие от метода опрыскивания листьев растений, не оказывает негативного влияния на содержание в листьях растений ячменя сорта Аванс фотосинтетических пигментов Хл *a* и Хл *b*, а также β-каротина при действии засухи. При этом снижение содержания ксантофиловых Кар (неоксантина и виолаксантина), зафиксированное в условиях засухи, было менее значительным при использовании АЛК, а снижения содержания β-каротина не наблюдалось, что свидетельствует о стабилизирующем действии АЛК на пигментный аппарат.

Установлено, что прайминг семян АЛК приводит к увеличению количества белка Lhca2 ССК ФС I на фоне отсутствия существенного влияния АЛК на содержание белков ФС II как при засухе, так и при нормальном поливе. Данное обстоятельство может способствовать перераспределению энергии поглощенных квантов света в пользу ФС I и является эффективным защитным механизмом, снижающим фотоповреждение ФС II при окислительном стрессе.

Отмечено, что прайминг семян АЛК способствует поддержанию стабильного функционирования ФСА растений ячменя в условиях засухи, обеспечивая устойчивость фотохимической активности фотосистем и при этом снижая подавление регулируемой составляющей нефотохимического тушения флуоресценции Хл как важного защитного механизма при стрессе.

Библиографические ссылки

1. Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development.* 2009;29(1):185–212. DOI: 10.1051/agro:2008021.

2. Wang X, Gao Y, Wang Q, Chen M, Ye X, Li D, et al. 24-Epibrassinolide-alleviated drought stress damage influences antioxidant enzymes and autophagy changes in peach (*Prunus persicae* L.) leaves. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2019;135:30–40. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.11.026.

3. Noctor G, Reichheld J-P, Foyer CH. ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2018;80:3–12. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.07.013.

4. Ashraf M, Harris PJC. Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica.* 2013;51(2):163–190. DOI: 10.1007/s11099-013-0021-6.

5. Bartels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 2005;24(1):23–58. DOI: 10.1080/07352680590910410.

6. Chan Z, Shi H. Improved abiotic stress tolerance of bermudagrass by exogenous small molecules. *Plant Signaling & Behavior.* 2015;10(3):e991577. DOI: 10.4161/15592324.2014.991577.

7. Яронская ЕБ, Балута ТВ, Коляго ВМ, Шалыго НВ. Влияние 5-аминолевулиновой кислоты на рост растений ячменя и содержание пигментов. В: Зорина ТЕ, редактор. *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Международная научная конференция, Шестой съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков; 6–8 октября 2004 г.; Минск, Беларусь. Часть 1.* Минск: Редакционно-издательский центр Академии управления при Президенте Республики Беларусь; 2004. с. 117–119.

8. Kuryanchyk TG, Kozel NV. Photosynthetic apparatus of barley plants treated with 5-aminolevulinic acid: mechanisms of adaptation to drought. *Experimental Biology and Biotechnology.* 2022;3:26–38. Russian. DOI: 10.33581/2957-5060-2022-3-26-38.

9. Прищепчик ЮВ, Аверина НГ. Влияние биопрайминга семян льна 5-аминолевулиновой кислотой на энергию прорастания и всхожесть. В: Волотовский ИД, редактор. *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Международная научная конференция, Двенадцатый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков; 28–30 июня 2016 г.; Минск, Беларусь. Часть 2.* Минск: Издательский центр БГУ; 2016. с. 76–79.

10. Вязов ЕВ. *Механизмы адаптации фотосинтетического аппарата и защитной системы растений огурца к светодиодному излучению различного спектрального состава* [диссертация]. Минск: [б. и.]; 2017. 157 с.

11. Crow JP. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide.* 1997;1(2):145–157. DOI: 10.1006/niox.1996.0113.

12. Kozel NV, Shalygo NV. Barley leaf antioxidant system under photooxidative stress induced by Rose Bengal. *Fiziologiya rastenii.* 2009;56(3):351–358. EDN: KAVKHB.

13. Козел НВ. *Фотоокислительные процессы, индуцированные в растениях ячменя и табака сенсибилизаторами ксантеновой природы* [диссертация]. Минск: [б. и.]; 2009. 146 с.

14. Mohanty JG, Jaffe JS, Schulman ES, Raible DG. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H_2O_2 release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *Journal of Immunological Methods.* 1997;202(2):133–141. DOI: 10.1016/s0022-1759(96)00244-x.

15. Kaliaha TG, Kozel NV. The effect of soil drought on the content of photosynthetic pigments in barley plants of the Brovar variety. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2020;3:46–53. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-3-46-53.

16. Azarin K, Usatov A, Makarenko M, Kozel N, Kovalevich A, Dremuk I, et al. A point mutation in the photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 gene confers variegation in *Helianthus annuus* L. *Plant Molecular Biology.* 2020;103(4–5):373–389. DOI: 10.1007/s11103-020-00997-x.

17. Jansson S, Stefánsson H, Nyström U, Gustafsson P, Albertsson P-Å. Antenna protein composition of PS I and PS II in thylakoid sub-domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics.* 1997;1320(3):297–309. DOI: 10.1016/S0005-2728(97)00033-9.

18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1976;72(1–2):248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

19. *Dual-PAM-100 measuring system for simultaneous assessment of P700 and chlorophyll fluorescence. Instrument description and instructions for users.* 2nd edition. Effeltrich: Heinz Walz; 2009. 87 p.

20. Makarenko MS, Kozel NV, Usatov AV, Gorbachenko OF, Averina NG. A state of PS I and PS II photochemistry of sunflower yellow-green plastome mutant. *Online Journal of Biological Sciences.* 2016;16(4):193–196. DOI: 10.3844/ojbsci.2016.193.198.

21. Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE. New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research.* 2004;79(2):209–218. DOI: 10.1023/B:PRES.0000015391.99477.0d.

22. Klughammer C, Schreiber U. An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via $P700^+$-absorbance changes at 830 nm. *Planta.* 1994;192(2):261–268. DOI: 10.1007/BF01089043.

23. Busch F, Hüner NPA, Ensminger I. Biochemical constrains limit the potential of the photochemical reflectance index as a predictor of effective quantum efficiency of photosynthesis during the winter spring transition in jack pine seedlings. *Functional Plant Biology.* 2009;36(11):1016–1026. DOI: 10.1071/FP08043.

24. Latowski D, Kuczyńska P, Strzałka K. Xanthophyll cycle – a mechanism protecting plants against oxidative stress. *Redox Report.* 2011;16(2):78–90. DOI: 10.1179/174329211X13020951739938.

Получена 03.06.2024 / исправлена 25.07.2024 / принята 02.09.2024.
Received 03.06.2024 / revised 25.07.2024 / accepted 02.09.2024.

Биохимия

Biochemistry

УДК 577.15:577.21

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ *NICOTIANA TABACUM*, ВЫРАЩЕННЫХ В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

***К. В. ПРИСТУПА*[1)], *Т. А. КУКУЛЯНСКАЯ*[1)], *Е. А. ХРАМЦОВА*[1)]**

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

Аннотация. Проведен сравнительный анализ ряда биохимических характеристик нетрансгенных и трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, выращенных на почве с повышенной концентрацией солей тяжелых металлов. Трансгенные растения несли в своем геноме бактериальный ген *acdS*, кодирующий 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминазу (АЦК-дезаминазу). Обработка почвы солями меди(II), хрома(VI) и свинца(II) в повышенных концентрациях способствовала индукции экспрессии гена *acdS* и увеличению активности АЦК-дезаминазы в трансгенных растениях. Показано, что при выращивании растений в условиях абиотического стресса возрастала активность супероксиддисмутазы, каталазы, полифенолоксидазы и аскорбатоксидазы, а также интенсивность процессов пероксидазного окисления.

Ключевые слова: антиоксидантная система; каталаза; оксидазы; ферментативные антиоксиданты; ген *acdS*; *Nicotiana tabacum*.

Образец цитирования:
Приступа КВ, Кукулянская ТА, Храмцова ЕА. Изучение активности некоторых антиоксидантных ферментов в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях абиотического стресса. *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2024;3:22–29.
EDN: NKOMPQ

For citation:
Pristupa KV, Kukulianskaya TA, Khramtsova EA. The study of activity of several antioxidant enzymes in transgenic plants *Nicotiana tabacum* under abiotic stress conditions. *Experimental Biology and Biotechnology.* 2024;3:22–29. Russian.
EDN: NKOMPQ

Авторы:
Кристина Владимировна Приступа – старший преподаватель кафедры биохимии биологического факультета.
Татьяна Александровна Кукулянская – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры биохимии биологического факультета.
Елена Аркадьевна Храмцова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:
Kristina V. Pristupa, senior lecturer at the department of biochemistry, faculty of biology.
kristina.pristupa@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-1977-4949
Tatsiana A. Kukulianskaya, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology.
tak14@tut.by
https://orcid.org/0000-0002-4204-658X
Elena A. Khramtsova, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.
elena_khramtsova@inbox.ru

THE STUDY OF ACTIVITY OF SEVERAL ANTIOXIDANT ENZYMES IN TRANSGENIC PLANTS *NICOTIANA TABACUM* UNDER ABIOTIC STRESS CONDITIONS

***K. V. PRISTUPA*[a], *T. A. KUKULIANSKAYA*[a], *E. A. KHRAMTSOVA*[a]**

[a]*Belarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*
Corresponding author: K. V. Pristupa (kristina.pristupa@mail.ru)

Abstract. We conducted a comparative analysis of several biochemical parameters for non-transgenic and transgenic plants *Nicotiana tabacum*. Plants were cultivated in heavy metal polluted soils. Transgenic plants had in their genome a bacterial *acdS* gene encoding the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC deaminase). Soil treatment with salts of copper(II), chromium(VI) and lead(II) in elevated concentrations promoted induction of the *acdS* gene expression and an increase in ACC deaminase activity in transgenic plants. It was shown the activity of superoxide dismutase, catalase, polyphenol oxidase, ascorbate oxidase, and intensity of peroxidase oxidation processes increased in plants under abiotic stress.

Keywords: antioxidant system; catalase; oxidases; enzymatic antioxidants; *acdS* gene; *Nicotiana tabacum*.

Введение

В настоящее время повышение устойчивости сельскохозяйственных растений к неблагоприятным факторам окружающей среды является одной из важнейших задач, которые решают ученые со всего мира. В связи с постоянно усиливающимся техногенным воздействием на природные сообщества, а также ухудшением экологической обстановки на территориях, занятых сельскохозяйственным производством, данное направление считается актуальным во многих странах. Растения, произрастающие в неблагоприятных условиях, в той или иной степени подвергаются абиотическому стрессу, что может быть обусловлено загрязнением почв тяжелыми металлами, засухой, засолением, влиянием высоких и низких температур и т. д. [1; 2].

При стрессовых воздействиях содержание активных форм кислорода (АФК) в растительных клетках начинает возрастать и, как следствие, значительно повышается интенсивность свободнорадикальных окислительных процессов. АФК подавляют активность ряда ферментов, вызывают деградацию клеточных биополимеров, нарушают проницаемость биологических мембран, останавливают клеточный цикл и приводят к запрограммированной клеточной гибели [3]. В ответ на усиление генерации АФК, как правило, наблюдается активация энзиматических компонентов антиоксидантной защитной системы растений [4].

Развитие абиотического стресса сопровождается образованием избыточного количества этилена в растениях. Этилен представляет собой фитогормон, который участвует в регуляции прорастания семян, роста корней и стеблей, образования цветков, созревания плодов. Однако его чрезмерное накопление приводит к изменению параметров роста и развития растений, ускорению старения, пожелтению листьев и опадению плодов. Одним их современных способов снижения избыточного количества этилена в растениях является создание трансгенных форм, которые несут в своем геноме бактериальный ген *acdS*, кодирующий 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминазу (АЦК-дезаминазу). Данный фермент катализирует превращение предшественника этилена – 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (АЦК) – до аммиака и α-кетобутирата, которые не оказывают негативного влияния на растения [5; 6].

Устойчивость растений к неблагоприятным условиям окружающей среды, вызывающим стресс, в значительной степени обеспечивается функционированием антиоксидантной системы. Во многих странах проводится изучение антиоксидантной системы растений под влиянием избыточной концентрации тяжелых металлов в почве, создаются трансгенные растения, которые характеризуются сверхэкспрессией генов, кодирующих ферменты антиоксидантной защиты [7]. Имеются данные об изменении состояния и эффективности антистрессового действия ферментативных антиоксидантов для ряда растений, инокулированных бактериями, которые несут в своем геноме ген *acdS* [8]. Однако исследование состояния антиоксидантной системы трансгенных растений, имеющих этот ген, в условиях загрязнения почв солями тяжелых металлов не проводилось.

Целью настоящей работы является изучение влияния тяжелых металлов, внесенных в почву, на активность ряда ферментов в нетрансгенных и трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, несущих ген *acdS* бактерий *Pseudomonas putida* B-37.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования выступали нетрансгенные и трансгенные растения *N. tabacum*, несущие ген *acdS* бактерий *P. putida* B-37. Предметом исследования являлась активность супероксиддисмутазы, каталазы, полифенолоксидазы и аскорбатоксидазы, а также интенсивность процессов пероксидазного окисления в нетрансгенных и трансгенных растениях табака.

Растения были разделены на четыре серии:

- контрольную серию (без обработки почвы солями тяжелых металлов);
- серию 1 (обработка $CuSO_4$ в концентрации 30 мг на 1 кг почвы);
- серию 2 (обработка $K_2Cr_2O_7$ в концентрации 15 мг на 1 кг почвы);
- серию 3 (обработка $Pb(CH_3COO)_2$ в концентрации 15 мг на 1 кг почвы).

Каждая серия включала в себя пять трансгенных растений линии 4-12 и пять нетрансгенных растений *N. tabacum*.

Обработку почвы ионами тяжелых металлов проводили однократно с учетом их предельно допустимой концентрации (ПДК): вносимое количество должно было превышать ПДК в 5 раз.

Создание трансгенных растений осуществлялось согласно методике, описанной А. А. Мельниковой и соавторами. Линия трансгенных растений *N. tabacum* 4-12 получена с использованием векторной конструкции pBI121-acdS, несущей ген *acdS* бактерий *P. putida* B-37, который находится под контролем конститутивного промотора CaMV 35S. Генетическая конструкция была введена в клетки *Agrobacterium tumefaciens* AGL0. Полученный агробактериальный штамм использовался для трансформации каллусов *N. tabacum*. Следует отметить, что результаты ПЦР со специфическими к гену *acdS* праймерами подтвердили наличие целевого гена в трансгенных растениях *N. tabacum* [9].

Семена стерильно высевали на увлажненные фильтры и в течение 2 сут выдерживали в темноте при температуре (20,0 ± 0,5) °C для прорастания. Затем проростки помещали в климатокамеру с температурой (20,0 ± 0,5) °C и 16-часовым световым днем. Через 14 сут растения пересаживали в стаканчики со стерильной почвой (50 г). Дальнейшее культивирование производили при температуре (20,0 ± 0,5) °C, влажности 70–80 % и 16-часовом световом дне на протяжении 8 нед.

Растительный материал в виде листьев (0,5 г) гомогенизировали в 0,1 моль/л калий-фосфатном буфере (pH 7,8), затем доводили объем до 10 мл. Полученные гомогенаты трижды по 15 с подвергали ультразвуковому воздействию при частоте 11 кГц с применением дезинтегратора УЗДН-2Т (НПП «Академприбор», Россия), после чего центрифугировали в течение 15 мин при скорости 10 000 об/мин. Все процедуры производили на холоде (4 °C). Клеточные экстракты использовали для определения активности ферментативных антиоксидантов и содержания белка в растениях.

Интенсивность процессов пероксидазного окисления оценивали с помощью кинетического метода, основанного на определении скорости накопления продуктов окисления бензидина пероксидом водорода в присутствии экстракта растений [10].

Активность каталазы определяли методом, основанным на способности пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс при длине волны 410 нм [11].

Активность супероксиддисмутазы оценивали по степени ингибирования реакции аутоокисления кверцетина [12].

Определение активности аскорбатоксидазы базируется на свойстве аскорбиновой кислоты поглощать свет с максимумом при длине волны 265 нм [13].

Активность полифенолоксидазы устанавливали спектрофотометрическим методом, основанным на измерении оптической плотности продуктов реакции, которые образуются при окислении пирокатехина за определенный промежуток времени [10].

Содержание белка в растительных экстрактах определяли биуретовым методом при длине волны 540 нм[1].

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью лицензионного пакета программ *Statistica* (версия 6.0). Данные представлены как средние арифметические величины ± среднестатистические ошибки средних арифметических величин. Оценку достоверности различий средних арифметических величин проводили на основании коэффициента Стьюдента. Различия между группами считали достоверными при двустороннем уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При загрязнении почвы солями тяжелых металлов наблюдается изменение ростовых характеристик растений. В рамках проведенного опыта по прошествии 3 мес. определены длина корня, стебля и биомасса растений. Так как в результате абиотического стресса длина корня и растения в целом уменьшалась,

[1] *Семак И. В., Зырянова Т. Н., Губич О. И.* Биохимия белков : практикум для студентов биол. фак. спец. 1-31 01 01 «Биология». Минск : БГУ, 2007. 49 с.

то было предположено, что будет изменяться и биомасса нетрансгенных и трансгенных растений, выращенных в условиях эксперимента. Средние значения биомассы нетрансгенных и трансгенных растений табака приведены в табл. 1.

Таблица 1

Средние значения биомассы нетрансгенных и трансгенных растений *N. tabacum*, г

Table 1

The average biomass of non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, g

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения
Контрольная серия (без обработки почвы солями тяжелых металлов)	17,95 ± 0,11	20,38 ± 0,03
Серия 1 (обработка Cu^{2+} в количестве 5 × ПДК)	7,79 ± 0,06	12,38 ± 0,05
Серия 2 (обработка Cr^{6+} в количестве 5 × ПДК)	6,67 ± 0,06	8,05 ± 0,05
Серия 3 (обработка Pb^{2+} в количестве 5 × ПДК)	7,12 ± 0,08	10,76 ± 0,04

Примечание. Различия между контрольной и опытными сериями, а также между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях, во всех случаях являются достоверными ($p \le 0,05$).

Данные, представленные в табл. 1, отображают увеличение биомассы трансгенных растений табака, выращенных в условиях загрязнения почвы солями тяжелых металлов, относительно биомассы нетрансгенных растений, выращенных в аналогичных условиях, в 1,13–1,59 раза. Таким образом, было отмечено положительное влияние гена *acdS* бактерий *P. putida* B-37 на ростовые характеристики трансгенных растений табака, культивируемых под воздействием абиотического стресса.

Кроме того, ранее нами была определена удельная активность АЦК-дезаминазы в трансгенных растениях *N. tabacum* при загрязнении почвы солями тяжелых металлов. Воздействие на почву тяжелых металлов повышало активность фермента в 8–12 раз. Такое изменение активности АЦК-дезаминазы, вероятно, свидетельствует об индукции экспрессии гена, кодирующего АЦК-дезаминазу, под влиянием абиотических факторов окружающей среды [14].

Следует отметить, что развитие стресса у растений в условиях загрязнения почвы солями тяжелых металлов сопровождается активацией свободнорадикальных окислительных процессов в клетке, что, в свою очередь, ведет к повышению активности ферментов антиоксидантной системы [4]. В связи с этим нами была определена активность супероксиддисмутазы (табл. 2).

Таблица 2

Активность супероксиддисмутазы в нетрансгенных и трансгенных растениях *N. tabacum*, единиц активности на 1 мг белка

Table 2

Superoxide dismutase activity in non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, units of activity per 1 mg of protein

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения
Контрольная серия (без обработки почвы солями тяжелых металлов)	0,26 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Серия 1 (обработка Cu^{2+} в количестве 5 × ПДК)	0,71 ± 0,03*	0,43 ± 0,02*, **
Серия 2 (обработка Cr^{6+} в количестве 5 × ПДК)	0,97 ± 0,05*	0,50 ± 0,03*, **
Серия 3 (обработка Pb^{2+} в количестве 5 × ПДК)	0,89 ± 0,04*	0,46 ± 0,02*, **

Примечание. Знаком * отмечены достоверные различия между контрольной и опытными сериями ($p \le 0,05$), а знаком ** – достоверные различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях ($p \le 0,05$).

Как видно из представленных в табл. 2 данных, при обработке почвы солями тяжелых металлов активность супероксиддисмутазы значительно увеличилась как в трансгенных, так и в нетрансгенных растениях. В нетрансгенных растениях при внесении в почву 5-кратной ПДК ионов меди(II), хрома(VI) и свинца(II) активность фермента возросла в 2,7; 3,7 и 3,4 раза соответственно по сравнению с его активностью в растениях контрольной серии. В трансгенных растениях линии 4-12 при обработке почвы

солями меди(II), хрома(VI) и свинца(II) активность супероксиддисмутазы была соответственно в 1,5; 1,7 и 1,6 раза выше, чем в серии растений, которые не подвергались абиотическим стрессовым воздействиям.

Кроме того, в ходе работы определена активность каталазы в экстрактах растений *N. tabacum* всех серий (табл. 3).

Таблица 3

Активность каталазы в нетрансгенных и трансгенных растениях *N. tabacum*, мкмоль/мин на 1 мг белка

Table 3

Catalase activity in non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, μmol/min per 1 mg of protein

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения
Контрольная серия (без обработки почвы солями тяжелых металлов)	8,75 ± 0,29	9,56 ± 0,34
Серия 1 (обработка Cu^{2+} в количестве 5 × ПДК)	21,81 ± 0,32*	15,88 ± 0,33*, **
Серия 2 (обработка Cr^{6+} в количестве 5 × ПДК)	27,68 ± 0,24*	16,96 ± 0,25*, **
Серия 3 (обработка Pb^{2+} в количестве 5 × ПДК)	25,24 ± 0,32*	16,05 ± 0,31*, **

Примечание. Знаком * отмечены достоверные различия между контрольной и опытными сериями ($p \le 0,05$), а знаком ** – достоверные различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях ($p \le 0,05$).

На основе данных табл. 3 можно сделать вывод о том, что трансгенные растения *N. tabacum* отличаются более низкой активностью каталазы по сравнению с нетрансгенными растениями при загрязнении почвы солями тяжелых металлов. Так, для нетрансгенных растений при обработке почвы 5-кратной ПДК ионов меди(II), хрома(VI) и свинца(II) наблюдалось увеличение активности фермента в 2,5; 3,2 и 2,9 раза соответственно относительно его активности в контрольных образцах, выращенных без воздействия абиотического стресса. В трансгенных растениях линии 4-12 при внесении в почву солей меди(II), хрома(VI) и свинца(II) активность каталазы выросла в 1,7; 1,8 и 1,7 раза соответственно по сравнению с таковой в серии растений, почва которых не обрабатывалась солями тяжелых металлов.

Также была определена интенсивность процессов пероксидазного окисления во всех сериях нетрансгенных и трансгенных растений *N. tabacum* (табл. 4).

Таблица 4

Интенсивность процессов пероксидазного окисления в нетрансгенных и трансгенных растениях *N. tabacum*, мкмоль/мин на 1 мг белка

Table 4

Intensity of peroxidase oxidation processes in non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, μmol/min per 1 mg of protein

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения
Контрольная серия (без обработки почвы солями тяжелых металлов)	2,32 ± 0,06	2,51 ± 0,07
Серия 1 (обработка Cu^{2+} в количестве 5 × ПДК)	6,53 ± 0,08*	3,61 ± 0,05*, **
Серия 2 (обработка Cr^{6+} в количестве 5 × ПДК)	7,96 ± 0,06*	4,03 ± 0,06*, **
Серия 3 (обработка Pb^{2+} в количестве 5 × ПДК)	6,88 ± 0,05*	3,87 ± 0,05*, **

Примечание. Знаком * отмечены достоверные различия между контрольной и опытными сериями ($p \le 0,05$), а знаком ** – достоверные различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях ($p \le 0,05$).

Как видно из представленных в табл. 4 данных, трансгенные растения *N. tabacum* отличаются более низкой интенсивностью процессов пероксидазного окисления по сравнению с нетрансгенными растениями при обработке почвы солями тяжелых металлов. Максимальная интенсивность процессов пероксидазного окисления отмечена при внесении в почву ионов хрома(VI): в нетрансгенных растениях она выросла в 3,4 раза, в трансгенных растениях – в 1,6 раза относительно интенсивности данных процессов в серии растений, выращенных без воздействия абиотического стресса.

Полученные нами данные об активности супероксиддисмутазы и каталазы, а также интенсивности процессов пероксидазного окисления в растениях *N. tabacum* могут свидетельствовать об активации ферментов антиоксидантной защиты при внесении в почву солей тяжелых металлов, что, вероятно, связано с усилением процессов свободного окисления, сопровождающихся образованием АФК. Однако в трансгенных растениях активность исследуемых ферментов при обработке почвы солями тяжелых металлов увеличивается в меньшей степени, чем в нетрансгенных растениях. Возможно, это обусловлено тем, что в трансгенных растениях снижается образование АФК, в частности пероксида водорода, который является субстратом как для каталазы, так и для пероксидаз. По этой причине трансгенные растения имеют более низкую активность данных антиоксидантов по сравнению с нетрансгенными растениями при обработке почвы ионами тяжелых металлов.

На следующем этапе работы было изучено влияние тяжелых металлов на активность полифенолоксидазы (табл. 5) и аскорбатоксидазы (табл. 6).

Таблица 5

Активность полифенолоксидазы в нетрансгенных и трансгенных растениях *N. tabacum*, мкмоль/мин на 1 мг белка

Table 5

Activity of polyphenol oxidase in non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, μmol/min per 1 mg of protein

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения
Контрольная серия (без обработки почвы солями тяжелых металлов)	0,85 ± 0,02	0,86 ± 0,02
Серия 1 (обработка Cu^{2+} в количестве 5 × ПДК)	1,42 ± 0,04*	1,25 ± 0,03*, **
Серия 2 (обработка Cr^{6+} в количестве 5 × ПДК)	1,73 ± 0,04*	1,44 ± 0,03*, **
Серия 3 (обработка Pb^{2+} в количестве 5 × ПДК)	1,06 ± 0,03*	0,96 ± 0,03*

Примечание. Знаком * отмечены достоверные различия между контрольной и опытными сериями ($p \le 0,05$), а знаком ** – достоверные различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях ($p \le 0,05$).

Согласно приведенным в табл. 5 данным при обработке почвы 5-кратной ПДК ионов меди(II), хрома(VI) и свинца(II) активность полифенолоксидазы в нетрансгенных растениях увеличилась в 1,7; 2,1 и 1,2 раза соответственно по сравнению с ее активностью в растениях, выращенных в нормальных условиях. В трансгенных растениях при внесении в почву солей меди(II), хрома(VI) и свинца(II) активность фермента выросла в 1,5; 1,7 и 1,1 раза соответственно относительно таковой в растениях, которые выращивались на почве, не загрязненной солями тяжелых металлов.

Таблица 6

Активность аскорбатоксидазы в нетрансгенных и трансгенных растениях *N. tabacum*, мкмоль/мин на 1 мг белка

Table 6

Activity of ascorbate oxidase in non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, μmol/min per 1 mg of protein

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения
Контрольная серия (без обработки почвы солями тяжелых металлов)	0,040 ± 0,002	0,040 ± 0,002
Серия 1 (обработка Cu^{2+} в количестве 5 × ПДК)	0,110 ± 0,006*	0,060 ± 0,002*, **
Серия 2 (обработка Cr^{6+} в количестве 5 × ПДК)	0,130 ± 0,007*	0,090 ± 0,004*, **
Серия 3 (обработка Pb^{2+} в количестве 5 × ПДК)	0,100 ± 0,005*	0,050 ± 0,002*, **

Примечание. Знаком * отмечены достоверные различия между контрольной и опытными сериями ($p \le 0,05$), а знаком ** – достоверные различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях ($p \le 0,05$).

Как видно из данных табл. 6, в нетрансгенных растениях при обработке почвы ионами меди(II), хрома(VI) и свинца(II) активность аскорбатоксидазы выросла в 2,8; 3,3 и 2,5 раза соответственно по

сравнению с ее активностью в растениях, выращенных без воздействия абиотического стресса. В трансгенных растениях при внесении в почву солей меди(II), хрома(VI) и свинца(II) активность данного фермента увеличилась в 1,5; 2,3 и 1,3 раза соответственно относительно контроля.

Полученные нами данные об активности ряда ферментов антиоксидантной защиты согласуются с результатами предыдущих исследований, согласно которым трансгенные растения *N. tabacum* отличались более низкой общей антиоксидантной активностью [15], а также более низкой интенсивностью процессов перекисного окисления липидов по сравнению с нетрансгенными растениями в условиях абиотического стресса [16]. Кроме того, ранее нами было установлено, что при внесении в почву ионов Cu^{2+}, Cr^{6+}, Pb^{2+} трансгенные растения *N. tabacum* имели более высокое содержание низкомолекулярных компонентов (глутатиона, аскорбиновой кислоты) и более низкую активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла, чем нетрансгенные растения [17].

Следует упомянуть, что полученные данные согласуются с тем фактом, что для ряда растений, инокулированных бактериями, которые несли в своем геноме ген *acdS*, в условиях абиотического стресса наблюдалась более низкая активность антиоксидантных ферментов. Например, растения кукурузы, инокулированные бактериями *P. putida*, при загрязнении почвы солями тяжелых металлов характеризовались более низкой активностью супероксиддисмутазы, каталазы и ряда пероксидаз, чем неинокулированные растения [8]. Растения картофеля, выращенные в условиях воздействия на почву солей тяжелых металлов и инокулированные бактериями *Bacillus* sp., имеющими фермент АЦК-дезаминазу, отличались более низкой активностью супероксиддисмутазы и каталазы по сравнению с растениями картофеля, выращенными в загрязненной тяжелыми металлами почве [18].

Заключение

Таким образом, трансгенные растения, которые несут в своем геноме бактериальный ген *acdS* и могут синтезировать АЦК-дезаминазу, в меньшей степени подвержены воздействию повышенных концентраций ионов тяжелых металлов, присутствующих в почве. Следует отметить, что трансгенные растения *N. tabacum*, которые выращивались на загрязненной почве, имели лучшие ростовые характеристики (бóльшую длину стебля, корня) и более высокую биомассу, чем нетрансгенные образцы.

Полученные результаты свидетельствуют об увеличении активности ряда оксидаз, каталазы, супероксиддисмутазы и интенсивности процессов пероксидазного окисления в условиях абиотического стресса, вызванного обработкой почвы ионами Cu^{2+}, Cr^{6+}, Pb^{2+}. Установлено, что максимальная чувствительность растений к загрязнению почвы солями тяжелых металлов отмечалась при внесении в почву солей хрома(VI).

Практическая значимость данного исследования связана с использованием трансгенных растений, которые экспрессируют бактериальный ген АЦК-дезаминазы (*acdS*) и обладают повышенной устойчивостью к неблагоприятным воздействиям окружающей среды.

Библиографические ссылки

1. Glick BR. Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in Applied Microbiology.* 2004;56:291–312. DOI: 10.1016/S0065-2164(04)56009-4.

2. Grichko VP, Glick BR. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2001;39(1):11–17. DOI: 10.1016/S0981-9428(00)01212-2.

3. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology.* 2000; 153(1–3):83–104. DOI: 10.1016/s0300-483x(00)00306-1.

4. Ahmad P, Sarwat M, Sharma S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology.* 2008; 51(3):167–173. DOI: 10.1007/BF03030694.

5. Sergeeva E, Shah S, Glick BR. Growth of transgenic canola (*Brassica napus* cv. Westar) expressing a bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene on high concentrations of salt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2006;22(3):277–282. DOI: 10.1007/s11274-005-9032-1.

6. Glick BR. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters.* 2005; 251(1):1–7. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.07.030.

7. Lee Y-P, Kim S-H, Bang J-W, Lee H-S, Kwak S-S, Kwon S-Y. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports.* 2007;26(5):591–598. DOI: 10.1007/s00299-006-0253-z.

8. Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research.* 2016;184:13–24. DOI: 10.1016/j.micres.2015.12.003.

9. Melnikava AA, Khramtsova AA, Karaleva KS, Rutkevich DA, Kukulianskaya TA. Expression analysis of *acdS*-gene of *Pseudomonas putida* B-37 in transgenic plants *Nicotiana tabacum*. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2019;1:45–53. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-1-45-53.

10. Soffan A, Alghamdi SS, Aldawood AS. Peroxidase and polyphenol oxidase activity in moderate resistant and susceptible *Vicia faba* induced by *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphididae) infestation. *Journal of Insect Science*. 2014;14(1):285. DOI: 10.1093/jisesa/ieu147.

11. Korolyuk MA, Ivanova LI, Maiorova IG, Tokarev VE. Method for determining catalase activity. *Laboratornoe delo*. 1988;1:16–19. Russian. EDN: SICXEJ.

12. Kostyuk VA, Potapovich AI, Kovaleva ZhV. A simple, sensitive assay for determination of superoxide dismutase activity based on reaction of quercetin oxidation. *Voprosy meditsinskoi khimii*. 1990;36(2):88–91. Russian. EDN: SCXIZD.

13. Starlin T, Gopalakrishnan VK. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of *Tylophora pauciflora* Wight and Arn. – an *in vitro* study. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* [Internet]. 2013 [cited 2024 May 17];6(supplement 4):68–71. Available from: https://journals.innovareacademics.in/index.php/ajpcr/article/view/393.

14. Rutkevich DA, Karaleva KS, Khramtsova EA. The influence of bacteria *acdS*-gene of *Pseudomonas putida* B-37 on *Nicotiana tabacum* transgenic plants under abiotic stress conditions. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2020;1:39–46. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-1-39-46.

15. Pristupa KV, Kukulianskaya TA, Khramtsova EA. Analysis of the low-molecular weight antioxidants of transgenic plants *Nicotiana tabacum* under abiotic stress conditions. *Journal of the Belarusian State University*. *Biology.* 2020;1:20–26. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-1-20-26.

16. Приступа КВ, Королева ЕС, Кукулянская ТА, Руткевич ДА. Оценка состояния антиоксидантной системы трансгенных растений *Nicotiana tabacum* в условиях абиотического стресса. В: *Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии. Сборник тезисов докладов 19-й Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева; 15–16 апреля 2019 г.; Москва, Россия.* Москва: Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии; 2019. с. 55–56. EDN: JJDFRO.

17. Pristupa KV, Kukulianskaya TA, Khramtsova EA. Study of the ascorbate-glutathione cycle in transgenic plants *Nicotiana tabacum* under abiotic stress conditions. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2021;2:11–18. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2021-2-11-18.

18. Gururani MA, Upadhyaya CP, Baskar V, Venkatesh J, Nookaraju A, Park SW. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *Journal of Plant Growth Regulation.* 2013;32(2):245–258. DOI: 10.1007/s00344-012-9292-6.

Получена 20.06.2024 / исправлена 23.08.2024 / принята 02.09.2024.
Received 20.06.2024 / revised 23.08.2024 / accepted 02.09.2024.

Биотехнология и микробиология

Biotechnology and microbiology

УДК 581.2

ПЕКТАТЛИАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ РАЗНЫХ ВИДОВ ПЕКТОБАКТЕРИЙ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ СТЕБЛЕЙ И КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

ШАО ЧЭНЮЕ[1)]***, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ***[1)]

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

Аннотация. Пектатлиазная активность является важнейшим фактором вирулентности фитопатогенных бактерий рода *Pectobacterium.* Значительный уровень пектатлиазной активности отмечен в пораженных пектобактериями тканях стеблей картофеля, он в несколько раз превышал уровень пектатлиазной активности в мацерированных тканях клубней картофеля, что может быть связано с разным биохимическим составом тканей. Выявлена зависимость пектатлиазной активности в тканях клубней картофеля от сорта растения. Пектатлиазная активность бактерий *P. carotovorum*, *P. parmentieri*, *P. brasiliense* и *P. atrosepticum* в пораженных тканях клубней сорта Винета была достоверно выше таковой в пораженных тканях клубней сорта Палац. Наиболее высокие уровни пектатлиазной активности зарегистрированы при заражении клубней картофеля бактериями *P. brasiliense*, а наиболее низкие – при заражении клубней картофеля бактериями *P. parmentieri.* Устойчивость клубней картофеля к мацерирующему действию пектобактерий связана с видовой принадлежностью фитопатогена. Клубни картофеля сорта Палац оказались более устойчивыми к мацерирующему действию бактерий *P. carotovorum* и *P. parmentieri*, но менее устойчивыми к мацерирующему действию бактерий *P. brasiliense* по сравнению с клубнями картофеля сорта Винета. Стебли картофеля сорта Винета слабее поражались черной ножкой, чем стебли картофеля сорта Палац.

Ключевые слова: пектатлиаза; мацерация клубней; черная ножка; картофель; сорт Винета; сорт Палац; *Pectobacterium*.

Образец цитирования:
Шао Чэнюе, Евтушенков АН. Пектатлиазная активность разных видов пектобактерий при заражении стеблей и клубней картофеля. *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2024;3:30–36.
EDN: QWLEMK

For citation:
Shao Chengyue, Evtushenkov AN. Pectate lyase activity of different species of pectobacteria when infecting potato stems and tubers. *Experimental Biology and Biotechnology.* 2024;3:30–36. Russian.
EDN: QWLEMK

Авторы:
Шао Чэнюе – аспирант кафедры молекулярной биологии биологического факультета. Научный руководитель – А. Н. Евтушенков.
Анатолий Николаевич Евтушенков – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

Authors:
Shao Chengyue, postgraduate student at the department of molecular biology, faculty of biology.
520095424@qq.com
Anatoli N. Evtushenkov, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of molecular biology, faculty of biology.
evtushenkov@bsu.by
https://orcid.org/0000-0002-2755-6979

PECTATE LYASE ACTIVITY OF DIFFERENT SPECIES OF PECTOBACTERIA WHEN INFECTING POTATO STEMS AND TUBERS

***SHAO CHENGYUE*[a], *A. N. EVTUSHENKOV*[a]**

[a]*Belarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*
Corresponding author: A. N. Evtushenkov (evtushenkov@bsu.by)

Abstract. Pectate lyase activity is the most important virulence factor of phytopathogenic bacteria of the genus *Pectobacterium*. A high level of pectate lyase activity was detected in the tissues of potato stems affected by pectobacteria, it was several times exceeded the level of pectate lyase activity in macerated tissues of potato tubers, which may be due to the different biochemical composition of the tissues. The dependence of pectate lyase activity in the tissues of potato tubers on the plant variety was revealed. The pectate lyase activity of *P. carotovorum*, *P. parmentieri*, *P. brasiliense* and *P. atrosepticum* was significantly higher in the affected tuber tissues of the Vineta variety compared to that in the affected tuber tissues of the Palac variety. The highest levels of pectate lyase activity were recorded when potato tubers were infected with *P. brasiliense*, and the lowest – when potato tubers were infected with *P. parmentieri*. The resistance of potato tubers to the macerating action of pectobacteria is associated with the species of the phytopathogen. Potato tubers of the Palac variety turned out to be more resistant to the macerating effect of *P. carotovorum* and *P. parmentieri*, but less resistant to the macerating effect of *P. brasiliense* compared to potato tubers of the Vineta variety. Potato stems of the Vineta variety were less affected by the black stem than potato stems of the Palac variety.

Keywords: pectate lyase; maceration of tubers; black stem; potato; Vineta variety; Palac variety; *Pectobacterium*.

Введение

Фитопатогенные бактерии семейства Pectobacteriaceae имеют широкий круг хозяев и инфицируют как сельскохозяйственные культуры (в том числе картофель, томаты, кукурузу, капусту, свеклу, салат, перец, морковь), так и декоративные растения (например, хризантемы, диффенбахию). Семейство Pectobacteriaceae включает роды *Dickeya* и *Pectobacterium*, к которым принадлежат важнейшие возбудители черной ножки картофеля и мягкой гнили различных видов растений [1; 2]. Ранее пектобактерии относили к бактериям мягких гнилей группы *carotovora* рода *Erwinia* [1].

Бактерии родов *Dickeya* и *Pectobacterium* входят в десятку наиболее опасных фитопатогенных бактерий [3]. Определить ущерб от бактериозов достаточно сложно, но только в европейских странах потери продукции сельского хозяйства, вызванные пектобактериями, оцениваются в десятки миллионов долларов США [4; 5]. Черная ножка и мягкая гниль считаются болезнями, передаваемыми с посадочным материалом. Источником инфекции при черной ножке и мягкой гнили картофеля могут быть семенные клубни, остатки больных растений в почве, насекомые, нематоды и сельскохозяйственный инвентарь [6; 7]. Мягкая гниль проявляется в мацерации внутренних тканей клубней картофеля, а черная ножка характеризуется поражением тканей основания стебля с последующим хлорозом, увяданием листьев и снижением образования клубней [8]. В процессе заражения растений пектобактерии продуцируют комплекс внеклеточных ферментов, включающих целлюлазы и пектиназы. Эти ферменты играют ключевую роль в разрушении клеточных стенок растений, обеспечивая бактерии питательными веществами для их роста. Таким образом, внеклеточные ферменты выступают одним из важных факторов вирулентности при заражении растений-хозяев фитопатогенными бактериями. Пектатлиазы являются основными внеклеточными ферментами пектобактерий, расщепляющими пектин в межклетниках и стенках клеток растений, что приводит к коллапсу тканей, повреждению клеток и утечке электролитов [9].

В настоящее время отсутствуют эффективные методы и средства контроля таких заболеваний, как мягкая гниль и черная ножка картофеля. Для уменьшения вреда патогенов используют посев качественными клубнями (проверка на заражение) и удаление зараженных растений в период вегетации. Во многих странах налажены регулярный мониторинг видового состава бактерий родов *Dickeya* и *Pectobacterium* на растениях картофеля и изучение их вирулентности, что позволяет повысить эффективность контроля посевного материала. Доминирующими возбудителями мягкой гнили овощей и черной ножки картофеля в нашем регионе являются бактерии семейства Pectobacteriaceae [10–12].

Ранее авторами были выделены 58 штаммов бактерий рода *Pectobacterium* (табл. 1) из образцов растений картофеля с симптомами мягкой гнили (клубни) и черной ножки (стебли), собранных на территории Беларуси [12]. Цель данной работы заключалась в сравнительном изучении вирулентных свойств разных видов бактерий рода *Pectobacterium* при экспериментальном заражении клубней и стеблей картофеля, а также в анализе пектатлиазной активности в зараженных тканях.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись штаммы пектобактерий, выделенные из образцов растений картофеля, собранных на территории Беларуси в 2019–2020 гг. и имевших выраженные симптомы мягкой гнили и черной ножки (см. табл. 1). Штаммы были идентифицированы до вида на основании их биохимических свойств и ПЦР-анализа ДНК с использованием видоспецифических праймеров [12].

Таблица 1

Штаммы пектобактерий, использованные в работе

Table 1

The strains of pectobacteria used in the work

Вид бактерий, количество штаммов	Штаммы, выделенные из клубней картофеля	Штаммы, выделенные из стеблей картофеля
P. carotovorum, 28 штаммов	029-1, 029-2, 34-4, 035-2, 036-3, 36-4, 45-1, 45-2, 47-1, 47-2, 052-1, 052-2, 087, 088-1, 088-2, 090-1, 090-2, 094, 095-2, 096, 097-1, 099-2, 102-1, 102-2	114-1, 124, 125, 128
P. parmentieri, 17 штаммов	051-2	104-2, 105-1, 105-2, 106-1, 106-2, 107-2, 108-1, 108-2, 111-2, 113-1, 113-2, 119-1, 119-2, 121-2, 123-1, 123-2
P. brasiliense, 7 штаммов	098-1, 098-2, 101-2	126, 127, 129, 130
P. atrosepticum, 6 штаммов	084, 086, 086-1, 087-1	110-1, 118-2

Заражение клубней и стеблей картофеля. Бактерии выращивали в жидкой среде LB (*Sigma*, США) в течение 16 ч, центрифугировали при ускорении 5000 *g* на протяжении 5 мин, промывали 0,85 % раствором NaCl, ресуспендировали в том же растворе до $ОП_{600}$ = 0,2, что соответствует $3 \cdot 10^8$ клеток на 1 мл. Клубни картофеля среднего размера сортов Винета и Палац поверхностно стерилизовали 70 % этанолом, после чего вводили шприцем 20 мкл бактериальной суспензии и изолировали рану пленкой Parafilm (*Amcor Flexibles North America*, США). Зараженные клубни картофеля (по 2 клубня на 1 штамм) помещали в эксикатор и ставили в термостат при температуре 28 °С и относительной влажности от 70 до 80 %. В контрольные образцы вводили стерильный физиологический раствор. Через 48 ч после инокуляции измеряли массу мацерированной ткани (в граммах) и сохраняли образцы при температуре –20 °С до определения ферментативной активности.

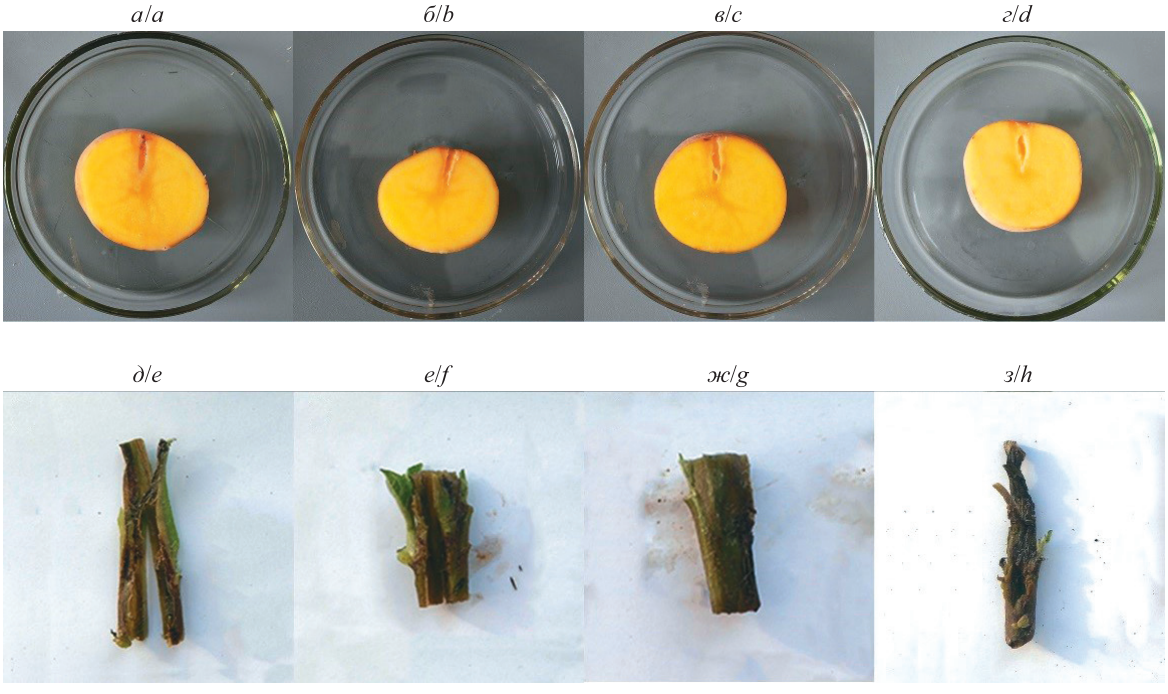
Растения картофеля выращивали в климатической камере при температуре 22 °С с фотопериодом 16 ч. Стебли картофеля высотой около 20 см заражали суспензией бактерий объемом 20 мкл и инкубировали до развития симптомов черной ножки.

Анализ активности пектатлиазы. К 500 мг образца мацерированной ткани клубней или пораженной ткани стеблей картофеля добавляли 500 мкл дистиллированной воды, перемешивали и центрифугировали для получения неочищенного ферментного экстракта. Для определения активности пектатлиазы измеряли увеличение оптической плотности реакционной смеси при длине волны 235 нм и температуре 30 °С на регистрирующем спектрофотометре, как описано в работе [13]. Пектатлиазную активность оценивали по образованию ненасыщенной дигалактуроновой кислоты в реакционной смеси, содержащей 0,05 % раствор полипектата натрия (*Sigma*), 0,1 ммоль/л хлорид кальция в буфере трис-HCl (0,05 моль/л, pH 8,5). За единицу активности пектатлиазы принимали количество фермента, вызывающее образование 1 мкмоль ненасыщенной дигалактуроновой кислоты за 1 мин.

Все исследования проводили в 3–5-кратной биологической повторности. Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программы *Excel 2010* (*Microsoft*, США). Данные представлены как среднее значение ± ошибка среднего значения. Достоверность различий между средними значениями изучаемых параметров оценивали по *t*-критерию Стьюдента. На основании данных о мацерирующей и пектатлиазной активности отдельных штаммов рассчитывали средние показатели активности для каждого вида пектобактерий.

Результаты и их обсуждение

После заражения клубней суспензией пектобактерий через 2 сут инкубирования при температуре 28 °С развивались симптомы мягкой гнили (см. рисунок): ткани клубней размягчались, появлялся характерный запах гнили, пораженная зона приобретала темную окраску. На стеблях картофеля симптомы черной ножки проявлялись через 2–9 сут в виде потемнения области поражения, утончения стебля и увядания листьев выше зоны укола. При развитии бактериоза стебель надламывался, и из раны выделялась слизистая масса.



Симптомы болезни, развивающиеся при искусственном заражении клубней и стеблей картофеля сорта Винета штаммами бактерий *P. carotovorum* 094 (*а*, *д*), *P. parmentieri* 113-1 (*б*, *е*), *P. atrosepticum* 118-2 (*в*, *ж*) и *P. brasiliense* 130 (*г*, *з*)

Symptoms of the disease arising from artificial infection of tubers and stems of potatoes of the Vineta variety with bacteria strains *P. carotovorum* 094 (*a*, *e*), *P. parmentieri* 113-1 (*b*, *f*), *P. atrosepticum* 118-2 (*c*, *g*) and *P. brasiliense* 130 (*d*, *h*)

Все изучаемые штаммы бактерий *P. atrosepticum* и *P. brasiliense*, а также большинство штаммов бактерий *P. carotovorum* и *P. parmentieri* активно мацерировали ткани клубней картофеля обоих сортов, и только при заражении клубней картофеля отдельными штаммами бактерий *P. carotovorum* и *P. parmentieri* не наблюдалось развития симптомов мягкой гнили (табл. 2).

Таблица 2

Эффективность заражения клубней и стеблей картофеля разными видами пектобактерий, %

Table 2

The effectiveness of infection of potato tubers and stems with different types of pectobacteria, %

Вид бактерий	Сорт Винета		Сорт Палац	
	Клубни	Стебли	Клубни	Стебли
P. carotovorum	94,3 ± 3,6	21,4 ± 4,1*	100	60,7 ± 3,0*
P. parmentieri	88,2 ± 4,8	41,2 ± 3,7*	100	82,3 ± 5,4*
P. brasiliense	100	57,1 ± 2,8*	100	71,4 ± 4,3*
P. atrosepticum	100	16,7 ± 5,2*	100	83,3 ± 7,1*

Примечание. Знаком * отмечены достоверные различия эффективности заражения стеблей картофеля двух сортов ($p < 0,05$).

Поражение стеблей и развитие черной ножки вызывали не все штаммы бактерий рода *Pectobacterium* (см. табл. 2). Растения сорта Палац оказались более чувствительными к инфекции по сравнению с растениями сорта Винета: разница в эффективности заражения двух сортов картофеля черной ножкой достоверна для всех четырех видов пектобактерий. Бактерии *P. parmentieri* и *P. atrosepticum* поразили более 80 % растений сорта Палац, демонстрируя наибольшую эффективность заражения среди рассмотренных пектобактерий. Ранее отмечалось, что в настоящее время в странах Западной Европы доминирующим патогеном на посадках картофеля является вид *P. parmentieri* [14], который вытесняет прежний

доминантный патоген *P. atrosepticum*. Большинство штаммов *P. parmentieri* в нашей коллекции выделены из пораженных черной ножкой стеблей картофеля (см. табл. 1), что может свидетельствовать о патогенной специализации этих бактерий. Новый для Беларуси вид пектобактерий *P. brasiliense* с высокой частотой поражал стебли картофеля обоих сортов, подтверждая свою высокую вирулентность [15; 16].

Исследуемые сорта картофеля различались по степени мацерации клубней: сорт Палац оказался более устойчивым к заражению бактериями *P. carotovorum* и *P. parmentieri* по сравнению с сортом Винета. Бактерии *P. atrosepticum* одинаково эффективно мацерировали клубни обоих сортов (табл. 3), бактерии *P. brasiliense* в большей степени поражали клубни сорта Палац. При заражении стеблей картофеля видами *P. carotovorum*, *P. parmentieri* и *P. atrosepticum* симптомы черной ножки быстрее проявлялись на стеблях сорта Винета, чем на стеблях сорта Палац (см. табл. 3). Штаммы бактерий *P. brasiliense* одинаково эффективно заражали стебли обоих сортов картофеля и быстро вызывали черную ножку (в среднем за 3,33 сут) (см. табл. 3). По степени мацерации клубней и скорости развития бактериоза стеблей видно, что вид *P. brasiliense* характеризуется высокой агрессивностью и быстрым поражением растений.

Таблица 3

Эффективность мацерации клубней и поражения стеблей картофеля разными видами пектобактерий

Table 3

The effectiveness of maceration of potato tubers and damage to potato stems by different types of pectobacteria

Вид бактерий	Мацерация клубней, г		Время развития бактериоза стеблей картофеля, сут	
	Сорт Винета	Сорт Палац	Сорт Винета	Сорт Палац
P. carotovorum	1,69 ± 0,15	1,32 ± 0,12	6,46 ± 0,33	7,79 ± 0,34
P. parmentieri	2,02 ± 0,19*	0,63 ± 0,08*	3,86 ± 0,13	8,21 ± 0,37
P. brasiliense	1,42 ± 0,32**	2,23 ± 0,62**	3,25 ± 0,24	3,40 ± 0,44
P. atrosepticum	1,41 ± 0,25	1,38 ± 0,21	4,75 ± 0,24	5,38 ± 0,41

Примечания: 1. Приведены средние значения показателей для каждого вида пектобактерий. 2. Знаком * отмечены достоверные различия мацерации клубней картофеля двух сортов при $p < 0,01$, а знаком ** – достоверные различия мацерации клубней картофеля двух сортов при $p < 0,05$.

Пектатлиазы являются основными ферментами, обеспечивающими мацерацию растительных тканей [8]. Определение пектатлиазной активности проводили в пораженных тканях клубней и стеблей картофеля (табл. 4). Выявлено существенное различие пектатлиазной активности в тканях клубней и тканях стеблей картофеля: при заражении стеблей картофеля данный показатель был в 1,2–15,0 раза выше, чем при заражении клубней картофеля, что может быть связано с разным биохимическим составом тканей стеблей и клубней растений. Стебли и листья картофеля содержат примерно в 10 раз больше клетчатки (целлюлоза, гемицеллюлоза, пектин), чем клубни картофеля, а компоненты клетчатки являются источником индукторов синтеза пектолитических и других мацерирующих ферментов [17].

Таблица 4

Активность пектатлиазы в клубнях и стеблях картофеля, инфицированных бактериями рода *Pectobacterium*, ед./мл

Table 4

Pectate lyase activity in tubers and stems of potatoes infected with bacteria of the genus *Pectobacterium*, units per 1 ml

Вид бактерий	Сорт Винета		Сорт Палац	
	Клубни	Стебли	Клубни	Стебли
P. carotovorum	0,445 ± 0,047*, **	2,458 ± 0,145*	0,223 ± 0,031**	0,261 ± 0,049
P. parmentieri	0,243 ± 0,029*, **	1,699 ± 0,221*	0,156 ± 0,027*, **	2,253 ± 0,092*
P. brasiliense	0,542 ± 0,026*, **	2,057 ± 0,196*	0,239 ± 0,034*, **	3,129 ± 0,067*
P. atrosepticum	0,481 ± 0,049*, **	1,542 ± 0,167*	0,168 ± 0,025*, **	0,53 ± 0,086*

Примечания: 1. Приведены средние значения показателя для каждого вида пектобактерий. 2. Знаком * отмечены достоверные различия пектатлиазной активности в стеблях и клубнях картофеля одного сорта ($p < 0,01$), а знаком ** – достоверные различия пектатлиазной активности в клубнях картофеля двух сортов ($p < 0,01$).

Пектатлиазная активность бактерий *P. parmentieri*, *P. brasiliense*, *P. atrosepticum* и *P. carotovorum* при заражении клубней сорта Винета была выше, чем при заражении клубней сорта Палац (см. табл. 4), что коррелировало с более высокой степенью мацерации клубней сорта Винета по сравнению со степенью мацерации клубней сорта Палац. Показано, что устойчивые к мягкой гнили сорта картофеля содержат сложные органические соединения, которые могут ингибировать биосинтез и (или) активность ферментов патогена, разрушающих растительные ткани [18]. Бактерии *P. brasiliense* показали наибольший уровень пектатлиазной активности в клубнях обоих сортов и стеблях сорта Палац по сравнению с другими пектобактериями. Ранее нами была отмечена высокая степень вирулентности вида *P. brasiliense* и его потенциальная угроза для растений в Беларуси [19].

Заключение

Наиболее высокий уровень пектатлиазной активности выявлен в пораженных тканях стеблей картофеля, он в несколько раз превышал уровень пектатлиазной активности в пораженных тканях клубней картофеля, что может быть связано с высоким содержанием в тканях стеблей сложных пектиновых соединений, при деградации которых образуются индукторы синтеза пектолитических ферментов [17]. Пектатлиазная активность всех рассмотренных пектобактерий в мацерированной ткани клубней сорта Винета была достоверно выше таковой в мацерированной ткани клубней сорта Палац. Самой высокой пектатлиазной активностью отличались ткани картофеля, пораженные видом *P. brasiliense*, что может быть связано с его высокой вирулентностью, обусловленной в том числе повышенным по сравнению с другими исследованными фитопатогенами уровнем синтеза пектатлиазы.

Используемые в работе сорта картофеля Палац и Винета различались по устойчивости к поражению клубней и стеблей пектобактериями. Так, клубни сорта Палац оказались более устойчивыми к мацерирующему действию бактерий *P. carotovorum* и *P. parmentieri*, чем клубни сорта Винета. Но бактерии *P. brasiliense* в большей степени поражали клубни сорта Палац и в меньшей степени – клубни сорта Винета. Возможно, разная устойчивость клубней к отдельным видам пектобактерий отражает видовую специфику взаимодействия патогенов с растениями-хозяевами. При поражении клубней в хранилище ущерб ниже, если их мацерация идет медленнее, так как от пораженного клубня инфекция распространяется на соседние здоровые клубни. Следовательно, для объективной оценки устойчивости клубней к возбудителям мягкой гнили необходимо использовать набор штаммов различных видов пектобактерий, распространенных в данном регионе.

При заражении стеблей пектобактериями сорт Винета оказался более устойчивым, чем сорт Палац. Разная устойчивость стеблей и клубней картофеля к заражению фитопатогенами может быть связана с существенным различием их биохимического состава [18], что влияет на биосинтез и (или) активность мацерирующих ферментов патогена.

Библиографические ссылки

1. Dye DW. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The *amylovora* group. *New Zealand Journal of Science.* 1968;11(4):590–607.

2. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the «Enterobacteriales»: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2016;66(12):5575–5599. DOI: 10.1099/ijsem.0.001485.

3. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology.* 2012;13(6):614–629. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.

4. Toth IK, van der Wolf JM, Saddler G, Lojkowska E, Hélias V, Pirhonen M, et al. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology.* 2011;60(3):385–399. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x.

5. Pérombelon MCM, Kelman A. Ecology of the soft rot erwinias. *Annual Review of Phytopathology.* 1980;18:361–387. DOI: 10.1146/annurev.py.18.090180.002045.

6. Cappaert MR, Powelson ML, Franc GD, Harrison MD. Irrigation water as a source of inoculum of soft rot erwinias for aerial stem rot of potatoes. *Phytopathology.* 1988;78(12):1668–1672. DOI: 10.1094/Phyto-78-1668.

7. Rossmann S, Dees MW, Perminow J, Meadow R, Brurberg MB. Soft rot Enterobacteriaceae are carried by a large range of insect species in potato fields. *Applied and Environmental Microbiology.* 2018;84(12):e00281-18. DOI: 10.1128/AEM.00281-18.

8. Pérombelon MCM. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology.* 2002;51(1):1–12. DOI: 10.1046/j.0032-0862.2001.Shorttitle.doc.x.

9. Barras F, van Gijsegem F, Chatterjee AK. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology.* 1994;32:201–234. DOI: 10.1146/annurev.py.32.090194.001221.

10. Evtushenkov AN, Fomichev YuK. Pectate lyase activity of the bacteria of the genus *Erwinia*. *Vestnik Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta imeni V. I. Lenina. Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya.* 1978;2:25–28. Russian. EDN: LOLKIH.

11. Komar EI, Shavel' MI, Pesnyakevich AG. Identification of gram-negative pectolytic phytopathogenic bacteria that cause potato disease in Belarus. *Vestnik BGU. Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya.* 2014;2:54–60. Russian. EDN: SIBRTB.

12. Shao Chengyue, Gorovik YuN, Sidorova SG, Evtushenkov AN. Identification of pectolytic bacterial species isolated during plant bacteriosis in the Republic of Belarus. *Experimental Biology and Biotechnology.* 2022;3:64–72. Russian. DOI: 10.33581/2957-5060-2022-3-64-72.

13. Evtushenkov AN, Shevchik VE, Popova LB, Fomichev YuK. Purification and properties of two extracellular endopectate lyases of *Erwinia chrysanthemi* ENA49. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.* 1986;22(2):187–192. Russian. EDN: XIWZZB.

14. Motyka-Pomagruk A, Zoledowska S, Sledz W, Lojkowska E. The occurrence of bacteria from different species of Pectobacteriaceae on seed potato plantations in Poland. *European Journal of Plant Pathology.* 2021;159(2):309–325. DOI: 10.1007/s10658-020-02163-x.

15. Oulghazi S, Sarfraz S, Zaczek-Moczydłowska MA, Khayi S, Ed-Dra A, Lekbach Y, et al. *Pectobacterium brasiliense*: genomics, host range and disease management. *Microorganisms.* 2021;9(1):106. DOI: 10.3390/microorganisms9010106.

16. Shao Chengyue, Akhremchuk AE, Valentovich LN, Nikolaichik YA, Evtushenkov AN. First report of *Pectobacterium brasiliense* causing blackleg disease of potato plants in Belarus. *Journal of Plant Pathology.* 2023;105(4):1735. DOI: 10.1007/s42161-023-01487-x.

17. Zheng Y, Xiao G, Zhou W, Gao Y, Li Z, Du G, et al. Midgut microbiota diversity of potato tuber moth associated with potato tissue consumed. *BMC Microbiology.* 2020;20:58. DOI: 10.1186/s12866-020-01740-8.

18. Joshi JR, Yao L, Charkowski AO, Heuberger AL. Metabolites from wild potato inhibit virulence factors of the soft rot and blackleg pathogen *Pectobacterium brasiliense*. *Molecular Plant-Microbe Interactions (MPMI).* 2021;34(1):100–109. DOI: 10.1094/MPMI-08-20-0224-R.

19. Shao Chengyue, Evtushenkov AN. Virulent properties of pectobacteria isolated from plant samples on the territory of Belarus. *Experimental Biology and Biotechnology.* 2023;2:44–51. Russian. EDN: RAKYZR.

Получена 08.02.2024 / исправлена 25.07.2024 / принята 25.07.2024.
Received 08.02.2024 / revised 25.07.2024 / accepted 25.07.2024.

УДК 579.69:577.21

СОЗДАНИЕ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ *LACTOCOCCUS LACTIS*, СИНТЕЗИРУЮЩИХ БЕЛОК S ИЛИ РЕЦЕПТОРСВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН ВИРУСА SARS-CoV-2

О. В. ЕВДОКИМОВА[1)]***, А. Э. ОХРЕМЧУК***[1)]***,***
Е. В. ОХРЕМЧУК[1)]***, Д. О. ДОРМЕШКИН***[2)]***, Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ***[1)]

[1)]*Институт микробиологии НАН Беларуси, ул. Академика Купревича, 2, 220084, г. Минск, Беларусь*
[2)]*Институт биоорганической химии НАН Беларуси,*
ул. Академика Купревича, 5, корп. 2, 220084, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Получены рекомбинантные штаммы бактерий *Lactococcus lactis*, содержащие экспрессионные плазмиды с фрагментами генома вируса SARS-CoV-2. В составе векторной конструкции pNZ::spike находится полная кодирующая последовательность гена белка S вируса SARS-CoV-2, векторные конструкции pNZ::mini-spike и pNZ::HA-spike содержат различающиеся по кодонному составу и размеру фрагменты гена *s*, транслируемые в рецепторсвязывающий домен. Индукция экспрессии фрагмента гена *s* в клетках полученных штаммов низином (1 нг/мл) сопровождается синтезом белков, специфически связывающихся с коммерческими антителами к рецепторсвязывающему домену вируса SARS-CoV-2. Рекомбинантный белок, продуцируемый бактериями *L. lactis* pNZ::spike, на электрофореграмме определяется в виде нескольких фракций, молекулярная масса наиболее представленной из них составляет около 150 кДа, что совпадает с теоретически рассчитанной молекулярной массой полноразмерного белка S. Рекомбинантный белок, синтезируемый бактериями *L. lactis* pNZ::HA-spike, имеет молекулярную массу приблизительно 23 кДа. В клетках бактерий *L. lactis* pNZ::mini-spike целевой белок представлен основной фракцией с молекулярной массой около 35 кДа. Продуцируемые рекомбинантные белки имеют клеточную локализацию.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии; коронавирус; гликопротеин шипа; рецепторсвязывающий домен; экспрессия гетерологичных генов.

Образец цитирования:
Евдокимова ОВ, Охремчук АЭ, Охремчук ЕВ, Дормешкин ДО, Валентович ЛН. Создание штаммов бактерий *Lactococcus lactis*, синтезирующих белок S или рецепторсвязывающий домен вируса SARS-CoV-2. *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2024;3:37–49.
EDN: QTYHHG

For citation:
Evdokimova OV, Akhremchuk AE, Akhremchuk KU, Dormeshkin DO, Valentovich LN. Design of *Lactococcus lactis* strains producing S protein or receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 virus. *Experimental Biology and Biotechnology.* 2024; 3:37–49. Russian.
EDN: QTYHHG

Авторы:
Олеся Владимировна Евдокимова – научный сотрудник лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований».
Артур Эдуардович Охремчук – научный сотрудник лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований».
Екатерина Владимировна Охремчук – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований».
Дмитрий Олегович Дормешкин – кандидат химических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии.
Леонид Николаевич Валентович – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией «Центр аналитических и генно-инженерных исследований».

Authors:
Olesia V. Evdokimova, researcher at the laboratory «Centre of analytical and genetic engineering research».
evdokimovalesia@gmail.com
https://orcid.org/0009-0003-7071-0841
Artur E. Akhremchuk, researcher at the laboratory «Centre of analytical and genetic engineering research».
a.akhremchuk@mbio.bas-net.by
https://orcid.org/0000-0001-8602-4887
Katsiaryna U. Akhremchuk, PhD (biology); senior researcher at the laboratory «Centre of analytical and genetic engineering research».
katerinaakhremchuk@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-3195-6529
Dmitri O. Dormeshkin, PhD (chemistry); leading researcher at the laboratory of molecular diagnostics and biotechnology.
dormeshkin@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-2505-3005
Leonid N. Valentovich, PhD (biology), docent; head of the laboratory «Centre of analytical and genetic engineering research».
valentovich@mbio.bas-net.by
https://orcid.org/0000-0001-7329-743X

CC BY NC

Благодарность. Авторы выражают признательность сотрудникам Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии доктору медицинских наук, профессору Т. В. Амвросьевой и И. В. Бельской, а также ведущему научному сотруднику Института микробиологии НАН Беларуси кандидату биологических наук, доценту И. С. Казловскому за предоставленные плазмиды.

DESIGN OF *LACTOCOCCUS LACTIS* STRAINS PRODUCING S PROTEIN OR RECEPTOR-BINDING DOMAIN OF THE SARS-CoV-2 VIRUS

O. V. EVDOKIMOVA [a], ***A. E. AKHREMCHUK*** [a], ***K. U. AKHREMCHUK*** [a], ***D. O. DORMESHKIN*** [b], ***L. N. VALENTOVICH*** [a]

[a] *Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus, 2 Akademika Kuprevicha Street, Minsk 220084, Belarus*
[b] *Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, 5 Akademika Kuprevicha Street, 2 building, Minsk 220084, Belarus*
Corresponding author: O. V. Evdokimova (evdokimovalesia@gmail.com)

Abstract. We obtained recombinant bacterial strains of *Lactococcus lactis* containing expression plasmids with fragments of the SARS-CoV-2 virus genome. The pNZ::spike vector construction contains the complete coding sequence of the S protein gene of the SARS-CoV-2 virus, the vector constructions pNZ::mini-spike and pNZ::HA-spike contain *s* gene fragments with different codon composition and size, which translated into the receptor-binding domain. Induction of *s* gene fragment expression in cells of the obtained strains by nisin (1 ng/ml) is followed by the synthesis of proteins specifically binding to commercial antibodies against the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 virus. Recombinant proteins produced by the bacteria *L. lactis* pNZ::spike are represented by several fractions, a molecular mass of the major fraction is about 150 kDa, which coincides with the theoretically calculated molecular mass of the full-length S protein. The bacteria *L. lactis* pNZ::HA-spike synthesised the recombinant protein with a molecular mass of approximately 23 kDa. In *L. lactis* pNZ::mini-spike cells the target protein is represented by a major fraction with a molecular mass of about 35 kDa. The produced recombinant proteins have cellular localisation.

Keywords: lactic acid bacteria; Coronavirus; spike protein; receptor-binding domain; heterologous gene expression.

Acknowledgements. The authors would like to thank the staff of the Republican Research and Practical Centre for Epidemiology and Microbiology doctor of science (medicine), full professor T. V. Amvrosieva and I. V. Belskaya, as well as the leading researcher at the Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, PhD (biology), docent I. S. Kazlouski for provided plasmids.

Введение

Молочнокислые бактерии (МКБ) – это несистематическая группа грамположительных бактерий, которая объединяет микроорганизмы, продуцирующие молочную кислоту в качестве конечного метаболита при ферментации углеводов. С давних времен МКБ применяются для получения кисломолочных, ферментированных мясных и растительных продуктов, производства кормов, фармакологических и химических субстанций, консервантов [1–5]. С развитием генной инженерии штаммы МКБ, в первую очередь представители родов *Lactococcus* и *Lactobacillus*, стали использоваться в качестве продуцентов гомологичных и гетерологичных белков [6–11]. Безопасность для человека, быстрый, не требующий аэрации рост культуры клеток, небольшое количество синтезируемых протеаз, возможность секреции во внеклеточную среду, отсутствие необходимости очистки продукта от липополисахаридов определяют МКБ как удобную, а в некоторых случаях предпочтительную альтернативу бактериям *Escherichia coli* в качестве хозяев систем гетерологичной экспрессии генов [5; 12; 13]. С начала 2000-х гг. МКБ интенсивно изучаются как вектор доставки терапевтических белков и антигенов к слизистым оболочкам организма [2; 14–17]. Такие свойства МКБ, как устойчивость к низкому pH и солям желчных кислот, слабая иммуногенность, а у некоторых штаммов пробиотические свойства и эффект адъювантности обосновывают применение МКБ в качестве основы для разработки живых мукозальных вакцин [18–21]. Такая доставка антигенов может представлять собой эффективную стратегию профилактики инфекций, основными входными воротами которых являются верхние дыхательные пути и (или) желудочно-кишечный тракт.

В связи с пандемией COVID-19 резко возросла востребованность исследований в области конструирования генно-инженерных штаммов МКБ, синтезирующих антигены коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома – 2 (SARS-CoV-2) [22–27]. После завершения пандемии данные исследования остаются актуальными, поскольку вирус SARS-CoV-2 продолжает циркулировать в человеческой популяции, и не исключено появление новых потенциально пандемических вариантов. За годы пандемии были детально изучены структура генома, функциональная нагрузка, участие в патогенезе и вклад в развитие иммунного ответа отдельных структурных единиц вируса SARS-CoV-2 [28], разработаны тест-системы для обнаружения специфических антител к различным доменам вирусных белков [29], поэтому антигены вируса SARS-CoV-2 являются «удобными» для проверки вакцинных платформ. Разработанные и оптимизированные с применением данного материала системы гетерологичной экспрессии генов в МКБ могут служить основой для создания мукозальных вакцин с использованием иных антигенов вирусного или бактериального происхождения.

Как правило, в векторных вакцинах в качестве антигенов применяются структурные белки патогена. В случае с вирусом SARS-CoV-2 таковыми являются гликопротеин шипа (*spike protein*, S), мембранный белок (*membrane protein*, M), белок оболочки (*envelope protein*, E) и нуклеокапсидный белок (*nucleocapsid protein*, N) [30]. Первые зарегистрированные вакцины против COVID-19 – мРНК-вакцины BNT162b2 (*Pfizer – BioNTech*) и Spikevax (*Moderna*) и векторные вакцины «Гам-КОВИД-Вак» («Спутник V») (Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи) и ChAdOx1 nCoV-19 (*Oxford – AstraZeneca*) – вызывали иммунный ответ организма за счет экспрессии гена белка S в клетках хозяина [31]. Действие большинства разрабатываемых мукозальных вакцин также основано на иммуногенности гликопротеина шипа или его фрагмента. Исследования структуры, функции и антигенности белка S вируса SARS-CoV-2 показали, что субъединица S1 содержит рецепторсвязывающий домен (*receptor-binding domain*, RBD) (рис. 1), который имеет высокую аффинность к ангиотензинпревращающему ферменту ACE2 [30; 32; 33]. На основании проведенного филогенетического анализа и структурного моделирования регион RBD (319–541 аминокислотный остаток) рекомендован к использованию в качестве целевого антигена для разработки вакцины [32]. В другом исследовании показано, что для проявления иммуногенности достаточно даже фрагмента белка S с 330-го по 526-й аминокислотный остаток [34]. В экспериментах на лабораторных животных было отмечено, что домен S1 гликопротеина шипа вируса SARS-CoV-2 является более эффективным иммуногеном, чем RBD [35], это объясняется наличием дополнительных эпитопов за пределами фрагмента RBD.

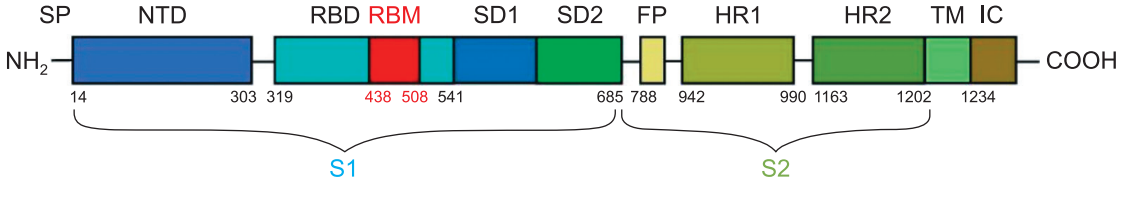


Рис. 1. Структура белка S вируса SARS-CoV-2 (координаты согласно базе данных UniProtKB – P0DTC2).
Используемые обозначения: SP – сигнальный пептид; NTD – N-концевой домен;
RBM – рецепторсвязывающий мотив; SD1 – субдомен-1; SD2 – субдомен-2;
FP – пептид слияния; HR1 – гептадный повтор – 1; HR2 – гептадный повтор – 2;
TM – трансмембранная область; IC – внутриклеточный домен

Fig. 1. Structure of the S protein of the SARS-CoV-2 virus (coordinates according to the UniProtKB database – P0DTC2).
Symbols: SP – signal peptide; NTD – N-terminal domain; RBM – receptor-binding motif;
SD1 – subdomain-1; SD2 – subdomain-2; FP – fusion peptide; HR1 – heptad repeat – 1;
HR2 – heptad repeat – 2; TM – transmembrane region; IC – intracellular domain

Согласно литературным сведениям большинство созданных рекомбинантных штаммов МКБ синтезируют отдельные домены белков вируса SARS-CoV-2 [25; 36–38] и только несколько штаммов продуцируют полноразмерные структурные белки [23; 27], в их числе бактерии *Lactobacillus plantarum* [23] и *Bifidobacterium longum* (URL: https://clinicaltrials.gov/study/NCT04334980), содержащие плазмидную ДНК с полной кодирующей последовательностью гена *s* вируса SARS-CoV-2. Бактерии *Lactococcus lactis* являются одним из наиболее часто используемых хозяев для экспрессии генов в грамположительных бактериях в целях продукции белков вирусного, бактериального или эукариотического происхождения [7; 39–41], однако сообщений о синтезе полноразмерного белка S в клетках бактерий *L. lactis*, как и сравнительного анализа экспрессии целого гена *s* либо его фрагмента, в литературных источниках найти не удалось. Целью данного исследования являлось получение рекомбинантных штаммов бактерий *L. lactis*, экспрессирующих фрагменты гена *s* вируса SARS-CoV-2.

Материалы и методы исследования

Бактерии *E. coli* XL1-Blue [42] и *Bacillus subtilis* 168 [43] выращивали в жидкой или агаризованной среде LB (*Conda*, Испания; кат. № 1083) при температуре 37 °C. Бактерии *L. lactis* NZ3900 [44] культивировали в бульоне или на поверхности агаризованной среды M17 (*HiMedia Laboratories*, Индия; кат. № M1029) с добавлением глюкозы до концентрации 0,5 % при температуре 30 °C. Для создания селективных условий в среду культивирования вводили ампициллин (100 мг/л) или хлорамфеникол (10 мг/л). Плазмиды, использованные в работе, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Плазмиды, использованные в исследовании

Table 1

Plasmids used in the study

Плазмида	Характеристика	Источник
pJET1.2/blunt	Ap^R, $oriV_{ColE1}$, Eco47I/T7	Сайт производителя (URL: https://www.thermofisher.com)
pUC19	Ap^R, *lacZ*α, $oriV_{ColE1}$	[45]
pUC21	Ap^R, *lacZ*α, $oriV_{ColE1}$, M13 IR	[46]
pNZ8121	Cm^R, P_{nisA}, $oriV_{pSH71}$	[47]
pEX-K	Плазмида со вставкой фрагмента кодирующей последовательности гена *s* вируса SARS-CoV-2	[48]
pJET::spike	Плазмида pJET1.2/blunt со вставкой кодирующей последовательности гена *s* вируса SARS-CoV-2	Данная работа
pUC19::HA-spike	Плазмида pUC19 со вставкой фрагмента гена *s* вируса SARS-CoV-2	
pUC21::HA-spike	Плазмида pUC21 со вставкой фрагмента гена *s* вируса SARS-CoV-2 с добавленным стоп-кодоном	
pNZ::spike	Плазмида, несущая экспрессионную кассету на основе промотора P_{nisA} и полной кодирующей последовательности гена *s* вируса SARS-CoV-2	
pNZ::mini-spike	Плазмида, несущая экспрессионную кассету на основе промотора P_{nisA} и фрагмента кодирующей последовательности гена *s* вируса SARS-CoV-2	
pNZ::HA-spike	Плазмида, несущая экспрессионную кассету на основе промотора P_{nisA} и фрагмента кодирующей последовательности гена *s* вируса SARS-CoV-2	

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с применением Flash-полимеразы и Flash-буфера (ООО «АртБиоТех», Беларусь), а также олигонуклеотидных праймеров (табл. 2) в концентрации 0,1 мкмоль/л (ОДО «Праймтех», Беларусь). Количество матричной ДНК в реакции составляло 20–50 нг.

Таблица 2

Праймеры, использованные в исследовании

Table 2

Primers used in the study

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5′–3′)
M13R	GGATAACAATTTCACACAGG
T7-Pro-Seq	TAATACGACTCACTATAGGG
pNZ-F	TCGTTCGAAGGAACTAC
pNZ-R	TGCCATTTCAATTGAAC
SpV2-F	AGCTTGGTCATATGTTTGTGTTTCC
SpV2-R	TATTATCCATGGTTATCTAGATCCG

Окончание табл. 2
Ending of the table 2

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5′–3′)
SpV-F	ATGTTTGTGTTCCTTGTGTTATTG
Gib-ori-F	TCATGACCAAAATCCC
mSpHA-F	ATCATGAACACCCAGATCCTGGTG
mSpHA-R	TTACTTCTTGGGGCCACACACTG

Трансформацию бактерий *E. coli* плазмидной ДНК осуществляли согласно рекомендациям [49], бактерии *B. subtilis* трансформировали по методике, описанной в работе [50], при трансформации бактерий *L. lactis* руководствовались инструкцией [51].

Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора Monarch Plasmid Miniprep Kit (*New England Biolabs*, США; кат. № T1010) или путем щелочного лизиса по методике, изложенной в публикации [52]. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК осуществляли в 0,8 % агарозном геле, экстракцию ДНК из агарозного геля проводили с использованием набора Monarch DNA Gel Extraction Kit (*New England Biolabs*; кат. № T1020). Рестрикцию фрагментов ДНК и их лигирование ДНК-лигазой T4 (*Thermo Scientific*, США; кат. № EL0011) выполняли в стандартных буферных системах при рекомендуемых в инструкции производителя условиях.

Секвенирование осуществляли по методу Сенгера [53] с помощью набора реактивов DNA Cycle Sequencing Kit (*Jena Bioscience*, Германия) и меченных флуоресцентной меткой Cy5.5 праймеров (см. табл. 2). Полногеномное секвенирование проводили на платформе MiSeq (*Illumina*, США) с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit v3 (*Illumina*; кат. № MS-102-3003). Библиотеки фрагментов ДНК готовили с применением наборов реактивов NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep Kit for Illumina (*New England Biolabs*; кат. № E7805S) и NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (*New England Biolabs*; кат. № E6609S). Множественное выравнивание нуклеотидных и предсказанных аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью инструмента Clustal Omega ресурса *UniProt* (URL: https://www.uniprot.org/).

Для анализа белкового состава бактериальных суспензий супернатант отделяли от клеточного осадка путем центрифугирования. Белки супернатанта осаждали трихлоруксусной кислотой с последующей промывкой ледяным 80 % ацетоном, центрифугировали 10 мин при скорости 12 000 об/мин и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Для приготовления клеточных лизатов промытые и ресуспендированные в ФСБ суспензии клеток выравнивали по оптической плотности при длине волны 600 нм ($ОП_{600}$ = 0,3), аликвоты суспензий обрабатывали лизоцимом (на протяжении 1 ч при температуре 37 °C), дважды отмывали и ресуспендировали в ФСБ. В качестве положительного контроля использовали коммерческий рекомбинантный белок Recombinant 2019-nCoV Spike Protein (RBD, mFc Tag; *Elabscience*, Китай; кат. № PKSR030500) с молекулярной массой 51,5 кДа. Электрофорез белков в денатурирующих условиях проводили в 10 % полиакриламидном разделяющем геле, перенос белков на поливинилидендифторидную мембрану выполняли в аппарате Trans-Blot Turbo Transfer System (*Bio-Rad*, США). После блокировки неспецифических сайтов связывания антител 5 % обезжиренным молоком мембрану инкубировали с первичными антителами SARS-CoV-2 Spike RBD Polyclonal Antibody (2019-nCoV) (*Elabscience*; кат. № E-AB-V1006) в течение 1 ч, затем отмывали и инкубировали 1 ч со вторичными антителами Immun-Star Goat Anti-Rabbit (GAR)-HRP Conjugate (*Bio-Rad*; кат. № 170-5046). Визуализацию целевых белков проводили с помощью оборудования ChemiDoc MP Imaging System (*Bio-Rad*) хемилюминесцентным методом после 5 мин инкубации ECL-смеси (*Bio-Rad*; кат. № 170-5061) на поверхности мембраны.

Получение кодирующих последовательностей. В качестве донора последовательности гена *s* использовали препарат «Гам-КОВИД-Вак» (компонент II), в основе которого находится аденовирус типа 5 с геном полноразмерного белка S вируса SARS-CoV-2 [54]. Предварительно была выделена ДНК данного препарата и установлена его полная нуклеотидная последовательность. На основе секвенированной нуклеотидной последовательности сконструированы праймеры SpV2-F и SpV2-R (см. табл. 2), дающие при амплификации с ДНК-матрицы препарата «Гам-КОВИД-Вак» фрагмент, содержащий последовательность гена *s* и добавленные сайты узнавания рестриктаз на 5′-конце (NdeI) и 3′-конце (NcoI). В результате ПЦР были получены ампликоны длиной 3872 пары нуклеотидов (п. н.), которые клонировали в составе вектора pJET1.2/blunt в клетках *E. coli* XL1-Blue. Из отобранных на ампициллине (100 мкг/мл) колоний выделяли плазмидную ДНК и с помощью рестрикционного анализа определяли направление вставки, а также линейный размер полученной плазмиды и вставки. Среди плазмид, соответствующих расчетному размеру, выбирали варианты с удобным для последующих манипуляций направлением вставки. Для проверки отсутствия нуклеотидных замен и перестроек в кодирующей последовательности гена *s* плазмидную

ДНК pJET::spike подвергали проверочному секвенированию на приборе MiSeq, что позволило выявить полную идентичность референсной последовательности ДНК препарата «Гам-КОВИД-Вак» и наличие внесенных сайтов рестрикции, фланкирующих кодирующую последовательность.

Фрагмент последовательности RBD (Phe318 – Cys590) длиной 820 п. н., обозначаемый далее как mini-spike, был любезно предоставлен сотрудниками лаборатории инфекций с природным резервуаром Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии и отраслевой лаборатории молекулярных био- и нанотехнологий Института микробиологии НАН Беларуси в составе плазмиды pEX-K размером 3338 п. н. [48].

Кодирующая RBD (Arg319 – Lys529) нуклеотидная последовательность фрагмента гена *s* вируса SARS-CoV-2, обозначаемого далее как HA-spike, синтезирована в компании *Synbio Technologies* (США). Оптимизацию состава кодонов проводили для максимального уровня экспрессии в клетках человека с помощью сервиса *GeneArt* (*Thermo Fisher Scientific*, США). К N-концу RBD были добавлены сигнальный пептид гемагглютинина и четыре дополнительные аминокислоты от фрагмента гемагглютинина [55]. Фрагмент клонировали в составе вектора pUC19 в клетках *E. coli* XL1-Blue, трансформанты отбирали на среде с ампициллином (100 мкг/мл). К кодирующей последовательности с помощью ПЦР добавляли сайт рестрикции и стоп-кодон путем амплификации фрагмента плазмиды pUC19::HA-spike с использованием праймеров mSpHA-F (содержит на 5′-конце два нуклеотида для восстановления сайта рестрикции EcoRV) и mSpHA-R (содержит на 3′-конце три нуклеотида стоп-кодона). Продукт размером 714 п. н. клонировали в составе вектора pUC21 в клетках *E. coli* XL1-Blue. Полученную плазмиду pUC21::HA-spike проверяли на соответствие нуклеотидной последовательности HA-spike и наличие внесенных изменений методом секвенирования ДНК по Сенгеру с использованием праймеров M13R и T7-Pro-Seq.

Результаты и их обсуждение

Для создания экспрессионных конструкций были клонированы три кандидатные последовательности фрагмента ДНК вируса SARS-CoV-2: вариант spike, содержащий полную кодирующую последовательность гена *s*, вариант HA-spike, представляющий собой нуклеотидную последовательность, транслируемую в RBD, слитый с HA-сигналом секреции, и вариант mini-spike, представляющий собой более протяженную нуклеотидную последовательность гена *s*, транслируемую в RBD (см. подраздел «Получение кодирующих последовательностей»). Секвенированные нуклеотидные и предсказанные аминокислотные последовательности фрагмента гена *s* в составе плазмид pJET::spike, pEX-K и pUC21::HA-spike сравнивали с кодирующей последовательностью гена гликопротеина шипа вируса SARS-CoV-2 изолята Wuhan-Hu-1, депонированной в базе данных GenBank под номером NC_045512. Было установлено, что предсказанные аминокислотные последовательности сравниваемых фрагментов белка S идентичны, в то время как нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов гена *s* отличаются от последовательности изолята Wuhan-Hu-1 и различаются между собой в зависимости от дизайна предварительно проведенной оптимизации кодонного состава (рис. 2).

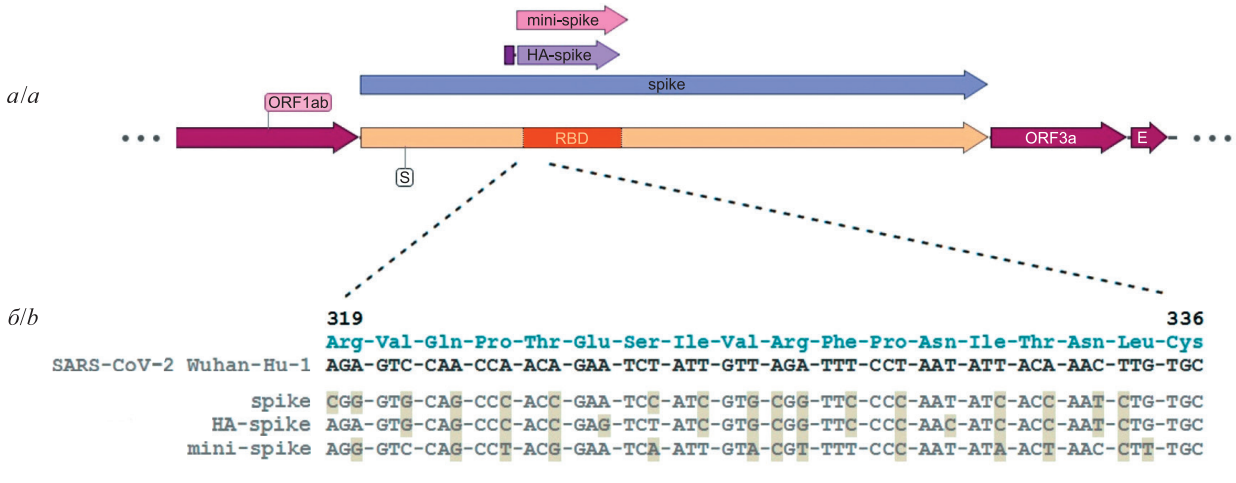


Рис. 2. Выравнивание последовательностей spike, HA-spike, mini-spike и фрагмента генома вируса SARS-CoV-2 изолята Wuhan-Hu-1 (*а*) и сравнение участка кодирующей последовательности RBD вируса SARS-CoV-2 и трех кандидатных последовательностей (*б*)

Fig. 2. Alignment of spike, HA-spike, mini-spike sequences against the genome fragment of the SARS-CoV-2 virus Wuhan-Hu-1 isolate (*a*) and comparison of the RBD coding sequence region of the SARS-CoV-2 virus and three candidate sequences (*b*)

Основой для создания экспрессионной конструкции с фрагментом гена *s* вируса SARS-CoV-2 выбран плазмидный вектор широкого круга хозяев pNZ8121 – компонент коммерческой системы экспрессии генов под контролем низина NICE® (*MoBiTec*, Германия). Данный вектор содержит низин-индуцируемый промотор P_{nisA} в сочетании с нативным сайтом связывания рибосом, сигнальную последовательность гена *prtP* и терминатор гена *pepN*, а также ген хлорамфениколацетилтрансферазы в качестве селективного маркера [51]. Штамм *L. lactis* NZ3900, делеционный мутант по гену *lacF*, неспособный расти на лактозе, был использован как реципиент экспрессионной конструкции. Выбор данного штамма обоснован возможностью переноса экспрессионной кассеты, функционирующей в составе вектора pNZ8121, в вектор pNZ8149, содержащий в качестве селективного маркера ген *lacF*, восстанавливающий способность штамма *L. lactis* NZ3900 расти на лактозе [51]. Такая комбинация делает систему гетерологичной экспрессии пригодной для применения в пищевой промышленности.

В инструкции производителя используемой системы экспрессии вставку целевой последовательности в вектор pNZ8121 рекомендовано осуществлять с помощью сайта рестрикции EcoRV для сохранения рамки считывания, начинающейся с сигнальной последовательности гена *prtP*, однако в таком случае вставка фрагмента может происходить в двух направлениях и необходим отбор трансформантов с нужной ориентацией вставки. В данной работе применяли вариант, при котором фрагмент ДНК имеет один «тупой» и один «липкий» конец, что обеспечивает сохранение рамки считывания, начинающейся с кодирующей последовательности сигнального пептида, и позволяет получать трансформанты с нужным направлением вставки. Для субклонирования фрагментов в составе вектора pNZ8121 производитель рекомендует использовать штаммы *E. coli* $recA^+$, однако согласно описанию рост трансформантов *E. coli* занимает около 48 ч и клонирование векторов pNZ в *E. coli* может приводить к нестабильности и (или) реорганизации плазмиды [51]. Нами было замечено, что в случае использования бактерий *B. subtilis* 168 векторы на основе pNZ8121 стабильно наследуются, трансформанты можно отбирать через 24 ч. Для получения экспрессионной конструкции с полной кодирующей последовательностью гена белка S вируса SARS-CoV-2 амплифицировали фрагмент плазмиды pJET::spike с использованием праймеров SpV-F и Gib-ori-F (рис. 3). Полученный продукт размером 5317 п. н. обрабатывали рестриктазой NcoI, целевой фрагмент размером 3854 п. н. (см. рис. 3, *б*) лигировали с линеаризованным по сайтам EcoRV и NcoI вектором pNZ8121. Продукты лигирования использовали для трансформации бактерий *B. subtilis* 168, трансформанты отбирали на среде с хлорамфениколом (10 мкг/мл).

Экспрессионные конструкции с кодирующей последовательностью RBD собирали аналогично с использованием рестриктазно-лигазного метода (рис. 4 и 5), при этом фрагмент HA-spike длиной 777 п. н. получали путем обработки плазмиды pUC21::HA-spike рестриктазами EcoRV и NcoI (см. рис. 4, *а* и *б*), а фрагмент mini-spike длиной 842 п. н. – путем обработки донорной плазмиды pEX-K рестриктазами PstI и NheI (см. рис. 5, *а* и *б*). Очищенные фрагменты лигировали с линеаризованным вектором pNZ8121 по сайтам EcoRV и NcoI для вставки HA-spike или по сайтам PstI и XbaI (изокаудомер NheI) для вставки mini-spike. Продуктами лигирования трансформировали бактерии *B. subtilis* 168, трансформанты отбирали на среде с хлорамфениколом (10 мкг/мл). Полученные генетические конструкции pNZ::spike, pNZ::HA-spike и pNZ::mini-spike проверяли на правильность сборки методом секвенирования ДНК по Сенгеру с использованием праймеров pNZ-F и pNZ-R и вводили в компетентные клетки бактерий *L. lactis* NZ3900. Для оценки индуцируемой экспрессии целевых генов в клетках рекомбинантных штаммов ночные культуры, разведенные в 25 раз, выращивали на протяжении 4 ч, затем вводили индуктор низин (1 нг/мл) и продолжали инкубировать при тех же условиях в течение 3 ч.

Подтверждение синтеза целевого белка полученными рекомбинантными штаммами осуществляли методом электрофореза белков с последующим иммуноблоттингом с антителами к RBD белка S вируса SARS-CoV-2 (см. рис. 3, *в*, рис. 4, *в*, и рис. 5, *в*). Согласно рис. 3, *в*, в клеточных лизатах бактерий штамма *L. lactis* pNZ::spike регистрируется несколько фракций белка, связывающихся с антителами к RBD. Отсутствие неспецифического связывания с белками клеточного лизата неиндуцированной суспензии бактерий (отрицательный контроль) подтверждает, что все регистрируемые с помощью иммуноблоттинга фракции содержат эпитоп RBD. Молекулярная масса наиболее представленной фракции составляет около 150 кДа, что совпадает с теоретически рассчитанной массой полноразмерного белка S (144,6 кДа с сигнальной последовательностью гена *prtP*). Присутствие фракций меньшего размера может свидетельствовать о частичной деградации белка или неполной трансляции.

В клеточном лизате штамма *L. lactis* pNZ::HA-spike регистрируется целевой белок массой приблизительно 23 кДа (см. рис. 4, *в*). Теоретически рассчитанная масса рекомбинантного белка HA-spike в рамке считывания с сигнальной последовательностью гена *prtP* составляет 29,9 кДа, а при условии удаления сигнальных пептидов уменьшается до 23,8 кДа. В лизате клеток штамма *L. lactis* pNZ::mini-spike основную часть целевого белка составляет фракция массой около 35 кДа (см. рис. 5, *в*), что соответствует теоретически рассчитанной массе 35,4 кДа.

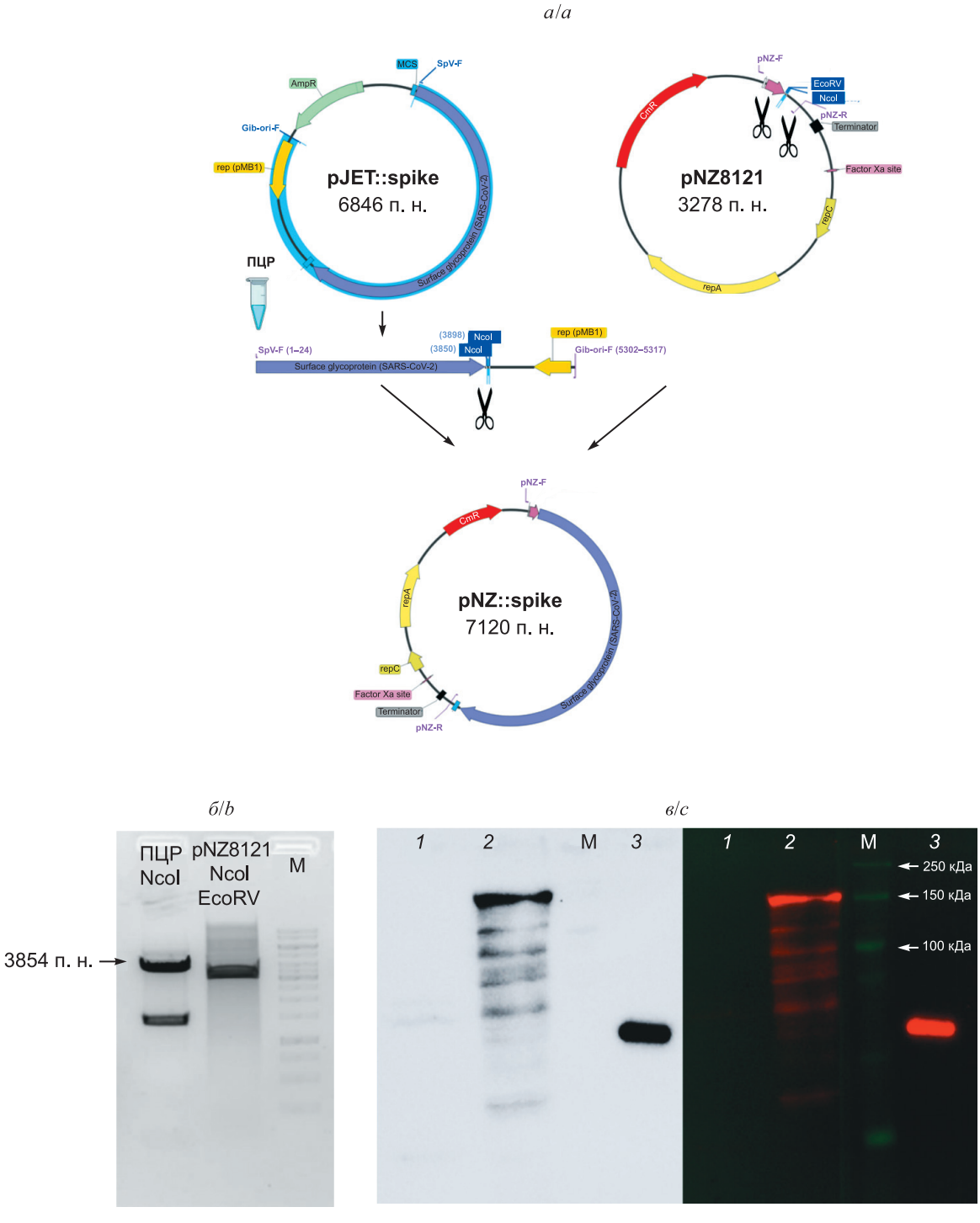


Рис. 3. Схема создания рекомбинантной плазмиды pNZ::spike и проверка экспрессии целевого гена:
а – стратегия конструирования экспрессионной плазмиды pNZ::spike;
б – электрофореграмма с фрагментами рестрикции, использованными в приготовлении лигирующей смеси для последующей трансформации бактерий *B. subtilis* 168 (M – маркер молекулярной массы фрагментов ДНК (*Thermo Scientific*; кат. № SM0311));
в – результат идентификации белков с RBD в клетках штамма *L. lactis* pNZ::spike (*1* – лизат клеток без индукции, *2* – лизат клеток после индукции низином, *3* – положительный контроль RBD, M – маркер молекулярной массы белка (*Bio-Rad*; кат. № 161-0376))

Fig. 3. The scheme of recombinant plasmid pNZ::spike construction and verification of target gene expression:
a – the strategy of expression plasmid pNZ::spike engineering;
b – electropherogram of restriction fragments used in the ligation with the following transformation of *B. subtilis* 168 cells (M – DNA fragment molecular weight marker (*Thermo Scientific*; catalog No. SM0311));
c – result of identification of proteins with RBD in *L. lactis* pNZ::spike cells (*1* – cell lysate without induction, *2* – nisin-induced cell lysate, *3* – RBD positive control, M – protein molecular weight marker (*Bio-Rad*; catalog No. 161-0376))

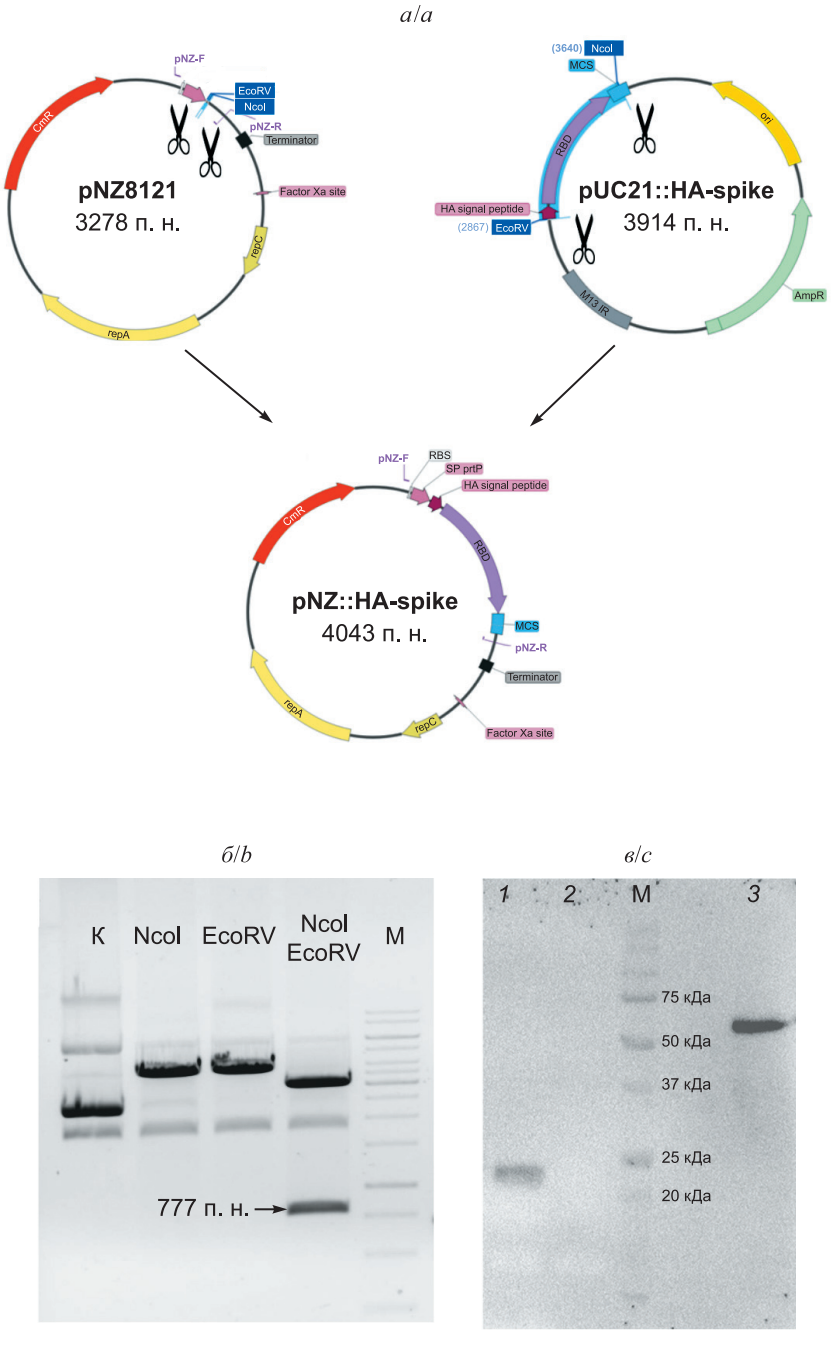


Рис. 4. Схема создания рекомбинантной плазмиды pNZ::HA-spike и проверка экспрессии целевого гена:
а – стратегия конструирования экспрессионной плазмиды pNZ::HA-spike;
б – электрофореграмма с фрагментами рестрикции, использованными в приготовлении лигирующей смеси для последующей трансформации бактерий *B. subtilis* 168 (К – необработанная плазмидная ДНК, М – маркер молекулярной массы фрагментов ДНК (*Thermo Scientific*; кат. № SM0311));
в – результат идентификации белков с RBD в клетках штамма *L. lactis* pNZ::HA-spike (*1* – лизат клеток после индукции низином, *2* – лизат клеток без индукции, *3* – положительный контроль RBD, М – маркер молекулярной массы белка (*Bio-Rad*; кат. № 161-0376))

Fig. 4. The scheme of recombinant plasmid pNZ::HA-spike construction and verification of target gene expression:
a – the strategy of expression plasmid pNZ::HA-spike engineering;
b – electropherogram of restriction fragments used in the ligation with the following transformation of *B. subtilis* 168 cells (K – plasmid without treatment, M – DNA fragment molecular weight marker (*Thermo Scientific*; catalog No. SM0311));
c – result of identification of proteins with RBD in *L. lactis* pNZ::HA-spike cells (*1* – nisin-induced cell lysate, *2* – cell lysate without induction, *3* – RBD positive control, M – protein molecular weight marker (*Bio-Rad*; catalog No. 161-0376))

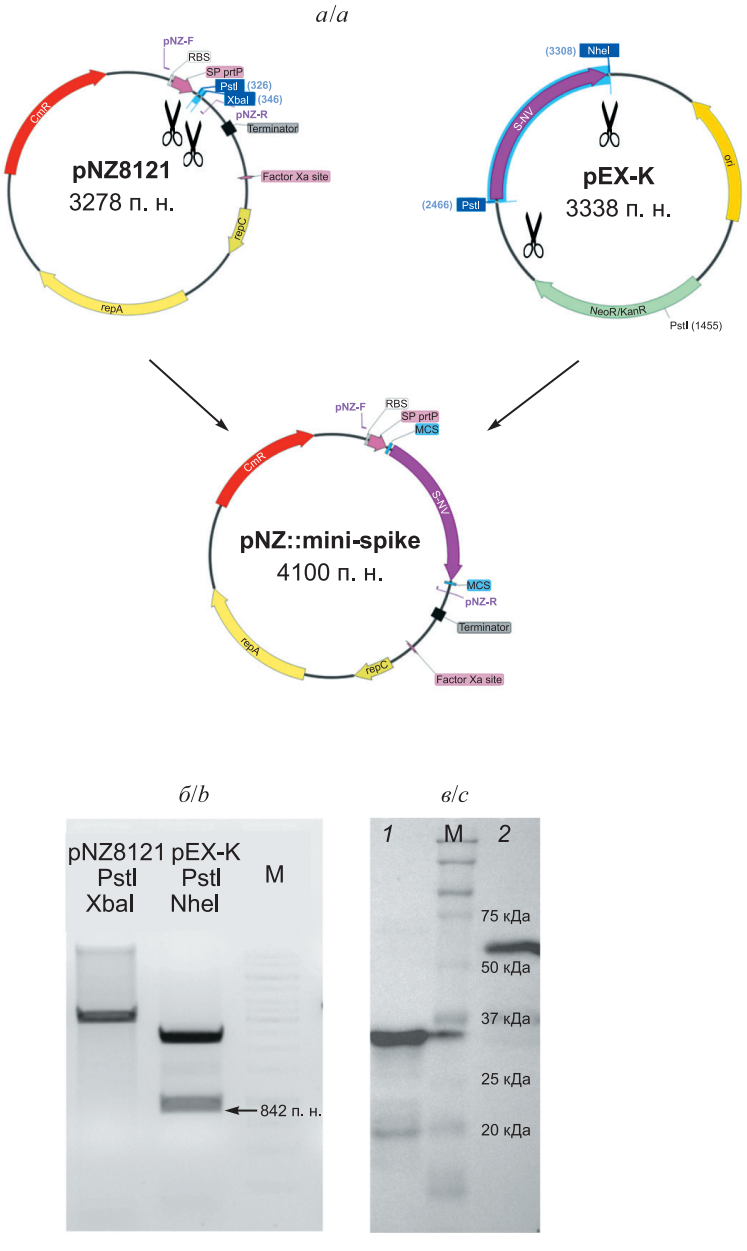


Рис. 5. Схема создания рекомбинантной плазмиды pNZ::mini-spike и проверка экспрессии целевого гена:
а – стратегия конструирования экспрессионной плазмиды pNZ::mini-spike;
б – электрофореграмма с фрагментами рестрикции, использованными
в приготовлении лигирующей смеси для последующей трансформации бактерий *B. subtilis* 168
(M – маркер молекулярной массы фрагментов ДНК (*Thermo Scientific*; кат. № SM0311));
в – результат идентификации белков с RBD в клетках штамма *L. lactis* pNZ::mini-spike
(*1* – лизат клеток после индукции низином, *2* – положительный контроль RBD,
M – маркер молекулярной массы белка (*Bio-Rad*; кат. № 161-0376))

Fig. 5. The scheme of recombinant plasmid pNZ::mini-spike construction and verification of target gene expression:
a – the strategy of expression plasmid pNZ::mini-spike engineering;
b – electropherogram of restriction fragments used in the ligation
with the following transformation of *B. subtilis* 168 cells
(M – DNA fragment molecular weight marker (*Thermo Scientific*; catalog No. SM0311));
c – result of identification of proteins with RBD in *L. lactis* pNZ::mini-spike cells
(*1* – nisin-induced cell lysate, *2* – RBD positive control,
M – protein molecular weight marker (*Bio-Rad*; catalog No. 161-0376))

Суспензии клеток выравнивали по оптической плотности перед приготовлением проб для электрофореза белков, однако заметно, что в клеточном лизате штамма *L. lactis* pNZ::HA-spike целевого белка меньше, чем в клеточном лизате штамма *L. lactis* pNZ::mini-spike (в сравнении с положительным контролем RBD на рис. 4, *в*, и рис. 5, *в*), а молекулярная масса белка соответствует теоретически рассчитанной молекулярной массе без сигнальных пептидов. Предположительно, это может быть связано с секрецией белка во внеклеточное пространство, сопровождающейся удалением сигнальных пептидов, поэтому нами исследовалась способность штаммов секретировать продуцируемый белок (рис. 6).

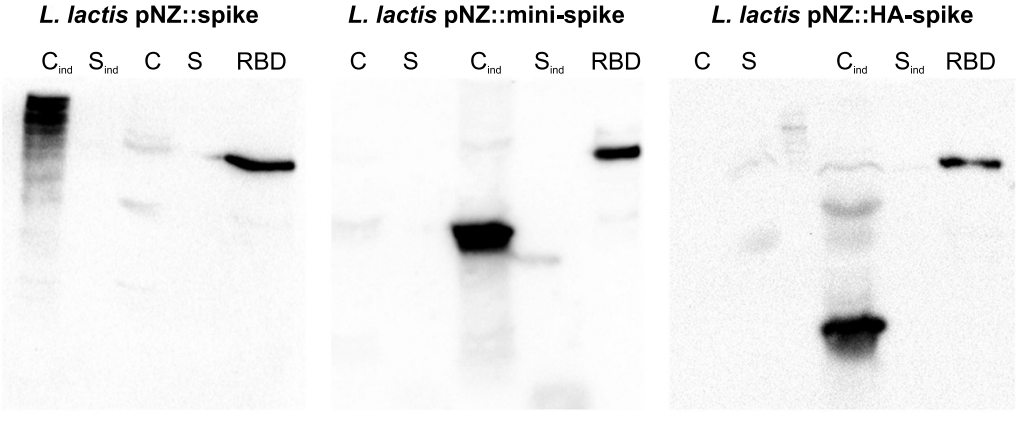


Рис. 6. Результат идентификации белков с RBD в клеточных лизатах и супернатантах рекомбинантных штаммов методом иммуноблоттинга. Используемые обозначения: C – клеточный лизат; S – супернатант; C_{ind} и S_{ind} – образцы из индуцированной низином суспензии; RBD – положительный контроль RBD. Для лучшей визуализации в образце C_{ind} штамма *L. lactis* pNZ::HA-spike загружено в 3 раза больше белкового лизата

Fig. 6. The result of Western blot identification of proteins with RBD in cell lysates and supernatants of recombinant strains. Symbols: C – cell lysate; S – supernatant; C_{ind} and S_{ind} – samples were prepared from nisin induced suspension; RBD – positive control of RBD. For better visualisation, 3 times more protein lysate was loaded in sample C_{ind} of strain *L. lactis* pNZ::HA-spike

Как видно из рис. 6, весь пул рекомбинантных белков, синтезируемый штаммами *L. lactis* pNZ::spike, *L. lactis* pNZ::mini-spike и *L. lactis* pNZ::HA-spike, находится в клеточном осадке. Относительно отсутствия секреции синтезируемых белков следует отметить, что согласно имеющимся сведениям в бактериях *L. lactis* не всегда удавалось получить секретируемый рекомбинантный белок даже при использовании сигнального пептида Usp45, позиционируемого производителем как более предпочтительного [7; 21]. Эффективность секреции зависит от сочетания сигнального пептида с целевым белком, и оптимальное сочетание трудно предсказать, при этом предполагается, что конформация продуцируемого белка влияет на секрецию в большей степени, чем его размер [12]. При использовании бактерий в качестве живой пероральной вакцины внутриклеточная или мембранная локализация антигенов может быть более предпочтительной, так как секретируемые белки в большей мере подвержены разрушению ферментами желудочно-кишечного тракта хозяина. Возможной причиной разного уровня синтеза RBD штаммами *L. lactis* pNZ::HA-spike и *L. lactis* pNZ::mini-spike являются различия кодонного состава кодирующих последовательностей HA-spike и mini-spike. Также не исключено действие внутриклеточных протеаз, в том числе идентифицированной в бактериях *L. lactis* цитоплазматической протеазы ClpP, которая играет важную роль в деградации неправильно свернутых белков [56].

Согласно результатам, полученным в настоящей работе, бактерии *L. lactis* способны синтезировать как небольшой фрагмент RBD, так и полноразмерный белок S вируса SARS-CoV-2.

Заключение

Созданы экспрессионные конструкции, в составе которых под контролем индуцибельного промотора P_{nisA} находятся ген *s* вируса SARS-CoV-2 (pNZ::spike) и различающиеся по кодонному составу и размеру фрагменты гена *s*, транслируемые в RBD (pNZ::mini-spike и pNZ::HA-spike). Получены штаммы бактерий *L. lactis*, продуцирующие рекомбинантные вирусные белки, специфически связывающиеся с антителами к RBD вируса SARS-CoV-2: штамм *L. lactis* pNZ::spike (синтезирует белок S вируса SARS-CoV-2 с молекулярной массой около 150 кДа), а также штаммы *L. lactis* pNZ::mini-spike и *L. lactis* pNZ::HA-spike (синтезируют RBD белка S с молекулярной массой около 35 и 23 кДа соответственно).

Представленные в работе результаты свидетельствуют о принципиальной возможности использования бактерий *L. lactis* в качестве продуцентов отдельных доменов и полноразмерных мультидоменных рекомбинантных белков вируса SARS-CoV-2. Полученные рекомбинантные штаммы *L. lactis* pNZ::spike, *L. lactis* pNZ::mini-spike и *L. lactis* pNZ::HA-spike будут подвергаться дальнейшим исследованиям в целях оценки их способности вызывать специфический иммунный ответ у лабораторных животных.

Библиографические ссылки

1. Ayivi RD, Gyawali R, Krastanov A, Aljaloud SO, Worku M, Tahergorabi R, et al. Lactic acid bacteria: food safety and human health applications. *Dairy.* 2020;1(3):202–232. DOI: 10.3390/dairy1030015.

2. del Rio B, Redruello B, Fernandez M, Martin MC, Ladero V, Alvarez MA. Lactic acid bacteria as a live delivery system for the *in situ* production of nanobodies in the human gastrointestinal tract. *Frontiers in Microbiology.* 2018;9:3179. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03179.

3. Hatti-Kaul R, Chen L, Dishisha T, El Enshasy H. Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiology Letters.* 2018;365(20):fny213. DOI: 10.1093/femsle/fny213.

4. Kaur M, Singh H, Jangra M, Kaur L, Jaswal P, Dureja C, et al. Lactic acid bacteria isolated from yak milk show probiotic potential. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2017;101(20):7635–7652. DOI: 10.1007/s00253-017-8473-4.

5. Thakur K, Tomar SK, De S. Lactic acid bacteria as a cell factory for riboflavin production. *Microbial Biotechnology.* 2016;9(4):441–451. DOI: 10.1111/1751-7915.12335.

6. Ryan MP, Rea MC, Hill C, Ross RP. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Applied and Environmental Microbiology.* 1996;62(2):612–619. DOI: 10.1128/aem.62.2.612-619.1996.

7. Enouf V, Langella P, Commissaire J, Cohen J, Corthier G. Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Applied and Environmental Microbiology.* 2001;67(4):1423–1428. DOI: 10.1128/AEM.67.4.1423-1428.2001.

8. Ogaugwu CE, Cheng Q, Fieck A, Hurwitz I, Durvasula R. Characterization of a *Lactococcus lactis* promoter for heterologous protein production. *Biotechnology Reports.* 2018;17:86–92. DOI: 10.1016/j.btre.2017.11.010.

9. Singh SK, Naghizadeh M, Plieskatt J, Singh S, Theisen M. Cloning and recombinant protein expression in *Lactococcus lactis*. In: Sousa Â, Passarinha L, editors. *Advanced methods in structural biology.* New York: Humana Press; 2023. p. 3–20 (Walker JM, editor. Methods in molecular biology; volume 2652). DOI: 10.1007/978-1-0716-3147-8_1.

10. Guan C, Yuan Y, Ma Y, Wang X, Zhang C, Lu M, et al. Development of a novel expression system in lactic acid bacteria controlled by a broad-host-range promoter P_{srfA}. *Microbial Cell Factories.* 2022;21:23. DOI: 10.1186/s12934-022-01754-z.

11. Cho SW, Yim J, Seo SW. Engineering tools for the development of recombinant lactic acid bacteria. *Biotechnology Journal.* 2020;15(6):1900344. DOI: 10.1002/biot.201900344.

12. Le Loir Y, Azevedo V, Oliveira SC, Freitas DA, Miyoshi A, Bermúdez-Humarán LG, et al. Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microbial Cell Factories.* 2005;4:2. DOI: 10.1186/1475-2859-4-2.

13. Landete JM. A review of food-grade vectors in lactic acid bacteria: from the laboratory to their application. *Critical Reviews in Biotechnology.* 2017;37(3):296–308. DOI: 10.3109/07388551.2016.1144044.

14. Takahashi K, Orito N, Tokunoh N, Inoue N. Current issues regarding the application of recombinant lactic acid bacteria to mucosal vaccine carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2019;103(15):5947–5955. DOI: 10.1007/s00253-019-09912-x.

15. Benbouziane B, Ribelles P, Aubry C, Martin R, Kharrat P, Riazi A, et al. Development of a stress-inducible controlled expression (SICE) system in *Lactococcus lactis* for the production and delivery of therapeutic molecules at mucosal surfaces. *Journal of Biotechnology.* 2013;168(2):120–129. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.04.019.

16. Ma S, Li K, Li X-S, Guo X-Q, Fu P-F, Yang M-F, et al. Expression of bioactive porcine interferon-alpha in *Lactobacillus casei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2014;30(9):2379–2386. DOI: 10.1007/s11274-014-1663-7.

17. Chatel J-M, Langella P, Adel-Patient K, Commissaire J, Wal J-M, Corthier G. Induction of mucosal immune response after intranasal or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology.* 2001;8(3):545–551. DOI: 10.1128/CDLI.8.3.545-551.2001.

18. Wells JM, Mercenier A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nature Reviews Microbiology.* 2008;6(5):349–362. DOI: 10.1038/nrmicro1840.

19. Qiao N, Du G, Zhong X, Sun X. Recombinant lactic acid bacteria as promising vectors for mucosal vaccination. *Exploration.* 2021;1(2):20210026. DOI: 10.1002/EXP.20210026.

20. Tavares LM, de Jesus LCL, da Silva TF, Barroso FAL, Batista VL, Coelho-Rocha ND, et al. Novel strategies for efficient production and delivery of live biotherapeutics and biotechnological uses of *Lactococcus lactis*: the lactic acid bacterium model. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 2020;8:517166. DOI: 10.3389/fbioe.2020.517166.

21. Bermúdez-Humarán LG, Kharrat P, Chatel J-M, Langella P. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microbial Cell Factories.* 2011;10(supplement 1):S4. DOI: 10.1186/1475-2859-10-S1-S4.

22. Chau ECT, Kwong TC, Pang CK, Chan LT, Chan AML, Yao X, et al. A novel probiotic-based oral vaccine against SARS-CoV-2 Omicron variant B.1.1.529. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023;24(18):13931. DOI: 10.3390/ijms241813931.

23. Wang M, Fu T, Hao J, Li L, Tian M, Jin N, et al. A recombinant *Lactobacillus plantarum* strain expressing the spike protein of SARS-CoV-2. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2020;160:736–740. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.239.

24. Zhao Y, Zhang H, Zhao Z, Liu F, Dong M, Chen L, et al. Efficacy and safety of oral LL-37 against the Omicron BA.5.1.3 variant of SARS-CoV-2: a randomized trial. *Journal of Medical Virology.* 2023;95(8):e29035. DOI: 10.1002/jmv.29035.

25. Yurina V, Adianingsih OR, Widodo N. Oral and intranasal immunization with food-grade recombinant *Lactococcus lactis* expressing high conserved region of SARS-CoV-2 spike protein triggers mice's immunity responses. *Vaccine: X.* 2023;13:100265. DOI: 10.1016/j.jvacx.2023.100265.

26. Xuan B, Park J, Yoo JH, Kim EB. Oral immunization of mice with cell extracts from recombinant *Lactococcus lactis* expressing SARS-CoV-2 spike protein. *Current Microbiology.* 2022;79(6):167. DOI: 10.1007/s00284-022-02866-w.

27. Jia Q, Bielefeldt-Ohmann H, Maison RM, Masleša-Galić S, Cooper SK, Bowen RA, et al. Replicating bacterium-vectored vaccine expressing SARS-CoV-2 membrane and nucleocapsid proteins protects against severe COVID-19-like disease in hamsters. *NPJ Vaccines.* 2021;6:47. DOI: 10.1038/s41541-021-00321-8.

28. Kurpas MK, Jaksik R, Kuś P, Kimmel M. Genomic analysis of SARS-CoV-2 Alpha, Beta and Delta variants of concern uncovers signatures of neutral and non-neutral evolution. *Viruses.* 2022;14(11):2375. DOI: 10.3390/v14112375.

29. Jiang H-W, Li Y, Tao S-C. SARS-CoV-2 peptides/epitopes for specific and sensitive diagnosis. *Cellular & Molecular Immunology.* 2023;20(5):540–542. DOI: 10.1038/s41423-023-01001-4.

30. Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell.* 2020;181(2):281–292. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.058.

31. Patel R, Kaki M, Potluri VS, Kahar P, Khanna D. A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson. *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* 2022;18(1):2002083. DOI: 10.1080/21645515.2021.2002083.

32. Nagesha SN, Ramesh BN, Pradeep C, Shashidhara KS, Ramakrishnappa T, Krishnaprasad BT, et al. SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit as an ideal target for stable vaccines: a bioinformatic study. *Materials Today: Proceedings.* 2022;49(part 3):904–912. DOI: 10.1016/j.matpr.2021.07.163.

33. Tai W, He L, Zhang X, Pu J, Voronin D, Jiang S, et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cellular & Molecular Immunology.* 2020;17(6):613–620. DOI: 10.1038/s41423-020-0400-4.

34. Shrivastava T, Singh B, Rizvi ZA, Verma R, Goswami S, Vishwakarma P, et al. Comparative immunomodulatory evaluation of the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein; a potential vaccine candidate which imparts potent humoral and Th1 type immune response in a mouse model. *Frontiers in Immunology.* 2021;12:641447. DOI: 10.3389/fimmu.2021.641447.

35. Wang Y, Wang L, Cao H, Liu C. SARS-CoV-2 S1 is superior to the RBD as a COVID-19 subunit vaccine antigen. *Journal of Medical Virology.* 2021;93(2):892–898. DOI: 10.1002/jmv.26320.

36. Yang J, Wang W, Chen Z, Lu S, Yang F, Bi Z, et al. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity. *Nature.* 2020;586(7830):572–577. DOI: 10.1038/s41586-020-2599-8.

37. Montgomerie I, Bird TW, Palmer OR, Mason NC, Pankhurst TE, Lawley B, et al. Incorporation of SARS-CoV-2 spike NTD to RBD protein vaccine improves immunity against viral variants. *iScience.* 2023;26(4):106256. DOI: 10.1016/j.isci.2023.106256.

38. Law JLM, Logan M, Joyce MA, Landi A, Hockman D, Crawford K, et al. SARS-CoV-2 recombinant receptor-binding domain (RBD) induces neutralizing antibodies against variant strains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV-1. *Vaccine.* 2021;39(40):5769–5779. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.08.081.

39. Gaeng S, Scherer S, Neve H, Loessner MJ. Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology.* 2000;66(7):2951–2958. DOI: 10.1128/AEM.66.7.2951-2958.2000.

40. Zhang H, Dong M, Xu H, Li H, Zheng A, Sun G, et al. Recombinant *Lactococcus lactis* expressing human LL-37 prevents deaths from viral infections in piglets and chicken. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* [Internet]. 2023 September 25 [cited 2024 January 12]. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-023-10155-6. Epub ahead of print. DOI: 10.1007/s12602- 023-10155-6.

41. Arnau J, Hjerl-Hansen E, Israelsen H. Heterologous gene expression of bovine plasmin in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 1997;48(3):331–338. DOI: 10.1007/s002530051058.

42. Achatz S, Skerra A. Comparative genome analysis of three classical *E. coli* cloning strains designed for blue/white selection: JM83, JM109 and XL1-Blue. *FEBS Open Bio.* 2024;14(6):888–905. DOI: 10.1002/2211-5463.13812.

43. Itaya M. *Bacillus subtilis* 168 as a unique platform enabling synthesis and dissemination of genomes. *Journal of General and Applied Microbiology.* 2022;68(2):45–53. DOI: 10.2323/jgam.2021.12.001.

44. de Ruyter PG, Kuipers OP, Beerthuyzen MM, van Alen-Boerrigter I, de Vos WM. Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology.* 1996;178(12):3434–3439. DOI: 10.1128/jb.178.12.3434-3439.1996.

45. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 1985;33(1):103–119. DOI: 10.1016/0378-1119(85)90120-9.

46. Vieira J, Messing J. New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene.* 1991;100:189–194. DOI: 10.1016/0378-1119(91)90365-i.

47. *MoBiTec Molecular Biotechnology* [Internet]. Goettingen: MoBiTec; 2024 [cited 2024 January 12]. Available from: https://www.mobitec.com/.

48. Бельская ИВ. Создание векторной конструкции для экспрессии RBD SARS-CoV-2. В: Абиев Е, редактор. *Лучший молодой ученый – 2022. V Международное книжное издание стран Содружества Независимых Государств. Том 18.* Нур-Султан: [б. и.]; 2022. с. 39–42.

49. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 3 volumes.

50. Anagnostopoulos C, Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology.* 1961;81(5):741–746. DOI: 10.1128/jb.81.5.741-746.1961.

51. *NICE® expression_system for Lactococcus lactis. The effective & easy-to-operate nisin controlled gene expression system* [Internet]. Goettingen: MoBiTec; 2015 [cited 2024 January 12]. 34 p. Available from: https://www.mobitec.com/media/datasheets/mobitec gmbh/NICE_Expression_System-Handbook.pdf.

52. Voskuil MI, Chambliss GH. Rapid isolation and sequencing of purified plasmid DNA from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology.* 1993;59(4):1138–1142. DOI: 10.1128/aem.59.4.1138-1142.1993.

53. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS.* 1977;74(12):5463–5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.

54. Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tukhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *The Lancet.* 2021;397(10275):671–681. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00234-8.

55. Dormeshkin D, Katsin M, Stegantseva M, Golenchenko S, Shapira M, Dubovik S, et al. Design and immunogenicity of SARS-CoV-2 DNA vaccine encoding RBD-PVXCP fusion protein. *Vaccines.* 2023;11(6):1014. DOI: 10.3390/vaccines11061014.

56. Frees D, Ingmer H. ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology.* 1999;31(1):79–87. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01149.x.

Получена 26.06.2024 / исправлена 17.07.2024 / принята 17.07.2024.
Received 26.06.2024 / revised 17.07.2024 / accepted 17.07.2024.

Генетика и молекулярная биология

Genetics and molecular biology

УДК [616.155.392.1-036.11:576.385.5]:[577.217:575.224.232.52]

АНАЛИЗ ТОЧЕК РАЗРЫВА ПРИ ДЕЛЕЦИЯХ ГЕНА *IKZF1* У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ ИЗ В-КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

М. А. КЕРЕЗЬ[1)]***, Д. А. БОГАТЕНКОВА***[1)]***, О. С. ВШИВКОВА***[1)]***, А. Н. МЕЛЕШКО***[1)]

[1)]*Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Боровлянский с/с, Минский р-н, Беларусь*

Аннотация. Помимо давно известных диагностически значимых перестроек при остром лимфобластном лейкозе из В-клеток-предшественников, таких как *BCR::ABL1*, *TCF3::PBX1* (*E2A::PBX1*) и *KMT2A* (*MLL*), значительный интерес для прогнозирования течения заболевания представляют мутации в генах транскрипционных

Образец цитирования:
Керезь МА, Богатенкова ДА, Вшивкова ОС, Мелешко АН. Анализ точек разрыва при делециях гена *IKZF1* у пациентов с острым лимфобластным лейкозом из В-клеток-предшественников. *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2024;3:50–58.
EDN: AYAVFX

For citation:
Keraz MA, Bogatenkova DA, Vshyukova VS, Meleshko AN. Breakpoint analysis of *IKZF1* gene deletions in patients with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Experimental Biology and Biotechnology.* 2024;3:50–58. Russian.
EDN: AYAVFX

Авторы:
Мария Александровна Керезь – младший научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий.
Дарья Александровна Богатенкова – младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований.
Ольга Сергеевна Вшивкова – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий, ученый секретарь.
Александр Николаевич Мелешко – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий.

Authors:
Maryia A. Keraz, junior researcher at the laboratory of genetic biotechnologies.
kerezz-z@mail.ru
https://orcid.org/0009-0007-6357-3147
Darya A. Bogatenkova, junior researcher at the laboratory of molecular genetic research.
yanchenko.darya255@gmail.com
https://orcid.org/0009-0008-2154-6463
Volha S. Vshyukova, PhD (biology); leading researcher at the laboratory of genetic biotechnologies and scientific secretary.
vshyukova@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-4881-7891
Alexander N. Meleshko, PhD (biology); leading researcher at the laboratory of genetic biotechnologies.
meleshko@tut.by
https://orcid.org/0000-0001-6964-3635

факторов, контролирующих лимфоидную дифференцировку, в первую очередь мутации в гене *IKZF1*. Ген *IKZF1* кодирует ДНК-связывающий белок Ikaros – ключевой транскрипционный фактор, регулирующий ранние этапы дифференцировки Т- и В-лимфоцитов, NK-клеток и дендритных клеток. При остром лимфобластном лейкозе из В-клеток-предшественников наиболее распространенными генетическими событиями, затрагивающими ген *IKZF1*, являются внутригенные делеции, приводящие к потере нескольких экзонов. Эти делеции наблюдаются у пациентов детского и взрослого возраста, их частота увеличивается при наличии транслокации *BCR::ABL1*. Также известны нарушения сплайсинга, выраженные в повышенной экспрессии коротких транскриптов (изоформ) гена *IKZF1*. Однако в подавляющем большинстве случаев повышенная экспрессия коротких изоформ является следствием внутригенной делеции. Данные молекулярно-генетические изменения обусловливают нарушение регуляции дифференцировки лимфоидных клеток и ассоциируются с плохим прогнозом для пациентов с острым лимфобластным лейкозом из В-клеток-предшественников. Понимание генетических изменений в ключевых транскрипционных факторах, таких как Ikaros, может дать ценные сведения о биологии острого лимфобластного лейкоза из В-клеток-предшественников и помочь в прогнозировании клинических результатов для пациентов с этим заболеванием.

Ключевые слова: *IKZF1*; Ikaros; криптические сигнальные последовательности рекомбинации; cRSS; острый лимфобластный лейкоз из В-клеток-предшественников; В-ОЛЛ; точки разрыва; сайты рекомбинации; горячие точки; делеции.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственной научно-технической программы «Научно-техническое обеспечение качества и доступности медицинских услуг» (подпрограмма «Злокачественные опухоли», задание «Разработать и внедрить метод молекулярно-генетической диагностики BCR-ABL1-like острого лимфобластного лейкоза и оценить показатели прогноза при данном типе лейкоза у пациентов детского возраста, подростков и “молодых” взрослых», договор № 02.14/2020).

BREAKPOINT ANALYSIS OF *IKZF1* GENE DELETIONS IN PATIENTS WITH B-CELL PRECURSOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

***M. A. KERAZ*[a], *D. A. BOGATENKOVA*[a], *V. S. VSHYUKOVA*[a], *A. N. MELESHKO*[a]**

[a]*Republican Scientific and Practical Center for Children's Oncology, Hematology and Immunology, 43 Frunzienskaja Street, Barawliany 223053, Barawlianski sielsaviet, Minsk District, Belarus*

Corresponding author: M. A. Keraz (kerezz-z@mail.ru)

Abstract. In addition to the long-known diagnostically significant rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, such as *BCR::ABL1*, *TCF3::PBX1* (*E2A::PBX1*) and *KMT2A* (*MLL*), mutations in genes of transcription factors, which controls lymphoid differentiation, primarily mutations in the *IKZF1* gene, are of considerable interest in predicting the course of the disease. The *IKZF1* gene encodes a DNA-binding protein Ikaros, which is a key transcription factor that regulates early steps in the differentiation of T- and B-lymphocytes, NK cells and dendritic cells. In B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, the most common genetic events involving the *IKZF1* gene are intragenic deletions that result in the loss of several exons. These deletions are observed in pediatric and adult patients with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, with a higher prevalence in cases where there is a *BCR::ABL1* translocation. There are also known splicing disorders expressed in increased expression of short *IKZF1* gene transcripts (isoforms). However, in the vast majority of cases, increased expression of short isoforms is a consequence of intragenic deletion. These molecular genetic changes contribute to the dysregulation of lymphoid differentiation and are associated with a poor prognosis for patients with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Understanding the genetic alterations in key transcription factors, such as Ikaros, can provide valuable insights into the biology of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and help in predicting the clinical outcomes of patients with this disease.

Keywords: *IKZF1*; Ikaros; cryptic recombination signal sequences; cRSS; B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia; BCP-ALL; breakpoints; recombination sites; hotspots; deletions.

Acknowledgements. This work was carried out within the framework of the state scientific and technical programme «Scientific and technical provision of quality and accessibility of medical services» (subprogramme «Malignant tumors», assignment «To develop and implement a method of molecular genetic diagnostics of BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia and evaluate prognosis indicators for this type of leukemia in pediatric patients, adolescents and “young” adults», contract No. 02.14/2020).

Введение

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) – злокачественное заболевание системы кроветворения, характеризующееся неконтролируемой пролиферацией незрелых лимфоидных клеток (лимфобластов) [1; 2]. Стоит отметить, что ОЛЛ из В-клеток-предшественников (В-ОЛЛ) встречается гораздо чаще, чем ОЛЛ из Т-клеток-предшественников, и ассоциируется с хорошим прогнозом, но, несмотря на это, занимает лидирующие позиции по детской смертности от рака. Характерные генетические аномалии обнаруживаются примерно в 80 % случаев В-ОЛЛ у пациентов детского возраста и в 60–70 % случаев заболевания у пациентов взрослого возраста [3].

Основной задачей диагностического этапа при В-ОЛЛ является изучение факторов, позволяющих выделить пациентов с неблагоприятным прогнозом. Результаты многих исследований доказывают значимую роль делеций гена *IKZF1* в патогенезе и прогрессировании ОЛЛ. Ген *IKZF1* кодирует транскрипционный фактор, ДНК-связывающий белок семейства цинковых пальцев Ikaros [4–8].

В норме белок Ikaros участвует в ремоделировании хроматина и регулирует дифференцировку Т- и В-клеток. На ранних стадиях гемопоэза регуляторная роль данного белка как транскрипционного фактора сводится к репрессии генов миелоидной и эритроидной линий дифференцировки и стимуляции генов, ответственных за лимфоидную дифференцировку [9; 10]. Нарушение функций белка Ikaros опосредует блокаду дифференцировки В-лимфоцитов на стадии перехода от про-В-клеток к пре-В-клеткам, а полная потеря его функций может привести к отсутствию всего В-клеточного компартмента [10]. Кроме того, описаны дополнительные механизмы патогенетического влияния: усиление пролиферации клеток по причине отключения контроля со стороны белка Ikaros над рядом ключевых генов, а также сверхэкспрессия антиапоптотических генов *JAK1*, *JAK3*, *STAT3* и *STAT5* в результате нарушения передачи каскада сигналов по одному из важнейших коммуникационных узлов клетки – сигнальному пути JAK/STAT [10; 11].

Ген *IKZF1* общей протяженностью 108 019 пар оснований (п. о.) расположен на коротком плече 7-й хромосомы человека (локус 7p12.2). Он состоит как минимум из девяти экзонов, первый из которых не является белоккодирующим, но может вместе с промоторной областью регулировать транскрипцию (рис. 1) [5; 9; 12]. Экзоны 4–6 кодируют четыре N-концевых ДНК-связывающих домена типа «цинковые пальцы», а экзон 8 кодирует два С-концевых домена типа «цинковые пальцы», которые необходимы для гомо- и гетеродимеризации белка Ikaros с другими членами своего семейства (Helios, Aiolos, Eos, Pegasus) [9; 12].

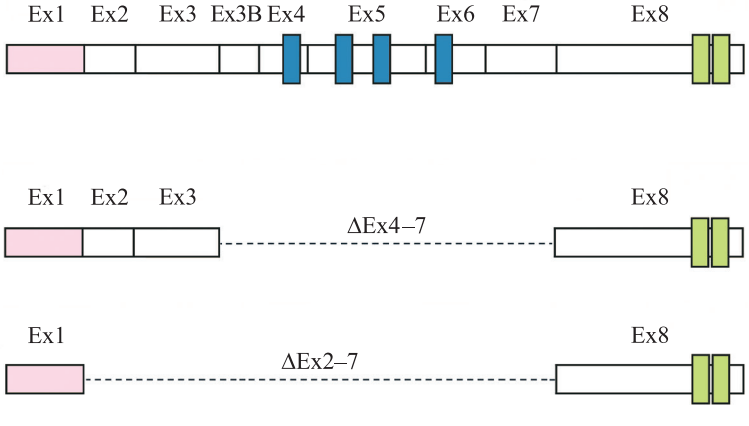


Рис. 1. Строение гена *IKZF1*. Синим цветом обозначены участки ДНК, кодирующие N-концевые домены типа «цинковые пальцы», зеленым цветом – участки ДНК, кодирующие С-концевые домены типа «цинковые пальцы», розовым цветом отмечен первый некодирующий экзон

Fig. 1. Structure of the *IKZF1* gene. Blue colour indicates DNA regions encoding N-terminal zinc domains, green colour indicates DNA regions encoding C-terminal zinc domains, pink colour marked the first non-coding exon

Аберрации гена *IKZF1* разнообразны, они включают моносомию 7-й хромосомы, образование ее дериватов, потерю короткого плеча, точечные мутации и внутригенные делеции. Все перечисленные аберрации, за исключением точечных мутаций, описаны как вторичные события лейкозогенеза, которые приводят к потере или нарушению функций белка Ikaros и выражаются в существенных комплексных изменениях со стороны системы гемопоэза [10; 13]. При В-ОЛЛ наиболее распространенными молекулярно-генетическими событиями в локусе гена *IKZF1* являются внутригенные делеции участка размером 15 000–200 000 п. о.,

обусловливающие потерю нескольких экзонов. Частота других аберраций не превышает 5 % [10]. Делеции гена *IKZF1* определяются в среднем у 10 % пациентов детского возраста с В-ОЛЛ. Среди взрослых пациентов распространенность делеций увеличивается до 30–50 %, а при наличии транслокации *BCR::ABL1* – до 80 % [4; 5]. Также известны нарушения сплайсинга, выраженные в повышенной экспрессии коротких транскриптов (изоформ) гена *IKZF1*. Однако в подавляющем большинстве случаев повышенная экспрессия коротких изоформ является следствием внутригенных делеций [10].

С гена *IKZF1* транскрибируются как минимум 13 различных транскриптов. В результате образуются изоформы белка, отличающиеся между собой размерами и функциональной активностью. Известные в настоящее время изоформы имеют идентичные белоксвязывающие домены на С-конце, но различаются составом ДНК-связывающих доменов типа «цинковые пальцы» на N-конце. Функциональные длинные изоформы (Ik1, Ik2, Ik2a, Ik3, Ik3a) содержат как минимум три ДНК-связывающих цинковых пальца. Такие изоформы характеризуются внутриядерной локализацией, обладают высокой аффинностью к определенному промотору ДНК, функционируют как транскрипционный фактор и участвуют в организации структуры хроматина. Изоформы белка Ikaros, в которых отсутствуют два и более ДНК-связывающих цинковых пальца, называются короткими, или доминантно-негативными (Ik-DN) (Ik4, Ik4a, Ik5, Ik6, Ik7, Ik8, Ik9). Они неспособны к взаимодействию с ДНК и, соответственно, выполнению своей основной функции, но могут образовывать димеры с длинными изоформами белка Ikaros, нарушая тем самым их нормальное функционирование [13].

Среди внутригенных делеций гена *IKZF1*, приводящих к аберрантному сплайсингу, наиболее часто (не менее 30 % случаев) обнаруживается делеция с 4-го по 7-й экзоны (Ex4–7 (ранее Ex3–6), на рисунках обозначена как ΔEx4–7). Еще одна распространенная делеция (Ex2–7 (ранее Ex1–6), на рисунках обозначена как ΔEx2–7) захватывает с 2-го по 7-й экзоны. Делеция Ex2–7 приводит к образованию нефункциональной аллели гена, поскольку 1-й экзон не является белоккодирующим. Частота встречаемости других известных делеций (Ex2–8 и Ex4–8) при ОЛЛ, по разным данным, не превышает 4 % [7].

Логично предположить, что в результате делеций такого типа механизм сплайсинга будет нарушен и, вероятно, это приведет к образованию нефункциональных коротких изоформ белка. Так, наиболее часто встречающаяся короткая изоформа Ik6 образуется в результате делеции Ex4–7 и последующего сплайсинга между 3-м и 8-м экзонами [7; 14].

Цель данного исследования – охарактеризовать координаты точек разрыва-соединения, определить особенности фланкирующих нуклеотидных последовательностей ДНК при делециях (Ex4–7 и Ex2–7) гена *IKZF1* у пациентов детского возраста с В-ОЛЛ.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования служили последовательности ДНК, полученные из клеток костного мозга пациентов детского возраста с подтвержденным первично диагностированным В-ОЛЛ. Размер выборки составил 266 пациентов. Среди них у 14 человек методом ПЦР выявлена делеция Ex4–7, у 3 человек – делеция Ex2–7. Другие распространенные типы делеций (Ex2–8 и Ex4–8) у пациентов исследуемой группы не обнаружены. Делеции выявляли согласно инструкции «Метод определения внутригенных делеций в гене *IKZF1* при В-клеточных острых лимфобластных лейкозах у детей и “молодых” взрослых»[1], где изложен метод обнаружения большинства известных (в том числе четырех вышеперечисленных) внутригенных делеций гена *IKZF1*, однако авторы не исключают, что в редких случаях он может быть нечувствительным в отношении крайне редких делеций, точки разрыва при которых могут лежать за пределами зоны амплификации праймеров.

Для выравнивания последовательностей и визуализации полученных результатов применяли программу *SnapGene* (версия 2.3.2) (*GSL Biotech, LLC*, США).

В качестве референсной последовательности использовали вариант NG_034231.1 из базы данных RefSeqGene (NCBI Reference Sequence)[2].

Для поиска сигнальных последовательностей рекомбинации (*recombination signal sequences*, RSS) применяли веб-сервер *RSSsite*, который включает в себя базу данных RSSdb для идентификации предварительно вычисленных потенциальных RSS и инструмент поиска DnaGrab, позволяющий оценивать потенциальные RSS в последовательностях, предоставленных пользователем [15]. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программной среды *R* (версия 3.4.2).

[1]Метод определения внутригенных делеций в гене *IKZF1* при В-клеточных острых лимфобластных лейкозах у детей и «молодых» взрослых : инструкция по применению : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 17.05.2019 / Респ. науч.-практ. центр дет. онкологии, гематологии и иммунологии ; О. С. Вшивкова, А. Н. Мелешко. Минск, 2019. 13 с.

[2]Homo sapiens Ikaros family zinc finger 1 (*IKZF1*), RefSeqGene (LRG_1121) on chromosome 7 [Electronic resource]. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_034231.1 (date of access: 17.07.2023).

Результаты и их обсуждение

Анализ внутригенных делеций гена *IKZF1* был проведен в 266 образцах мононуклеарных клеток костного мозга пациентов детского возраста с первичным В-ОЛЛ, частота делеций составила 6,4 %. Все выявленные делеции являлись моноаллельными. Наиболее часто обнаруживалась внутригенная делеция Ex4–7 – в 14 случаях (5,3 %) первичного В-ОЛЛ и 6 случаях (100 %) рецидивов заболевания. Вариант более крупной делеции Ex2–7 был выявлен у 3 пациентов (1,1 %) с первичным В-ОЛЛ (при рецидивах заболевания данная делеция не обнаруживалась). Другие распространенные типы делеций (Ex2–8 и Ex4–8) у пациентов исследуемой группы не выявлены.

При делеции Ex2–7 гена *IKZF1* точки разрыва-соединения находились в 1-м и 7-м интронах, размер делеций варьировал от 88 137 до 88 549 п. о. (табл. 1, рис. 2). В 1-м интроне общий разброс точек разрыва-соединения составил 4–411 п. о. При делеции Ex4–7 точки разрыва-соединения располагались в 3-м и 7-м интронах, размер делеций варьировал от 50 735 до 50 752 п. о. (см. табл. 1, рис. 3). В 3-м интроне общий разброс точек разрыва-соединения составил 13 п. о. Как видно, у всех 17 пациентов точки разрыва-соединения находились в 7-м интроне, где их общий разброс составил 14 п. о. Почти во всех случаях (у 15 из 17 пациентов) достраивались нематричные нуклеотиды (от 1 до 17 п. о.). Локализация точек разрыва являлась уникальной для каждого пациента.

Таблица 1

Размер и локализация делеций Ex2–7 и Ex4–7 у пациентов с первичным В-ОЛЛ

Table 1

Size and localisation of Ex2–7 and Ex4–7 deletions in patients with primary B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL)

Номер пациента	Размер делеции, п. о.	Координаты делеции, п. о.
Делеция Ex2–7		
1	88 549	8302–96 850
2	88 153	8709–96 861
3	88 137	8713–96 849
Делеция Ex4–7		
4	50 735	46 117–96 851
5	50 740	46 116–96 855
6	50 737	46 115–96 851
7	50 741	46 115–96 855
8	50 736	46 115–96 850
9	50 735	46 114–96 848
10	50 736	46 114–96 849
11	50 739	46 114–96 851
12	50 739	46 114–96 852
13	50 743	46 111–96 853
14	50 739	46 111–96 849
15	50 752	46 109–96 860
16	50 747	46 107–96 853
17	50 747	46 104–96 850

Примечание. Координаты делеций указаны относительно референсной последовательности гена *IKZF1* (NG_034231.1).

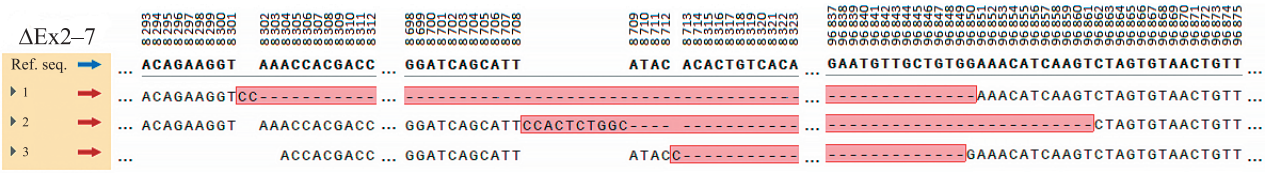


Рис. 2. Точки разрыва-соединения гена *IKZF1*
у пациентов детского возраста с В-ОЛЛ, имеющих делецию Ex2–7:
1–3 – нуклеотидные последовательности, принадлежащие пациентам 1–3.
Область делеции, включая нематричные нуклеотиды, выделена красным цветом,
координаты указаны относительно референсной последовательности
гена *IKZF1* (NG_034231.1), обозначенной как Ref. seq.

Fig. 2. Breakpoints of the *IKZF1* gene in pediatric BCP-ALL patients with Ex2–7 deletion:
1–3 – nucleotide sequences of patients 1–3. The deletion region, including non-matrix nucleotides,
is highlighted in red colour, coordinates are given relative to the reference sequence
of the *IKZF1* gene (NG_034231.1) designated Ref. seq.

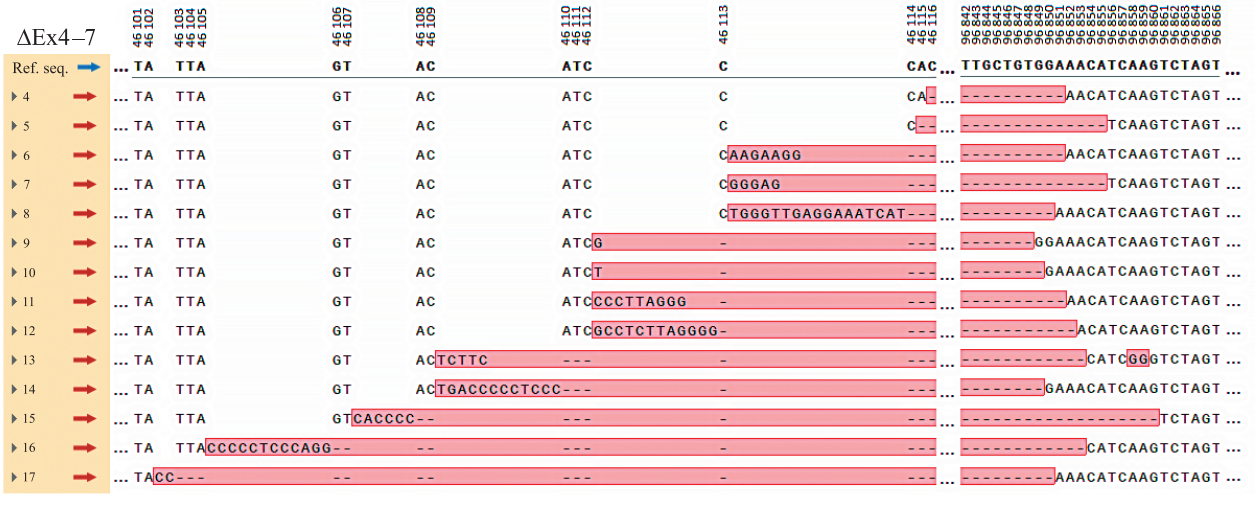


Рис. 3. Точки разрыва-соединения гена *IKZF1*
у пациентов детского возраста с В-ОЛЛ, имеющих делецию Ex4–7:
4–17 – нуклеотидные последовательности, принадлежащие пациентам 4–17.
Область делеции, включая нематричные нуклеотиды, выделена красным цветом,
координаты указаны относительно референсной последовательности
гена *IKZF1* (NG_034231.1), обозначенной как Ref. seq.

Fig. 3. Breakpoints of the *IKZF1* gene in pediatric BCP-ALL patients with Ex4–7 deletion:
4–17 – nucleotide sequences of patients 4–17. The deletion region, including non-matrix nucleotides,
is highlighted in red colour, coordinates are given relative to the reference sequence
of the *IKZF1* gene (NG_034231.1) designated Ref. seq.

Ввиду того что точки разрыва-соединения гена *IKZF1* у разных пациентов локализовались в одном диапазоне нуклеотидных последовательностей, они были проверены на наличие RSS.

Стоит отметить, что RSS представляют собой консервативные последовательности некодирующей ДНК, которые распознаются и разрезаются ферментным комплексом RAG1/RAG2 во время рекомбинации V(D)J в незрелых Т- и В-клетках. RSS фланкируют сегменты генов *V*, *D* и *J*, подвергающиеся рекомбинации в процессе формирования вариабельных областей тяжелой и легкой цепей.

Все RSS состоят из семи консервативных нуклеотидов (5′-CACAGTG-3′), за которыми следуют спейсер и консервативный нонамер (5′-ACAAAAACC-3′). Последовательность спейсера может варьировать, а его длина соответствует одному (12 ± 1 нуклеотид) или двум (23 ± 1 нуклеотид) виткам двойной спирали ДНК. Ошибки в рекомбинации V(D)J, включая расщепление RSS-подобных последовательностей, или криптических RSS (*cryptic RSS*, cRSS), вне локусов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов, связаны с онкогенными транслокациями, наблюдаемыми при некоторых лимфоидных злокачественных новообразованиях [2].

В пределах гена *IKZF1* было обнаружено 130 последовательностей cRSS-12 и 149 последовательностей cRSS-23 с оценкой показателя RIC (*recombination information content*), превышающей пороговые

значения, которые составили RIC ≥ –38,81 для cRSS-12 и RIC ≥ –58,45 для cRSS-23. Чем выше показатель RIC, тем с большей вероятностью рекомбиназа V(D)J свяжется с сайтом. Максимальное значение показателя RIC среди всех cRSS было равно –28,01 для cRSS-12 и –47,57 для cRSS-23. Основные статистические показатели (Me (Q25; Q75), где Me – медиана, а (Q25; Q75) – интерквартильный размах) для cRSS-12 и cRSS-23 составили –36,47 (–37,55; –34,53) и –56,48 (–57,84; –54,88) соответственно.

Точки разрыва-соединения у пациентов с делециями гена *IKZF1* были расположены в области cRSS – внутри сайта либо в пределах 10–35 п. о. (рис. 4, табл. 2). Распределение расстояний между сайтами cRSS (cRSS-12, cRSS-23) и точками разрыва-соединения представлено на рис. 5. При делеции Ex2–7 гена *IKZF1* точки разрыва-соединения находились в пределах cRSS-12-45 (у пациента 1), cRSS-12-1 (у пациентов 2 и 3) и cRSS-23-40, а при делеции Ex4–7 гена *IKZF1* – в пределах cRSS-12-5 и cRSS-23-40 (первое число в обозначении cRSS соответствует типу cRSS относительно длины спейсера (12 или 23 п. о.), второе число – номеру cRSS относительно величины показателя RIC (от 1 до 130 для cRSS-12 и от 1 до 149 для cRSS-23)).

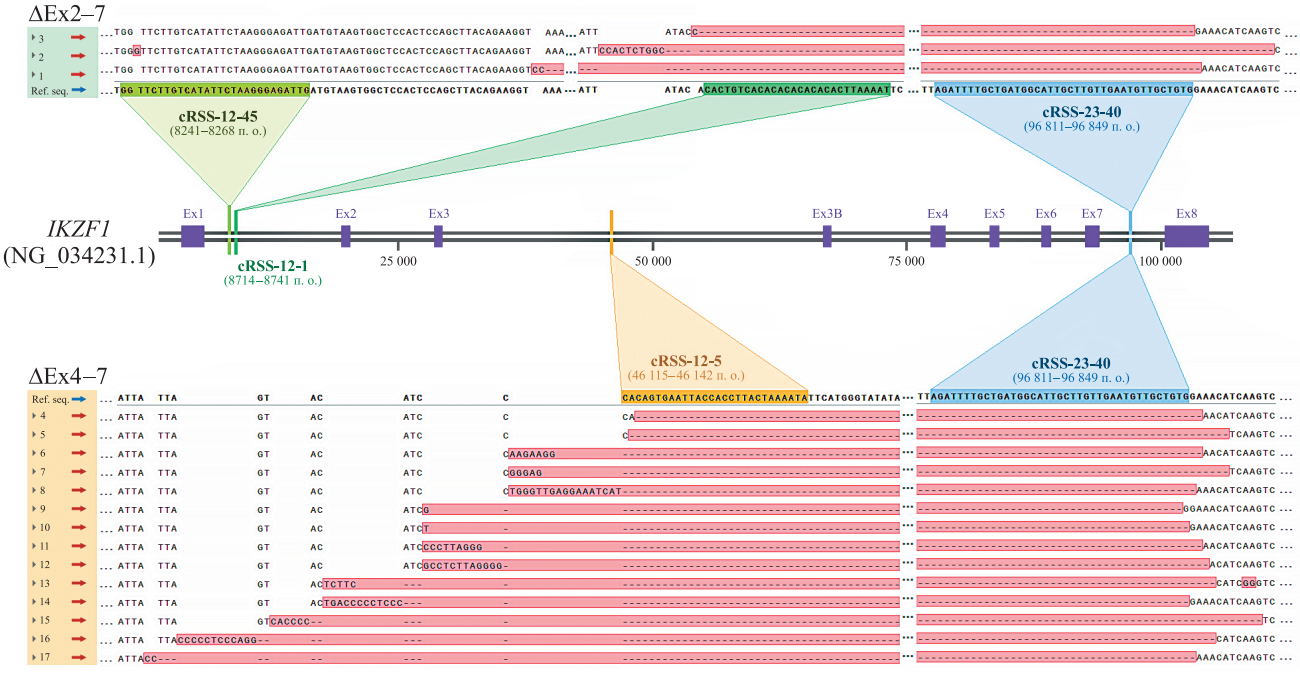


Рис. 4. cRSS в пределах точек разрыва-соединения гена *IKZF1* у пациентов с делециями Ex2–7 и Ex4–7

Fig. 4. cRSS within breakpoints of the *IKZF1* gene in patients with Ex2–7 and Ex4–7 deletions

Таблица 2

Характеристика cRSS в пределах точек разрыва-соединения гена *IKZF1*

Table 2

Characterisation of cRSS within breakpoints of the *IKZF1* gene

cRSS	Координаты, п. о.	RIC	Ориентация	Нуклеотидная последовательность
cRSS-12-45	8241–8268	–35,57	3′–5′	CAATCTCCCTTAGAATATGACAAGAACC
cRSS-12-1	8714–8741	–28,01	5′–3′	CACTGTCACACACACACACACTTAAAAT
cRSS-12-5	46 115–46 142	–30,62	5′–3′	CACAGTGAATTACCACCTTACTAAAATA
cRSS-23-40	96 811–96 849	–54,97	3′–5′	CACAGCAACATTCAACAAGCAATGCCATCAGCAAAATCT

Примечание. Координаты cRSS указаны относительно референсной последовательности гена *IKZF1* (NG_034231.1).

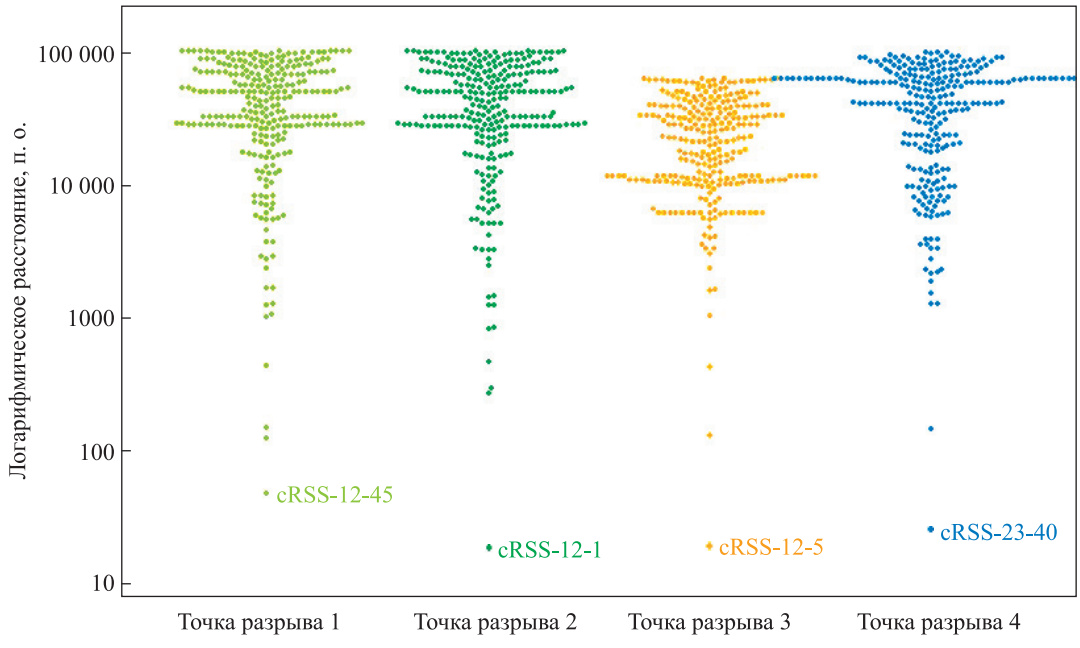


Рис. 5. Распределение расстояний между сайтами cRSS (cRSS-12, cRSS-23) и точками разрыва-соединения:
точка разрыва 1 – координаты точки разрыва-соединения для пациента 1 с делецией Ex2–7;
точка разрыва 2 – среднее значение координат точек разрыва-соединения для пациентов 2 и 3 с делецией Ex2–7;
точка разрыва 3 – среднее значение координат точек разрыва-соединения для пациентов 4–17 с делецией Ex4–7;
точка разрыва 4 – среднее значение координат точек разрыва-соединения для пациентов 1–17 с делециями Ex2–7 и Ex4–7

Fig. 5. Distribution of distances between cRSS sites (cRSS-12, cRSS-23) and breakpoints:
breakpoint 1 – breakpoint coordinates for patient 1 with Ex2–7 deletion;
breakpoint 2 – average value of breakpoint coordinates for patients 2 and 3 with Ex2–7 deletion;
breakpoint 3 – average value of breakpoint coordinates for patients 4–17 with Ex4–7 deletion;
breakpoint 4 – average value of breakpoint coordinates for patients 1–17 with Ex2–7 and Ex4–7 deletions

В норме рекомбиназа V(D)J, состоящая из белков RAG1 и RAG2, вводит двухцепочечные разрывы ДНК в месте соединения между RSS и фланкирующим сегментом гена. Затем за счет репарации ДНК разрывы на двух удаленных разрезах вновь объединяются, образуя функциональный ген посредством хромосомной перестройки. Сборка правильного состава сегментов гена определяется длиной спейсера (так называемое правило рекомбинации 12/23: рекомбинация соединяет только сегменты генов, фланкированные RSS с разной длиной спейсера (RSS-12 и RSS-23 или наоборот)). Ферментный комплекс RAG1/RAG2 чаще всего вносит разрывы в пределах 1–20 п. о. от границ RSS. Так, в нашем случае рекомбинация, предположительно, происходит между cRSS-12-5 и cRSS-23-40 (делеция Ex4–7, пациенты 4–17), между cRSS-12-45 и cRSS-23-40 (делеция Ex2–7, пациент 1) и между cRSS-12-1 и cRSS-23-40 (делеция Ex2–7, пациенты 2 и 3) согласно правилу рекомбинации 12/23. У пациента 1 точка разрыва находится на расстоянии 33 п. о. от сайта cRSS-12-45. Разрывы на таком расстоянии от сайта cRSS считаются редкими событиями, однако могут быть следствием различных нарушений в работе ферментного комплекса RAG1/RAG2.

Аберрантная рекомбинационная активность V(D)J связана с онкогенными хромосомными перестройками при лимфолейкозах и лимфомах. Механизмы транслокации остаются неясными, но, по-видимому, включают аберрантное разрезание cRSS рекомбиназой V(D)J в сайтах за пределами локусов Ig и TCR. Соединение этих разрывов потенциально приводит к возникновению делеций в лимфоцитах и лейкемической трансформации. Однако хромосомные мутации, опосредованные рекомбиназой V(D)J, остаются редкими явлениями. В настоящее время неизвестны механизмы контроля, которые предотвращают более частое участие аберрантных разрывов, обусловленных рекомбиназой V(D)J, в потенциально онкогенных хромосомных перестройках.

Экспериментальное определение *in vivo* корреляции оценки показателя RIC с уровнями RAG-опосредованного расщепления и активности рекомбинации V(D)J показывает, что оценка показателя RIC может быть некорректной из-за влияния структуры хроматина на распознавание функциональности RSS. Но на данный момент это не включено в оценку показателя RIC, что может объяснить причину разрывов между cRSS с немаксимальными значениями показателя RIC.

Заключение

Посредством альтернативного сплайсинга с гена *IKZF1* кодируется как минимум 13 различных изоформ белка, которые образуют димеры и мультимеры, регулируя экспрессию генов и ремоделирование хроматина. Реализация белка Ikaros в клетке зависит от количества и типа изоформ, так как они обладают разными свойствами. К сверхэкспрессии нефункциональных коротких (доминантно-негативных) изоформ белка Ikaros могут приводить делеции нескольких экзонов (встречаются чаще) и аберрантный сплайсинг.

В настоящем исследовании установлены и проанализированы точки разрыва-соединения гена *IKZF1* для 17 пациентов детского возраста с делециями Ex2–7 и Ex4–7. При делеции Ex4–7 точки разрыва гена *IKZF1* располагались в 3-м и 7-м интронах (их общий разброс составил 14 п. о.) и являлись уникальными для каждого пациента. В место разрыва достраивались нематричные нуклеотиды. При делеции Ex2–7 точки разрыва-соединения находились в 1-м и 7-м интронах (их общий разброс составил 4–400 п. о.) и также были уникальными для каждого пациента. Низкий разброс точек разрыва-соединения ДНК при делециях Ex2–7 и Ex4–7 можно объяснить расположением в этих локусах последовательностей, между которыми происходит ошибочная RSS-рекомбинация при V(D)J-реаранжировке про-В-клеток из-за аберрантной активности ферментного комплекса RAG1/RAG2. У 14 пациентов с делецией Ex4–7 точки разрыва находились в пределах сайтов cRSS-12-5 и cRSS-23-40, у 2 пациентов с делецией Ex2–7 – вблизи сайтов cRSS-12-1 и cRSS-23-40, у 1 пациента с делецией Ex2–7 – вблизи сайтов cRSS-12-45 и cRSS-23-40.

На основании полученных данных были уточнены текущие знания о внутригенных делециях гена *IKZF1*, представлены точки разрыва-соединения при делециях Ex2–7 и Ex4–7 для 17 пациентов детского возраста с В-ОЛЛ. Приведенные результаты помогут расширить понимание механизмов, приводящих к дисфункции белка Ikaros, что, в свою очередь, позволит другим исследователям более точно определять наличие аберраций гена *IKZF1* в клинической практике.

Библиографические ссылки

1. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2020;105(11):2524–2539. DOI: 10.3324/haematol.2020.247031.

2. Bhojwani D, Yang JJ, Pui C-H. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Clinics of North America.* 2015; 62(1):47–60. DOI: 10.1016/j.pcl.2014.09.004.

3. Mullighan CG. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in Hematology.* 2013;50(4): 314–324. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2013.10.001.

4. Vairy S, Tran TH. *IKZF1* alterations in acute lymphoblastic leukemia: the good, the bad and the ugly. *Blood Reviews.* 2020; 44:100677. DOI: 10.1016/j.blre.2020.100677.

5. Stanulla M, Cavé H, Moorman AV. *IKZF1* deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia: still a poor prognostic marker? *Blood.* 2020;135(4):252–260. DOI: 10.1182/blood.2019000813.

6. Iacobucci I, Kimura S, Mullighan CG. Biologic and therapeutic implications of genomic alterations in acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Medicine.* 2021;10(17):3792. DOI: 10.3390/jcm10173792.

7. Klco JM, Mullighan CG. Advances in germline predisposition to acute leukaemias and myeloid neoplasms. *Nature Reviews Cancer.* 2021;21(2):122–137. DOI: 10.1038/s41568-020-00315-z.

8. Vshyukova VS, Krasko OV, Yanchanka DA, Meleshko AN. Aberrant *IKZF1* gene as relapse predictor in standard-risk pediatric patients with B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *International Journal of Laboratory Hematology.* 2022;44(4):769–776. DOI: 10.1111/ijlh.13853.

9. Olsson L, Johansson B. Ikaros and leukaemia. *British Journal of Haematology.* 2015;169(4):479–491. DOI: 10.1111/bjh.13342.

10. Vshivkova VS, Meleshko AN. The role of Ikaros transcriptional factor in normal hematopoiesis and leukemogenesis: biological and clinical aspects. *Advances in Molecular Oncology.* 2015;2(1):13–26. Russian. DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.013-026.

11. Yadav V, Ganesan P, Veeramani R, Dinesh Kumar V. Philadelphia-like acute lymphoblastic leukemia: a systematic review. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia.* 2021;21(1):e57–e65. DOI: 10.1016/j.clml.2020.08.011.

12. Xia R, Cheng Y, Han X, Wei Y, Wei X. Ikaros proteins in tumor: current perspectives and new developments. *Frontiers in Molecular Biosciences.* 2021;8:788440. DOI: 10.3389/fmolb.2021.788440.

13. Affar M, Bottardi S, Quansah N, Lemarié M, Ramón AC, Affar EB, et al. Ikaros: from chromatin organization to transcriptional elongation control. *Cell Death & Differentiation* [Internet]. 2023 August 24 [cited 2024 March 17]. Available from: https://www.nature.com/articles/s41418-023-01212-2. Epub ahead of print. DOI: 10.1038/s41418-023-01212-2.

14. Wang Y, Cheng W, Zhang Yv, Zhang Yu, Sun T, Zhu Y, et al. Identification of *IKZF1* genetic mutations as new molecular subtypes in acute myeloid leukaemia. *Clinical and Translational Medicine.* 2023;13(6):e1309. DOI: 10.1002/ctm2.1309.

15. Merelli I, Guffanti A, Fabbri M, Cocito A, Furia L, Grazini U, et al. RSSsite: a reference database and prediction tool for the identification of cryptic recombination signal sequences in human and murine genomes. *Nucleic Acids Research.* 2010;38(supplement 2): W262–W267. DOI: 10.1093/nar/gkq391.

Получена 25.03.2024 / исправлена 19.07.2024 / принята 30.07.2024.
Received 25.03.2024 / revised 19.07.2024 / accepted 30.07.2024.

УДК 634.11:632.25

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *ERWINIA AMYLOVORA*, МУТАНТНЫХ ПО ГЕНУ *bssS*

***К. Ю. ПЕСОЦКАЯ*[1)], *А. Л. ЛАГОНЕНКО*[2)], *А. Н. ЕВТУШЕНКОВ*[1)]**

[1)]*Белорусский государственный университет,*
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь
[2)]*Альгимед Техно, Логойский тракт, 22/1, 220090, г. Минск, Беларусь*

Аннотация. Изучено влияние делеции гена белка BssS, предположительно вовлеченного в формирование биопленок, на продукцию факторов вирулентности фитопатогенными бактериями *Erwinia amylovora*. По сравнению с клетками дикого типа клетки бактерий *E. amylovora*, мутантные по гену регулятора BssS, характеризовались сниженными подвижностью и интенсивностью образования биопленок на питательных средах без глюкозы, при этом в присутствии глюкозы способность клеток делеционного мутанта к передвижению и формированию биопленок возрастала. Показано, что клетки мутантного штамма обладали повышенной чувствительностью к красителю генциановому фиолетовому.

Ключевые слова: *Erwinia amylovora*; регулятор BssS; подвижность клеток; формирование биопленок; краситель генциановый фиолетовый; делеция.

PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF *bssS* MUTANT OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA *ERWINIA AMYLOVORA*

***K. Yu. PESOTSKAYA*[a], *A. L. LAGONENKO*[b], *A. N. EVTUSHENKOV*[a]**

[a]*Belarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*
[b]*Algimed Techno, 22/1 Lagojski Tract, Minsk 220090, Belarus*

Corresponding author: A. L. Lagonenko (lagonenkoal@mail.ru)

Abstract. In this study we examined the effect of *bssS* gene deletion, presumably involved in biofilm formation, on virulence factors productions in *Erwinia amylovora*. Compared to wild-type cells, *E. amylovora* E2 Δ*bssS* cells were characterised by reduced motility and biofilm formation on growth media without glucose. However, in the presence of glucose, the ability of deletion mutant cells to move and form biofilms was increased. In addition, it was shown that the cells of the mutant strain had increased sensitivity to the gentian violet dye.

Keywords: *Erwinia amylovora*; BssS regulator; cell motility; biofilm formation; gentian violet dye; deletion.

Образец цитирования:
Песоцкая КЮ, Лагоненко АЛ, Евтушенков АН. Фенотипическая характеристика фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora*, мутантных по гену *bssS*. *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2024;3:59–68.
EDN: DXGFNP

For citation:
Pesotskaya KYu, Lagonenko AL, Evtushenkov AN. Phenotypic characteristics of *bssS* mutant of phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora*. *Experimental Biology and Biotechnology.* 2024; 3:59–68. Russian.
EDN: DXGFNP

Авторы:
Карина Юрьевна Песоцкая – ассистент кафедры молекулярной биологии биологического факультета.
Александр Леонидович Лагоненко – кандидат биологических наук, доцент; руководитель группы по технологии генетической и белковой инженерии.
Анатолий Николаевич Евтушенков – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

Authors:
Karina Yu. Pesotskaya, assistant at the department of molecular biology, faculty of biology.
karina345678@mail.ru
https://orcid.org/0009-0004-6475-0115
Alexander L. Lagonenko, PhD (biology), docent; head of the genetic and protein group.
lagonenkoal@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-7939-0659
Anatoli N. Evtushenkov, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of molecular biology, faculty of biology.
evtushenkov@bsu.by
https://orcid.org/0000-0002-2755-6979

CC BY NC

Введение

Среди бактериозов плодовых деревьев выделяют бактериальный ожог плодовых культур – одно из наиболее вредоносных заболеваний растений семейства Rosaceae, вызываемое грамотрицательной бактерией *Erwinia amylovora*. В международной терминологии данный бактериоз получил название «fire blight» по одному из основных признаков заболевания: зараженное дерево напоминает обожженное пожаром растение. Ущерб, наносимый бактериальным ожогом плодовых культур, выражается как в повсеместном снижении урожайности, так и в гибели пораженных растений. Основными и наиболее экономически значимыми хозяевами фитопатогена *E. amylovora* являются дикорастущие и культурные растения из подсемейства Maloideae семейства Rosaceae – яблоня, груша, мушмула, айва [1].

Для большинства видов микроорганизмов описано существование в планктонном состоянии, при котором клетки свободно передвигаются в окружающей среде. Однако на сегодняшний момент установлено, что многие бактерии существуют не в виде свободноживущих клеток, а в виде биопленок [2]. Биопленка представляет собой сообщество микроорганизмов, клетки которых прикреплены к какой-либо биотической и (или) абиотической поверхности и погружены в биополимерный матрикс [3]. Матрикс является продуктом жизнедеятельности самих бактериальных клеток и состоит из белков, липидов, внеклеточной ДНК и РНК, гомо- и гетерополисахаридов [2; 4]. Эти компоненты биопленки способствуют ее прикреплению к субстрату, а также защищают клетки бактерий от иммунного ответа хозяина и пагубных воздействий окружающей среды. Кроме того, внеклеточный матрикс позволяет удерживать бактериальные клетки в непосредственной близости друг от друга, тем самым обеспечивая межклеточные коммуникации у микроорганизмов (так называемое чувство кворума) и облегчая обмен генетическим материалом путем горизонтального переноса генов [4; 5]. Для фитопатогенных бактерий образование биопленок является ключевым этапом успешной колонизации организма хозяина [3].

Регуляция процессов формирования биопленок весьма сложна и до конца не изучена. Известна роль вторичного посредника – циклического дигуанилатмонофосфата – в генетической регуляции образования биопленок у некоторых фитопатогенных бактерий (например, *E. amylovora*, *Dickeya dadantii*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris*, *Xylella fastidiosa*). Показано, что небольшие регуляторные РНК и РНК-связывающие белки (например, RsmA) также вовлечены в регуляцию процессов формирования биопленок у бактерий *E. amylovora*, *X. campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae* [3]. У бактерий *Escherichia coli* были выявлены два белка, принимающих участие в регуляции образования биопленок, – BssR (ранее YliH) и BssS (ранее YceP) [6]. Регулятор BssS (*regulator of biofilm through signal secretion*) обнаружен у многих грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *S. enterica* serovar Enteritidis, *Pectobacterium atrosepticum*, *Klebsiella pneumonia*) [7–10]. Функция белка BssS остается невыясненной, хотя в некоторых исследованиях показано, что он принимает участие в формировании биопленок и регуляции подвижности бактериальных клеток [6; 9; 10].

Целью данной работы являлась фенотипическая и фитопатологическая характеристика штамма бактерий *E. amylovora*, мутантного по гену регулятора BssS.

Материалы и методы исследования

Использованные в исследовании штаммы бактерий, плазмиды и праймеры приведены в табл. 1 и 2. Бактерии выращивались при температуре 28 °С в полноценной питательной среде LB и синтетической минимальной среде М9 с добавлением глицерина (2 мл/л) или глюкозы (4 г/л) в качестве источника углерода. Выбор источников углерода основывался на предполагаемом влиянии глюкозы на фенотипическое проявление мутации по гену *bssS*. Состав среды LB (г/л): пептон – 10,0; дрожжевой экстракт – 5,0; NaCl – 8,5. Состав среды М9 (г/л): $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ – 12,8; KH_2PO_4 – 3,0; NH_4Cl – 1,0; NaCl – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,246; $CaCl_2$ – 0,011 [11].

Таблица 1

Использованные в работе штаммы бактерий и плазмиды

Table 1

Bacterial strains and plasmids used in this study

Штамм или плазмида	Характеристика	Источник
Штаммы бактерий		
E. amylovora E2	Штамм дикого типа, выделенный из тканей растений *Malus* sp. в Беларуси в 2007 г.	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E. amylovora E2 Δ*bssS*	Δ*bssS*-мутант, Km^R	Данная работа

Окончание табл. 1
Ending of the table 1

Штамм или плазмида	Характеристика	Источник
Плазмиды		
pKD46	Ap^R, P_{BAD}, gam, bet, exo, pSC101, oriTS	[12]
pKD13	Km^R, FRT, cat, FRT, PS1, PS2, oriR6K, rgbN	[12]

Примечание. Km^R и Ap^R – устойчивость к канамицину и ампициллину соответственно.

Таблица 2

Использованные в работе праймеры

Table 2

Primers used in this study

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5′–3′)	Назначение
BssF	ATCGGTTGATTAATGCTTCTTGTAGTCGCGATCCAGGTAG CCGGTCGCTTGCGATTGTGTAGGCTGGAGCT	Внесение делеции в ген *bssS*, детекция делеции гена *bssS*
BssR	TGCCGCGCCAGACGTTAAACCCTGCGCGCTAATAGAACT GCTGTTATAATATTCCGGGGATCCGTCGACC	
Km1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	Детекция делеции гена *bssS* [12]
Km2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	

Поиск в базах данных последовательностей, гомологичных последовательности гена *bssS* в геноме штамма *E. amylovora* E2 (код доступа в базе данных GenBank – NZ_CP024970.1), осуществлялся с помощью пакета программ *BLAST* [13].

Для получения делеционного мутанта бактерий *E. amylovora* по гену *bssS* был использован метод «PCR-based one-step inactivation of chromosomal genes», предложенный К. А. Даценко и Б. Л. Воннером [12].

Проверка вирулентности полученного делеционного мутанта проводилась на незрелых плодах груши по стандартной схеме [14]. Количество бактерий в растительном материале определялось по методике, описанной в работе [15]. Растительная ткань (300 мг) гомогенизировалась в 1 мл физиологического раствора. Высев бактерий осуществлялся на поверхность 1,5 % полноценной агаризованной среды на 4-е и 6-е сутки после инокуляции.

Количественная оценка интенсивности формирования биопленок проводилась методом, изложенным в работе [16], с некоторыми модификациями. Ночная культура бактерий *E. amylovora* разводилась средой инкубации (синтетической минимальной средой M9) до оптической плотности 0,05. Полученные суспензии вносились в лунки стерильного 96-луночного планшета и инкубировались при температуре 28 °C в течение 48 или 72 ч (в зависимости от длительности эксперимента). По завершении инкубации измерялась оптическая плотность культуры клеток в каждой из лунок, после чего суспензия клеток удалялась из лунок. Для окрашивания клеток биопленки лунки заполнялись равным объемом раствора красителя генцианового фиолетового (1 %). После удаления красителя в лунки планшета вносился равный объем 96 % этанола, а затем определялась оптическая плотность раствора при длине волны 595 нм. Полученные значения нормализовались по ранее измеренной оптической плотности культур, и эти данные представлялись как конечный результат.

Подвижность клеток бактерий *E. amylovora* изучалась с использованием синтетической минимальной полужидкой агаризованной (0,3 %) среды M9. Суспензия бактериальных клеток объемом 10 мкл наносилась на поверхность агаризованной среды. Диаметр макроколонии бактерий учитывался через 24; 48 и 72 ч инкубации при температуре 28 °C [15].

Влияние красителя генцианового фиолетового на выживаемость клеток исследуемых штаммов бактерий *E. amylovora* оценивалось по количеству колоний микроорганизмов, выросших на питательном агаре, содержащем генциановый фиолетовый в соответствующей концентрации, по сравнению с контролем (высев на такую же среду без красителя). Количество колониеобразующих единиц определялось методом спот-тестирования [17].

Статистическая обработка результатов выполнялась в программе *GraphPad Prism* (версия 8.0). Каждый эксперимент проводился в 5–8-кратной повторности. Для проверки отклонения от нормального распределения применялся обладающий наибольшей мощностью тест Шапиро – Уилка. В случае выявления нормального распределения оценка достоверности различий проводилась с помощью *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок в модификации Уэлча (сравнение средних арифметических величин без какого-либо предположения о равенстве дисперсий). При выявлении распределения, отличного от нормального, для оценки достоверности различий использовался *U*-критерий Манна – Уитни. Планки погрешностей демонстрируют стандартную ошибку среднего значения. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Биоинформатический анализ генома штамма *E. amylovora* E2 позволил выявить ген, кодирующий регулятор BssS. В геноме возбудителя бактериального ожога плодовых культур ген *bssS* локализован на участке хромосомы с 1 552 751 по 1 553 005 пар нуклеотидов (п. н.) (рис. 1).

Для инактивации гена *bssS* были сконструированы праймеры BssF и BssR к гену устойчивости к канамицину в составе плазмиды pKD13, несущие на 5′-конце последовательности (50 нуклеотидов), соответствующие началу или концу делетируемой области генома бактерий *E. amylovora* (участок хромосомы с 1 552 742 по 1 553 141 п. н.) (см. табл. 2). Клетки штамма *E. amylovora* E2, содержащие хелперную плазмиду pKD46 и выращенные в условиях индукции рекомбиназы бактериофага λ, были трансформированы полученным с помощью таких праймеров ПЦР-продуктом. В результате проделанной работы отобран штамм, устойчивый к канамицину. Наличие делеции гена *bssS* подтверждено ПЦР с праймерами BssF и BssR к областям, фланкирующим делецию (участки хромосомы с 1 552 742 по 1 552 791 п. н. и с 1 553 092 по 1 553 141 п. н.), а также с внутренними праймерами Km1 и Km2 к гену устойчивости к канамицину (см. табл. 2, рис. 2).

Как видно из приведенных данных, в реакции с использованием праймеров BssF и BssR был получен ПЦР-продукт размером около 1420 п. н., в реакции с использованием праймеров BssF и Km2 – ПЦР-продукт размером 770 п. н., а в реакции с использованием праймеров BssR и Km1 – ПЦР-продукт размером 550 п. н., что соответствует ожидаемому результату.

Далее была осуществлена фенотипическая и фитопатологическая характеристика полученного мутантного штамма.

На первом этапе работы проведена оценка вирулентности делеционного мутанта бактерий *E. amylovora*. Как видно из рис. 3, при искусственном заражении незрелых плодов груши способность клеток делеционного мутанта вызывать симптомы бактериального ожога не отличалась от таковой клеток штамма дикого типа. Численность клеток штамма дикого типа и мутантного штамма бактерий *E. amylovora* спустя 0; 4 и 6 сут после инокуляции также оставалась сравнительно одинаковой (табл. 3). Из приведенных данных следует, что отсутствие в клетках регулятора BssS не сказывается на плотности популяции фитопатогена в пораженных тканях растения-хозяина.

Таблица 3

Численность жизнеспособных клеток штаммов *E. amylovora* E2 и *E. amylovora* E2 Δ*bssS* в растительной ткани

Table 3

The number of viable *E. amylovora* E2 and *E. amylovora* E2 Δ*bssS* cells in plant tissue

Время, прошедшее после инокуляции, сут	Количество жизнеспособных клеток (в пересчете на 1 г зараженной ткани)	
	E. amylovora E2	*E. amylovora* E2 Δ*bssS*
0	5,74 ± 0,03	5,65 ± 0,02
4	9,87 ± 0,08	9,98 ± 0,03
6	9,99 ± 0,03	10,10 ± 0,05

Примечание. Данные представлены как средняя арифметическая величина ± стандартная ошибка среднего значения.

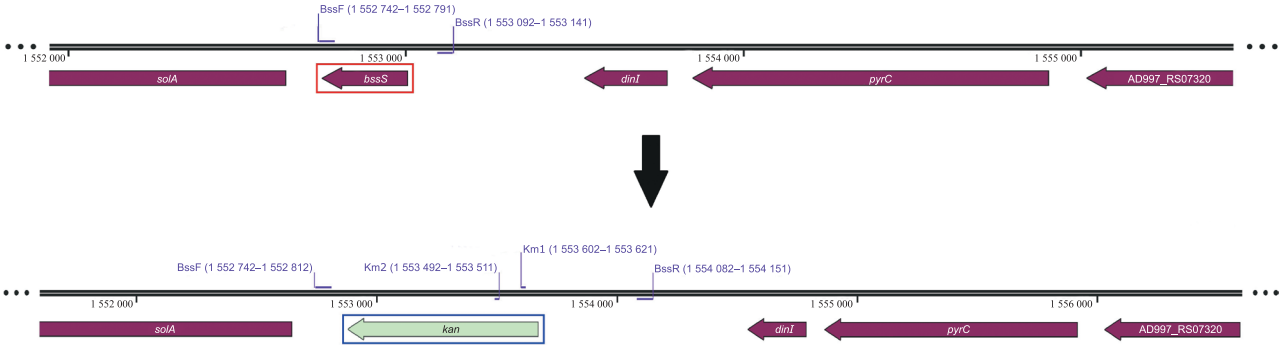


Рис. 1. Структура участка хромосомы штамма *E. amylovora* E2, содержащего ген *bssS* (обозначен рамкой красного цвета). В результате мутагенеза с использованием метода «PCR-based one-step inactivation of chromosomal genes» ген *bssS* был замещен на ген устойчивости к канамицину *kan* (обозначен рамкой синего цвета). Фиолетовым цветом отмечены места посадки использованных праймеров. Изображение получено с помощью программы *SnapGene* (*GSL Biotech, LLC*, США)

Fig. 1. Structure of *E. amylovora* E2 strain chromosome segment, containing *bssS* gene (highlighted in red colour). As the result of mutagenesis using the PCR-based one-step inactivation of chromosomal genes method, the *bssS* gene was replaced by the *kan* kanamycin resistance gene (highlighted in blue colour). Primer locations used in the study are indicated in purple colour. Image was created using *SnapGene* software (*GSL Biotech, LLC*, USA)

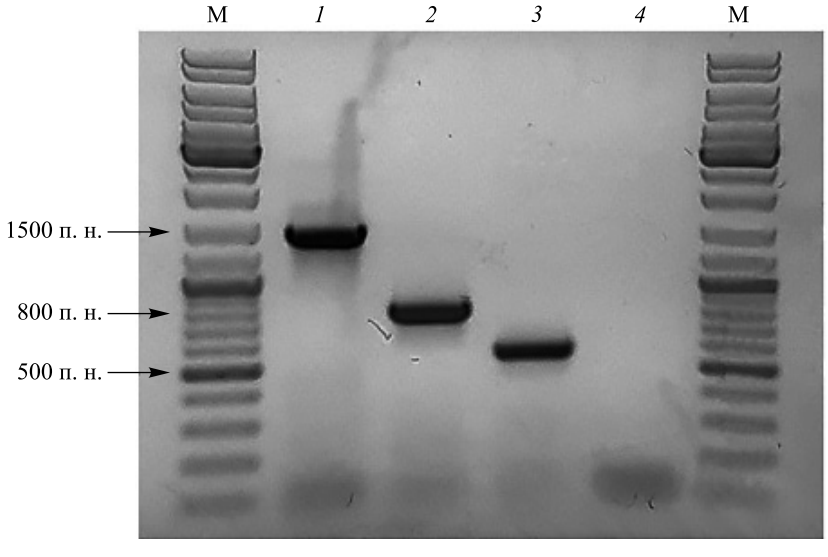


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК штамма *E. amylovora* E2 Δ*bssS* в целях подтверждения делеции гена *bssS*: M – маркер молекулярной массы GeneRuler DNA Ladder Mix (100–10 000 пар оснований; *Thermo Scientific*, США); *1* – амплифицированный фрагмент ДНК штамма *E. amylovora* E2 Δ*bssS*, полученный с использованием праймеров BssF и BssR; *2* – амплифицированный фрагмент ДНК штамма *E. amylovora* E2 Δ*bssS*, полученный с помощью праймеров BssF и Km2; *3* – амплифицированный фрагмент ДНК штамма *E. amylovora* E2 Δ*bssS*, полученный с использованием праймеров BssR и Km1; *4* – отрицательный контроль реакции без матричной ДНК

Fig. 2. Electropherogram of PCR products amplified from *E. amylovora* E2 Δ*bssS* genomic DNA to confirm deletion of the *bssS* gene: M – molecular weight marker GeneRuler DNA Ladder Mix (100–10 000 base pairs; *Thermo Scientific*, USA); *1* – amplified DNA fragment of *E. amylovora* E2 Δ*bssS* strain, obtained using primers BssF and BssR; *2* – amplified DNA fragment of *E. amylovora* E2 Δ*bssS* strain, obtained using primers BssF and Km2; *3* – amplified DNA fragment of *E. amylovora* E2 Δ*bssS* strain, obtained using primers BssR and Km1; *4* – negative control without DNA matrix

Рис. 3. Симптомы бактериального ожога на плодах груши при искусственном заражении клетками штаммов *E. amylovora* E2 и *E. amylovora* E2 Δ*bssS*

Fig. 3. Symptoms of fire blight on immature pear fruits caused by *E. amylovora* E2 and *E. amylovora* E2 Δ*bssS* cells

Экзополисахариды, синтезируемые клетками бактерий *E. amylovora*, традиционно рассматриваются как факторы вирулентности данного фитопатогена, предоставляющие ему возможность успешно колонизировать сосуды ксилемы растений-хозяев, а также обеспечивающие прочную адгезию бактериальных клеток на колонизируемой поверхности, что позволяет им оставаться неподвижными. Наряду с липополисахаридами экзополисахариды входят в состав матрикса биопленок бактерий *E. amylovora* [18]. Формируемая клетками биопленка предохраняет их от стрессовых воздействий и также рассматривается как фактор вирулентности фитопатогена. Проведенные эксперименты по изучению образования биопленок в минимальной среде М9 выявили, что уровень их формирования клетками штамма *E. amylovora* Е2 Δ*bssS* был достоверно ниже контрольных значений спустя 48 ч инкубации на среде с глицерином в качестве единственного источника углерода (рис. 4, *а*). В исследовании [6] было установлено, что присутствие глюкозы в среде культивирования вызывает достоверное увеличение интенсивности образования биопленок у штамма *E. coli* K-12 Δ*bssS*. Сходные данные получены нами для штамма *E. amylovora* Е2 Δ*bssS*. При культивировании клеток делеционного мутанта на минимальной среде М9 с глюкозой в качестве источника углерода через 48 и 72 ч инкубации уровень формирования биопленок оказался соответственно в 3,0 и 2,8 раза выше по сравнению с таковым у штамма дикого типа (рис. 4, *б*). Выявленные эффекты, вероятно, связаны с катаболитной репрессией у бактерий *E. amylovora*, однако это требует дальнейшего изучения. У бактерий *E. coli* в данный процесс вовлечен активный комплекс циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) и белка – активатора катаболитной репрессии (*cAMP receptor protein*, CRP). Наличие глюкозы в среде культивирования препятствует активации мембранно-связанной аденилатциклазы, что снижает концентрацию цАМФ в бактериальной клетке и подавляет экспрессию белка CRP. В отсутствие глюкозы концентрация цАМФ повышается, что позволяет ему связаться с регулятором CRP. В результате образовавшийся комплекс цАМФ – CRP регулирует транскрипцию генов путем связывания с их промоторными областями [6].

В формировании биопленок важную роль играет подвижность бактериальных клеток. Поверхностные структуры бактериальных клеток, такие как жгутики, фимбрии, пили, отвечают за их необратимое прикрепление к различным субстратам. Показано, что снижение подвижности клеток влечет за собой увеличение интенсивности образования биопленок [2], поэтому на следующем этапе работы было исследовано влияние делеции гена *bssS* на подвижность клеток бактерий *E. amylovora*. В результате выявлено, что диаметр макроколонии, образуемой клетками штамма *E. amylovora* Е2 Δ*bssS* в течение всего времени инкубации на минимальной среде М9 с глицерином, достоверно не отличался от значений данного показателя, полученных для штамма *E. amylovora* Е2 (рис. 5, *а* и *б*). В исследовании [6] установлено, что делеционный мутант *E. coli* K-12 Δ*bssS* характеризовался увеличенным диаметром макроколонии по сравнению со штаммом дикого типа. Выращивание клеток мутантного штамма бактерий *E. amylovora* на минимальной среде М9 с глюкозой в качестве источника углерода привело к увеличению диаметра образуемой им макроколонии по сравнению с контролем на протяжении всего времени инкубации (рис. 5, *в* и *г*). Отмеченный эффект также может быть связан с катаболитной репрессией у бактерий *E. amylovora*, однако это требует дальнейшего изучения.

В работе [19] было выявлено антибактериальное действие красителя генцианового фиолетового на ряд микроорганизмов (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*), возрастающее с увеличением значения pH среды культивирования. Такой эффект авторы объясняют ростом отрицательного заряда на поверхности бактериальных клеток, что приводит к повышению их чувствительности к красителю. Также известно, что у бактерий *E. coli* генциановый фиолетовый адсорбируется на поверхности клеток, но не транспортируется в цитоплазму. В то же время при воздействии генцианового фиолетового на мутантные штаммы бактерий *E. coli* с измененной наружной мембраной он обнаруживается в рибосомальной фракции бактериальных клеток, что, вероятно, приводит к менее эффективному участию рибосом в синтезе белка и, соответственно, объясняет токсичность красителя. Предполагается, что наружная бактериальная мембрана (в частности, такие ее компоненты, как липополисахариды, фосфолипиды и некоторые белки), а также муреин клеточной стенки являются барьером для проникновения красителя внутрь клеток [20]. В нашем эксперименте по изучению влияния генцианового фиолетового на выживаемость клеток штамма *E. amylovora* Е2 Δ*bssS* было выявлено, что краситель в концентрациях 20 и 30 мкг/мл снижает выживаемость клеток мутантного штамма в 2,6 и 2,8 раза соответственно по сравнению с выживаемостью клеток штамма дикого типа (рис. 6). В связи с полученными данными можно выдвинуть предположение о том, что делеция гена *bssS* привела к увеличению проницаемости наружной мембраны мутантного штамма бактерий *E. amylovora*, однако для подтверждения этой гипотезы требуется провести дополнительные эксперименты.

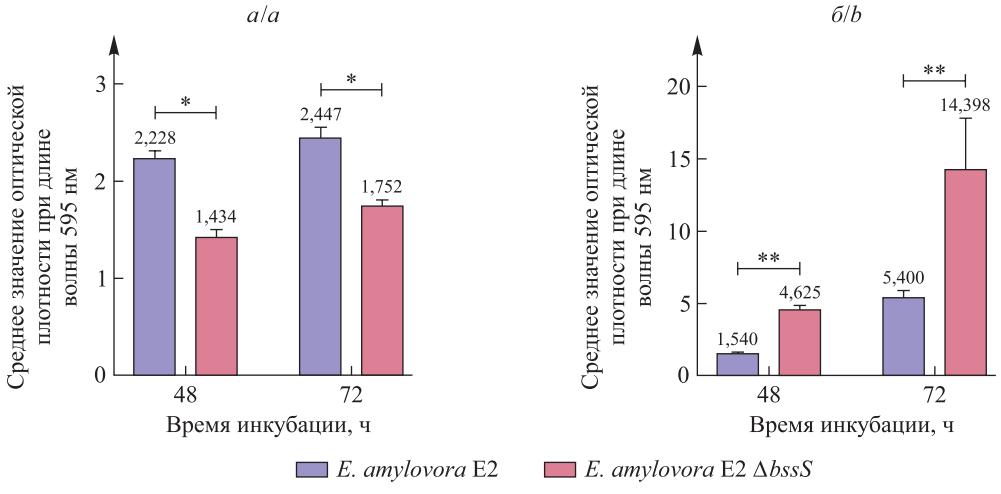


Рис. 4. Интенсивность формирования биопленок *in vitro* клетками штаммов *E. amylovora* E2 и *E. amylovora* E2 Δ*bssS* в минимальной среде M9, содержащей глицерин (*а*) или глюкозу (*б*) в качестве источника углерода (*U*-критерий Манна – Уитни). Знаком * отмечены достоверные различия при $p < 0{,}01$, а знаком ** – достоверные различия при $p < 0{,}001$

Fig. 4. Quantification of *in vitro* biofilm production for *E. amylovora* E2 and *E. amylovora* E2 Δ*bssS* cells in M9 minimal medium containing glycerol (*a*) or glucose (*b*) as a carbon source (Mann – Whitney *U*-test). The sign * indicates significant differences at $p < 0.01$, and the sign ** indicates significant differences at $p < 0.001$

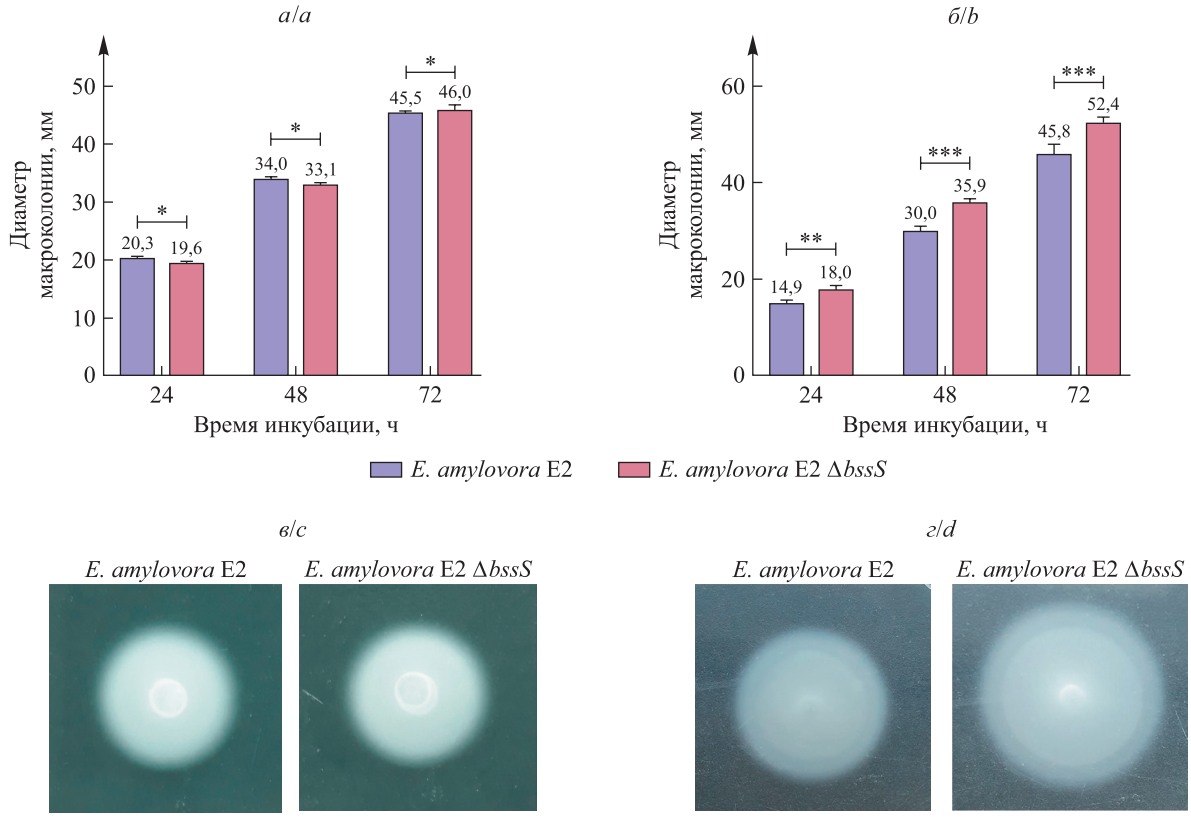


Рис. 5. Подвижность клеток штаммов *E. amylovora* E2 и *E. amylovora* E2 Δ*bssS* на минимальной среде M9, содержащей глицерин (*а*) или глюкозу (*б*) в качестве источника углерода (*U*-критерий Манна – Уитни). Знаком * обозначено отсутствие достоверных различий ($p > 0{,}05$), знаком ** отмечены достоверные различия при $p < 0{,}01$, а знаком *** – достоверные различия при $p < 0{,}001$. Фотографии бактериальных макроколоний спустя 48 ч инкубации при температуре 28 °C на минимальной среде M9 с добавлением глицерина (*в*) или глюкозы (*г*)

Fig. 5. Swimming motility for *E. amylovora* E2 and *E. amylovora* E2 Δ*bssS* cells in M9 minimal medium containing glycerol (*a*) or glucose (*b*) as a carbon source (Mann – Whitney *U*-test). The sign * indicates the absence of significant differences ($p > 0.05$), the sign ** indicates significant differences at $p < 0.01$, and the sign *** indicates significant differences at $p < 0.001$. Macrocolonies of *E. amylovora* E2 and *E. amylovora* E2 Δ*bssS* strains on the plate containing M9 minimal medium with glycerol (*c*) or glucose (*d*). Photographs were taken 48 h after inoculation at a temperature of 28 °C

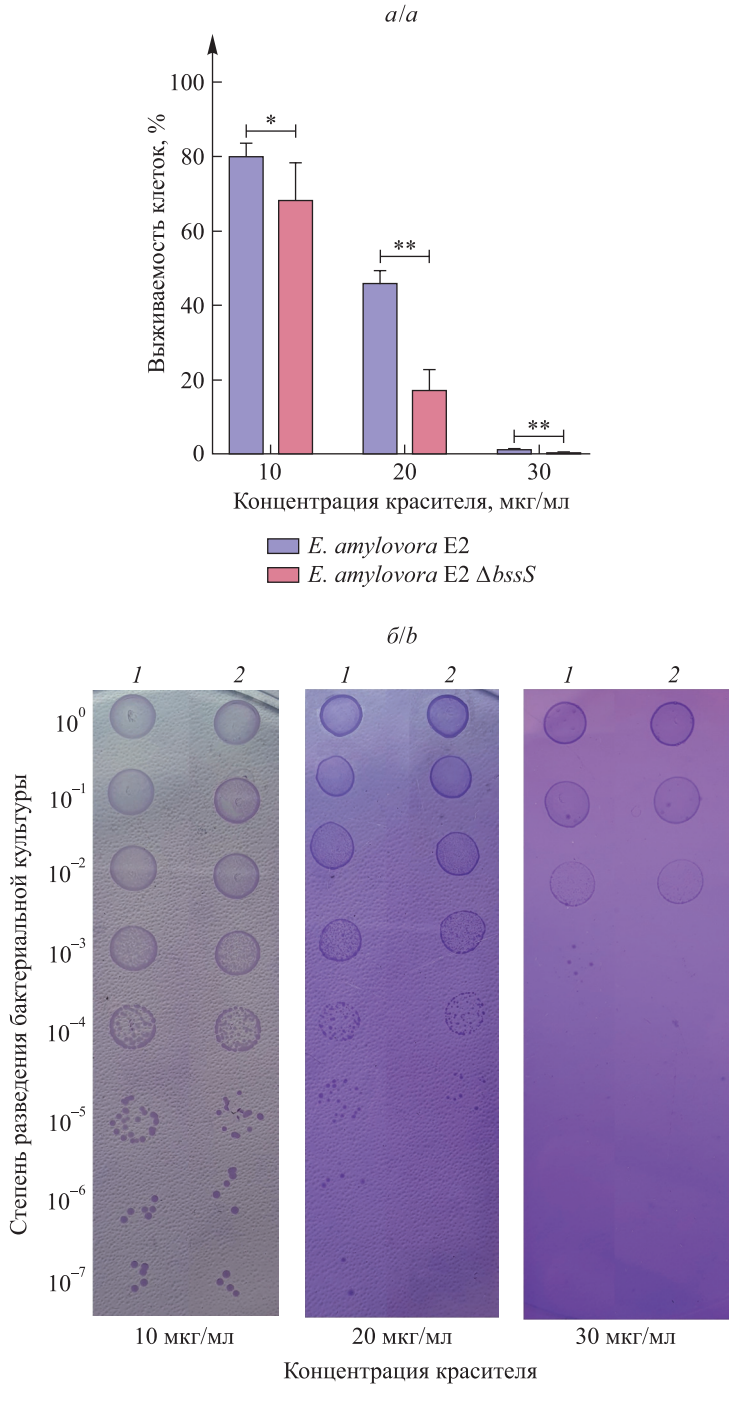


Рис. 6. Выживаемость клеток штаммов *E. amylovora* E2 и *E. amylovora* E2 Δ*bssS* при их обработке красителем генциановым фиолетовым в соответствующей концентрации (*t*-критерий Стьюдента в модификации Уэлча) (*а*). Знаком * обозначено отсутствие достоверных различий ($p > 0{,}05$), а знаком ** отмечены достоверные различия при $p < 0{,}01$. Колонии бактерий *E. amylovora* E2 и *E. amylovora* E2 Δ*bssS* на среде с красителем генциановым фиолетовым, полученные методом спот-тестирования (*б*)

Fig. 6. Survival of *E. amylovora* E2 and *E. amylovora* E2 Δ*bssS* cells in the presence of gentian violet dye in appropriate concentrations (Student's *t*-test with Welch's correction) (*a*). The sign * indicates the absence of significant differences ($p > 0.05$), and the sign ** indicates significant differences at $p < 0.01$. Spot titer assays using *E. amylovora* E2 and *E. amylovora* E2 Δ*bssS* strains and plated on LB agar media containing gentian violet dye in appropriate concentrations (*b*)

Заключение

В ходе анализа геномной последовательности штамма *E. amylovora* E2 был выявлен и аннотирован ген *bssS*, кодирующий регулятор, потенциально вовлеченный в формирование биопленок. Делеция данного гена привела к заметным изменениям в фенотипе бактерий *E. amylovora*. При наличии глюкозы в среде культивирования подвижность клеток мутантного штамма и уровень формирования биопленок увеличились. Выявленный эффект, вероятно, связан с катаболитной репрессией у бактерий *E. amylovora*, так как у бактерий *E. coli* белок BssS регулирует экспрессию генов, вовлеченных в катаболитную репрессию [6]. Клетки делеционного мутанта обладали высокой чувствительностью по отношению к красителю генциановому фиолетовому, что может быть обусловлено изменением проницаемости внешней мембраны. На основании полученных результатов изучения подвижности клеток и интенсивности формирования биопленок в средах с различными источниками углерода можно предположить, что белок BssS регулирует экспрессию генов, вовлеченных в катаболитную репрессию, а также стрессовые реакции, однако для подтверждения такого предположения требуется проведение дальнейших исследований.

Библиографические ссылки

1. Eastgate JA. *Erwinia amylovora*: the molecular basis of fireblight disease. *Molecular Plant Pathology.* 2000;1(6):325–329. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2000.00044.x.

2. Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics.* 2010; 22(1):2–16. DOI: 10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x.

3. Castiblanco LF, Sundin GW. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. *Journal of Integrative Plant Biology.* 2016;58(4):362–372. DOI: 10.1111/jipb.12428.

4. Petrova OE, Sauer K. Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. *Journal of Bacteriology.* 2012; 194(10):2413–2425. DOI: 10.1128/JB.00003-12.

5. Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE. Bacterial biofilm eradication agents: a current review. *Frontiers in Chemistry.* 2019;7:824. DOI: 10.3389/fchem.2019.00824.

6. Domka J, Lee J, Wood TK. YliH (BssR) and YceP (BssS) regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling. *Applied and Environmental Microbiology.* 2006;72(4):2449–2459. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2449-2459.2006.

7. Beloin C, Roux A, Ghigo J-M. *Escherichia coli* biofilms. In: Romeo T, editor. *Bacterial biofilms.* Berlin: Springer; 2008. p. 249–289 (Compans RW, Cooper MD, Honjo T, Koprowski H, Melchers F, Oldstone MBA, et al., editors. Current topics in microbiology and immunology; volume 322). DOI: 10.1007/978-3-540-75418-3_12.

8. Gorshkov V, Kwenda S, Petrova O, Osipova E, Gogolev Yu, Moleleki LN. Global gene expression analysis of cross-protected phenotype of *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS One.* 2017;12(1):e0169536. DOI: 10.1371/journal.pone.0169536.

9. Wang S, Phillippy AM, Deng K, Rui X, Li Z, Tortorello ML, et al. Transcriptomic responses of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium to chlorine-based oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology.* 2010;76(15):5013–5024. DOI: 10.1128/AEM.00823-10.

10. Guilhen C, Charbonnel N, Parisot N, Gueguen N, Iltis A, Forestier C, et al. Transcriptional profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. *BMC Genomics.* 2016;17:237. DOI: 10.1186/s12864-016-2557-x.

11. Sambrook J, Russell DW, editors. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 3 volumes.

12. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS.* 2000;97(12):6640–6645. DOI: 10.1073/pnas.120163297.

13. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Ya, Merezhuk Yu, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research.* 2008;36(supplement 2):W5 – W9. DOI: 10.1093/nar/gkn201.

14. Zhao Y, Sundin GW, Wang D. Construction and analysis of pathogenicity island deletion mutants of *Erwinia amylovora*. *Canadian Journal of Microbiology.* 2009;55(4):457–464. DOI: 10.1139/w08-147.

15. Lee JH, Zhao Y. Integration host factor is required for RpoN-dependent *hrpL* gene expression and controls motility by positively regulating *rsmB* sRNA in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology.* 2016;106(1):29–36. DOI: 10.1094/PHYTO-07-15-0170-R.

16. Castiblanco LF, Sundin GW. Cellulose production, activated by cyclic di-GMP through BcsA and BcsZ, is a virulence factor and an essential determinant of the three-dimensional architectures of biofilms formed by *Erwinia amylovora* Ea1189. *Molecular Plant Pathology.* 2018;19(1):90–103. DOI: 10.1111/mpp.12501.

17. Burby PE, Simmons ZW, Schroeder JW, Simmons LA. Discovery of a dual protease mechanism that promotes DNA damage checkpoint recovery. *PLoS Genetics.* 2018;14(7):e1007512. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007512.

18. Piqué N, Miñana-Galbis D, Merino S, Tomás JM. Virulence factors of *Erwinia amylovora*: a review. *International Journal of Molecular Sciences.* 2015;16(6):12836–12854. DOI: 10.3390/ijms160612836.

19. Adams E. The antibacterial action of crystal violet. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 1967;19(12):821–826. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1967.tb09550.x.

20. Gustafsson P, Nordström K, Normark S. Outer penetration barrier of *Escherichia coli* K-12: kinetics of the uptake of gentian violet by wild type and envelope mutants. *Journal of Bacteriology.* 1973;116(2):893–900. DOI: 10.1128/jb.116.2.893-900.1973.

Получена 12.01.2024 / исправлена 21.07.2024 / принята 22.07.2024.
Received 12.01.2024 / revised 21.07.2024 / accepted 22.07.2024.

Экология и природопользование

Ecology and conservancy

УДК 574, 574.3, 581.41

ЭКОЛОГО-БИОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПРИДОРОЖНОЙ РАСТИТЕЛЬНОСТИ ВДОЛЬ АВТОМОБИЛЬНЫХ ДОРОГ г. МИНСКА И МИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Е. С. ШАВАЛДА[1)]***, А. В. СУДНИК***[1)]

[1)]*Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь*

Аннотация. Проведена оценка экологической (в зависимости от трофности (эдафотоп) и увлажненности (гидротоп) почвогрунта) и биоморфологической (по системам классификации жизненных форм Раункиера и Серебрякова) структуры растительности в пределах различных экспозиций полосы отвода вдоль автодорог г. Минска и Минской области. Всего в полосе отвода произрастает 267 видов растений, включая 7 видов мохообразных и 37 видов древесно-кустарниковых растений. В эдафотопической структуре преобладают мезотрофы (96 видов, или 36,9 %) со сдвигом в сторону эвтрофности (широко представлены мезоэвтрофы (85 видов, или 32,7 %) и эвтрофы (54 вида, или 20,8 %)). Гидротопическая структура характеризуется доминированием мезофитов (160 видов, или 61,5 %) с признаками ксерофитизации флоры (насчитывается 55 видов, или 21,2 % ксеромезофитов). Согласно результатам анализа биоморфологической структуры по системе Раункиера преобладают гемикриптофиты (139 видов,

Образец цитирования:
Шавалда ЕС, Судник АВ. Эколого-биоморфологическая структура придорожной растительности вдоль автомобильных дорог г. Минска и Минской области. *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2024;3:69–81.
EDN: ZYTTSY

For citation:
Shavalda YaS, Sudnik AV. Ecological-biomorphological structure of roadside vegetation along the highways of Minsk and the Minsk Region. *Experimental Biology and Biotechnology.* 2024;3:69–81. Russian.
EDN: ZYTTSY

Авторы:
Евгений Сергеевич Шавалда – научный сотрудник лаборатории оптимизации и мониторинга экосистем.
Александр Владимирович Судник – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией оптимизации и мониторинга экосистем.

Authors:
Yauheni S. Shavalda, researcher at the laboratory of optimisation and monitoring of ecosystems.
e.shavalda@gmail.com
Aliaksandr V. Sudnik, PhD (biology), docent; head of the laboratory of optimisation and monitoring of ecosystems.
asudnik@tut.by

CC BY NC

или 53,5 %) и терофиты (64 вида, или 24,6 %) (гемикриптофитно-терофитный тип флоры). По классификации Серебрякова доминируют стержнекорневые (87 видов, или 39,5 %), длиннокорневищные (44 вида, или 20,0 %) и короткокорневищные (40 видов, или 18,2 %) формы. Установлены особенности флористического разнообразия и эколого-биоморфологической структуры придорожной растительности в зависимости от конструкции полосы отвода и сохранности почвенного покрова при различном антропогенном воздействии. Даны краткие рекомендации по уходу за полосой отвода в условиях обилия терофитов и стержнекорневых форм растений.

Ключевые слова: автомобильная дорога; полоса отвода; придорожная растительность; эдафотопическая структура; гидротопическая структура; биоморфологическая структура по Раункиеру; биоморфологическая структура по Серебрякову.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б23М-001).

ECOLOGICAL-BIOMORPHOLOGICAL STRUCTURE OF ROADSIDE VEGETATION ALONG THE HIGHWAYS OF MINSK AND THE MINSK REGION

Ya. S. SHAVALDA[a]***, A. V. SUDNIK***[a]

[a]*V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany, National Academy of Sciences of Belarus, 27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus*

Corresponding author: Ya. S. Shavalda (e.shavalda@gmail.com)

Abstract. An assessment was made of the ecological (depending on the trophicity (edaphotope) and moisture (hydrotope) of the soil) and biomorphological (according to the Raunkiaer and Serebryakov classification systems of life forms) structure of vegetation within various exposures of the right-of-way along the highways of Minsk and the Minsk Region. A total of 267 plant species have been identified, including 7 species of bryophytes and 37 species of trees and shrubs. The edaphotopic structure is dominated by mesotrophs (96 species, or 36.9 %) with a shift towards eutrophicity (mesoeutrophs (85 species, or 32.7 %) and eutrophs (54 species, or 20.8 %) are widely represented). The hydrotopic structure is characterised by the dominance of mesophytes (160 species, or 61.5 %) with signs of xerophytisation of the flora (there are 55 species, or 21.2 % xeromesophytes). According to the Raunkiaer system, hemicryptophytes (139 species, or 53.5 %) and therophytes (64 species, or 24.6 %) dominate (the hemicryptophytic-therophytic type of flora). According to the Serebryakov system is dominated by taproot (87 species, or 39.5 %), long-rhizome (44 species, or 20.0 %) and short-rhizome (40 species, or 18.2 %) forms. The features of floristic diversity and ecological-biomorphological structure of roadside vegetation were established depending on the design of the right-of-way and the preservation of the soil cover under various anthropogenic impacts. Brief recommendations are given for caring for the right-of-way in conditions of an abundance of therophytes and taproot forms of plants.

Keywords: highway; right-of-way; roadside vegetation; edaphotopic structure; hydrotopic structure; biomorphological structure according to Raunkiaer; biomorphological structure according to Serebryakov.

Acknowledgements. This work was carried out with financial support from the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. B23M-001).

Введение

Антропогенное воздействие в полосе отвода вдоль автодорог приводит к формированию специфических антропогенно измененных фитоценозов. На эколого-биоморфологическую структуру данных сообществ особое влияние оказывают положение в рельефе, конструкция полосы отвода (наличие кюветов и откосов), состояние почвенного покрова (степень деградации почвы вследствие ее эрозии) и периодичность сезонных мероприятий по уходу (кошение, засевание семян травосмесей и подсыпание почвогрунта) [1]. Комплексное воздействие различных антропогенных факторов, включая загрязнение придорожных территорий, обусловливает формирование качественно новой динамичной среды произрастания, нехарактерной для региональных растений и их сообществ. В этих условиях происходит развитие высокотолерантных растительных сообществ вдоль автодорог [2].

Формируется так называемая автодорожная геотехническая система – линейный трансформированный участок с полным или частичным уничтожением почвенного покрова и доминированием адвентивной растительности [3]. Серьезной трансформации подвержены сообщества на откосах: эрозионные процессы вследствие смыва почвы атмосферными осадками и механическое повреждение в результате сезонного кошения приводят к развитию сорно-рудеральной растительности с псаммофитными, ксерофитными и гелиофитными свойствами [4]. Сезонное кошение обусловливает сужение экологического спектра видов, что отражается на формировании специфической экологической ниши из наиболее устойчивых луговых и сорно-рудеральных видов в полосе отвода [5–7].

Для придорожных сообществ характерны специфичные диагностические процессы вследствие изменения мероприятий по уходу за полосой отвода. Так, увеличение периодичности сезонного кошения приводит к уменьшению доли корневищных и увеличению доли дерновинных форм растений, а регулярное кошение – к росту вклада однолетников, являющихся терофитами[1] [8]. Особое влияние на структуру придорожных сообществ оказывает использование травосмесей из многолетних злаков различных жизненных форм (дерновинных, длиннокорневищных, столонообразующих) с необходимыми свойствами антропотолерантности и образования дернины. К широко применяемым видам относятся кострец безостый (*Bromopsis inermis*), ежа сборная (*Dactylis glomerata*), овсяница тростниковая (*Festuca arundinacea*), овсяница красная (*F. rubra*), плевел многолетний (*Lolium perenne*), тимофеевка луговая (*Phleum pratense*) и др.[2]

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлась придорожная растительность в пределах полосы отвода вдоль автодорог г. Минска и Минской области[3]. В 2021–2023 гг. было заложено 112 эколого-фитоценотических профилей вдоль магистральных и республиканских автодорог М-1 (Е-30), М-2, М-3, М-4, М-5 (Е-271), М-6 (Е-28), Р-1, Р-23, Р-53, Р-65, МКАД-1 (М-9) и МКАД-2 (М-14) (рис. 1).

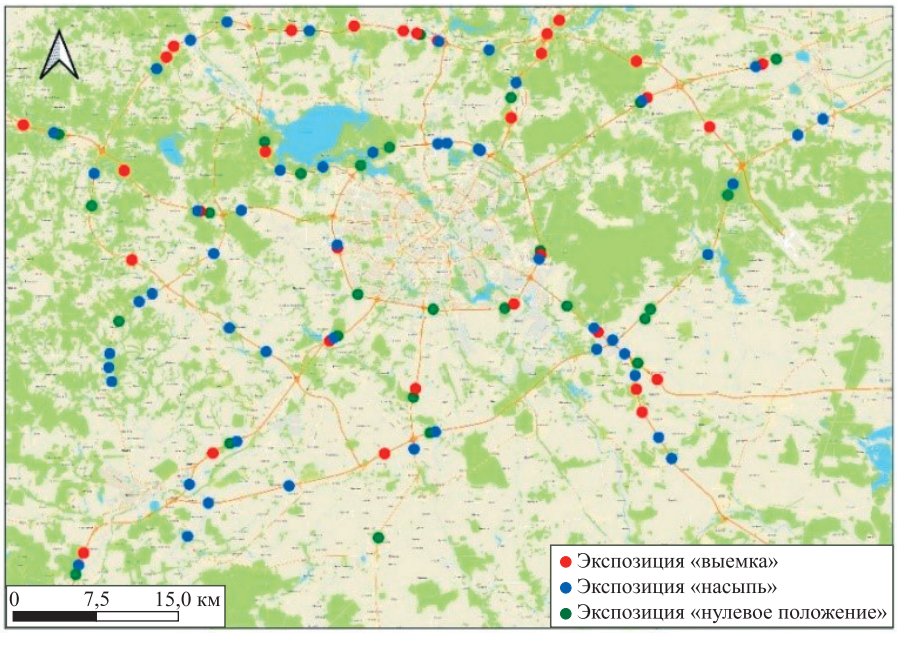


Рис. 1. Участки исследования придорожной растительности в зависимости от конструкции полосы отвода (экспозиции)

Fig. 1. Areas for studying roadside vegetation depending on the design of the right-of-way (exposure)

[1] *Березуцкий М. А., Кашин А. С.* Антропогенная трансформация флоры и растительности : учеб. пособие. Саратов : Наука, 2008. 100 с.

[2] Благоустройство территорий. Озеленение. Правила проектирования и устройства : ТКП 45-3.02-69-2007 (02250) : утв. М-вом архитектуры и стр-ва Респ. Беларусь 20.12.2007 : ввод. в действие с 01.07.2008. Минск : М-во архитектуры и стр-ва Респ. Беларусь, 2008. III, 21 с.

[3] Об автомобильных дорогах и дорожной деятельности : Закон Респ. Беларусь от 2 дек. 1994 г. № 3434-XII // Ведамасці Вярхоўн. Савета Рэсп. Беларусь. 1995. № 5. С. 31.

Участки исследования закладывались в трех экспозициях полосы отвода в зависимости от положения автодороги в рельефе. Исследование придорожной растительности выполнялось по обе стороны от дорожного полотна с учетом конструкции экспозиции: полоса отвода разделялась на соответствующие сектора (рис. 2–4). В экспозиции «выемка» были выделены четыре сектора, а в экспозициях «насыпь» и «нулевое положение» – три сектора по обе стороны от автодороги. Для каждого сектора определены видовой состав[4] и доля основных экологических групп растений в зависимости от трофности (эдафотоп) и увлажненности (гидротоп) почвогрунта[5], проведен биоморфологический анализ по системам Раункиера[6] и Серебрякова[7] (подземная часть растения). При классификации по Раункиеру не учитывались мохообразные, а при классификации по Серебрякову – древесно-кустарниковый ярус, полукустарники, кустарнички, полукустарнички, мохообразные и растения с лиановидным побегом.

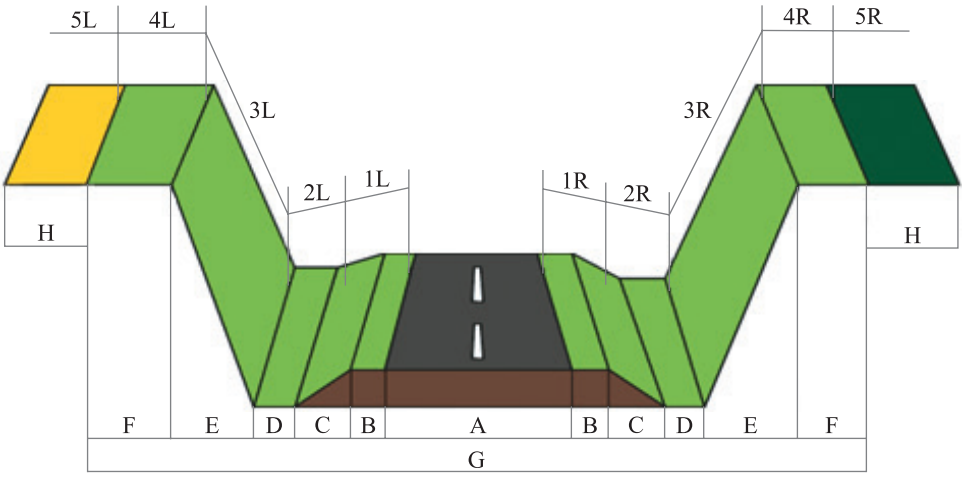


Рис. 2. Структурные части (сектора) полосы отвода в экспозиции «выемка»:
A – проезжая часть; B – сектор 1; C, D – сектор 2; E – сектор 3; F – сектор 4;
G – полоса отвода; H – сообщества экосистемы, в которой пролегает дорога

Fig. 2. Structural parts (sectors) of the right-of-way in the «notch» exposure:
A – roadway; B – sector 1; C, D – sector 2; E – sector 3; F – sector 4;
G – right-of-way; H – communities of the ecosystem in which the road runs

[4]Определитель высших растений Беларуси : учеб. пособие для студентов биол. специальностей вузов / Т. А. Сауткина [и др.] ; под ред. В. И. Парфенова. Минск : Дизайн ПРО, 1999. 471 с. ; *Цвелев Н. Н.* Определитель сосудистых растений Северо-Западной России (Ленинградская, Псковская и Новгородская области). СПб. : Изд-во С.-Петерб. гос. хим.-фарм. акад., 2000. 781 с. ; *Рыковский Г. Ф., Масловский О. М.* Andreaeopsida – Bryopsida / под ред. В. И. Парфенова. Минск : Тэхналогія, 2004. 437 с. (Флора Беларуси. Мохообразные : в 2 т. ; т. 1) ; *Они же*. Hepaticopsida – Sphagnopsida / под ред. В. И. Парфенова. Минск : Беларус. навука, 2009. 213 с. (Флора Беларуси. Мохообразные : в 2 т. ; т. 2) ; Lycopodiophyta. Equisetophyta. Polypodiophyta. Ginkgophyta. Pinophyta. Gnetophyta / Р. Ю. Блажевич [и др.] ; под общ. ред. В. И. Парфенова. Минск : Беларус. навука, 2009. 199 с. (Флора Беларуси. Сосудистые растения : в 6 т. ; т. 1) ; Liliopsida (Acoraceae, Alismataceae, Araceae, Butomaceae, Commelinaceae, Hydrocharitaceae, Juncaginaceae, Lemnaceae, Najadaceae, Poaceae, Potamogetonaceae, Scheuchzeriaceae, Sparganiaceae, Typhaceae, Zannichelliaceae) / Д. И. Третьяков [и др.] ; под общ. ред. В. И. Парфенова. Минск : Беларус. навука, 2013. 447 с. (Флора Беларуси. Сосудистые растения : в 6 т. ; т. 2) ; Liliopsida (Agavaceae, Alliaceae, Amaryllidaceae, Asparagaceae, Asphodelaceae, Cannaceae, Colchicaceae, Convalliriaceae, Cyperaceae, Dioscoreaceae, Iridaceae, Ixioliriaceae, Hemerocallidaceae, Hostaceae, Hyacinthaceae, Juncaceae, Liliaceae, Melanthiaceae, Ophiopogonaceae, Orchidaceae, Pontederiaceae, Tofieldiaceae, Trilliaceae) / Д. В. Дубовик [и др.] ; под общ. ред. В. И. Парфенова. Минск : Беларус. навука, 2017. 573 с. (Флора Беларуси. Сосудистые растения : в 6 т. ; т. 3) ; Magnoliopsida (Actinidiaceae, Aizoaceae, Aristolochiaceae, Berberidaceae, Betulaceae, Buxaceae, Calycanthaceae, Cannabaceae, Caryophyllaceae, Ceratophyllaceae, Cactaceae, Fagaceae, Fumariaceae, Juglandaceae, Lardizabalaceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Moraceae, Nyctaginaceae, Nymphaeaceae, Papaveraceae, Platanaceae, Portulacaceae, Ranunculaceae, Saururaceae, Schisandraceae, Ulmaceae, Urticaceae) / Д. В. Дубовик [и др.] ; под общ. ред. В. И. Парфенова, Д. В. Дубовика. Минск : Беларус. навука, 2023. 743 с. (Флора Беларуси. Сосудистые растения : в 6 т. ; т. 4) ; The Plant List [Electronic resource]. URL: http://www.theplantlist.org (date of access: 14.11.2022).

[5]Плантариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран : открытый онлайн атлас и определитель растений. URL: https://www.plantarium.ru (дата обращения: 23.11.2023).

[6]*Raunkiaer C.* The life forms of plants and statistical plant geography. Oxford : Clarendon Press, 1934. XVI, 632 p. ; Pladias : website. URL: https://pladias.cz (date of access: 14.11.2023).

[7]*Серебряков И. Г.* Экологическая морфология растений: жизненные формы покрытосеменных и хвойных : учеб. пособие для гос. ун-тов, пед. и лесотехн. вузов СССР. М. : Высш. шк., 1962. 277 с. ; *Раков Н. С.* Карасевское болото как ценный ботанический объект в городе Ульяновске (Ульяновское Заволжье) // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. 2011. Т. 20, № 1. С. 143–164 ; *Булохов А. Д.* Экологическая оценка среды методами фитоиндикации : учеб. пособие. Брянск : Изд-во БГПУ, 1996. 104 с.

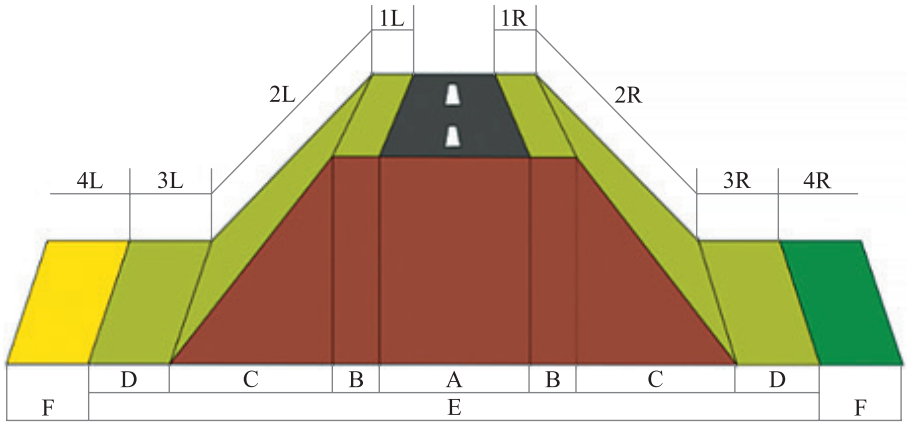


Рис. 3. Структурные части (сектора) полосы отвода в экспозиции «насыпь»:
A – проезжая часть; B – сектор 1; C – сектор 2; D – сектор 3; E – полоса отвода;
F – сообщества экосистемы, в которой пролегает дорога

Fig. 3. Structural parts (sectors) of the right-of-way in the «embankment» exposure:
A – roadway; B – sector 1; C – sector 2; D – sector 3; E – right-of-way;
F – communities of the ecosystem in which the road runs

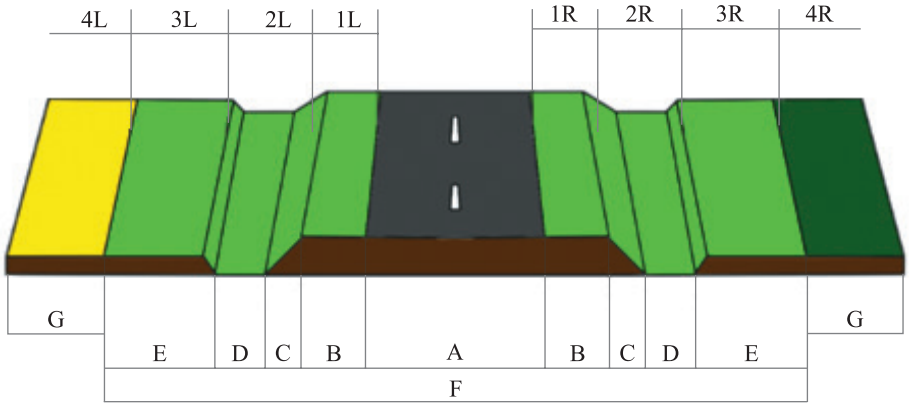


Рис. 4. Структурные части (сектора) полосы отвода в экспозиции «нулевое положение»:
A – проезжая часть; B – сектор 1; C, D – сектор 2; E – сектор 3; F – полоса отвода;
G – сообщества экосистемы, в которой пролегает дорога

Fig. 4. Structural parts (sectors) of the right-of-way in the «zero position» exposure:
A – roadway; B – sector 1; C, D – sector 2; E – sector 3; F – right-of-way;
G – communities of the ecosystem in which the road runs

Анализ корреляционной зависимости между экологическими и биоморфологическими группами в различных секторах осуществлялся с помощью коэффициента корреляции (r). Построение групп растительности выполнялось с использованием одновыборочного t-критерия в программе *StatSoft Statistica* (версия 12.0).

Результаты и их обсуждение

Всего в полосе отвода вдоль автодорог было обнаружено 267 видов растений, включая 7 видов мохообразных и 37 видов древесно-кустарникового яруса. В эдафотопической структуре придорожной растительности преобладают мезотрофы (36,9 %) со сдвигом в сторону эвтрофности (широко представлены мезоэвтрофы (32,7 %) и эвтрофы (20,8 %)), вероятно, из-за влияния примыкающих к полосе отвода агрофитоценозов (табл. 1). Гидротопическая структура характеризуется признаками ксерофитизации: доминируют мезофиты (61,5 %) и ксеромезофиты (21,2 %).

Согласно системе Раункиера в полосе отвода преобладают гемикриптофиты (53,5 %) и терофиты (24,6 %), т. е. сформировался гемикриптофитно-терофитный тип флоры (табл. 2). Доминирование гемикриптофитов определяется зональными особенностями региональной растительности, а высокая

доля терофитов обусловливается антропогенным воздействием [9]. По классификации Серебрякова преобладают поликарпические травы и однолетники, а именно стержнекорневые (39,5 %), длиннокорневищные (20,0 %) и короткокорневищные (18,2 %) формы, что объясняется развитием сообществ в условиях постоянного антропогенного воздействия [10].

Таблица 1

Экологические группы придорожной растительности

Table 1

Ecological groups of roadside vegetation

Группа растений	Количество видов	Доля от общего числа видов, %
Эдафотопические группы		
Олиготрофы	2	0,8
Олигомезотрофы	20	7,7
Мезотрофы	96	36,9
Мезоэвтрофы	85	32,7
Эвтрофы	54	20,8
Нитрофилы	3	1,1
Гидротопические группы		
Гигрофиты	10	3,8
Гигромезофиты	20	7,7
Мезогигрофиты	14	5,4
Мезофиты	160	61,5
Ксеромезофиты	55	21,2
Ксерофиты	1	0,4

Таблица 2

Биоморфологические группы придорожной растительности

Table 2

Biomorphological groups of roadside vegetation

Группа растений	Количество видов	Доля от общего числа видов, %
Биоморфы по системе Раункиера		
Макрофанерофиты	15	5,8
Нанофанерофиты	18	6,9
Хамефиты	7	2,7
Гемикриптофиты	139	53,5
Геофиты	17	6,5
Терофиты	64	24,6
Биоморфы по системе Серебрякова		
Стержнекорневые	87	39,5
Кистекорневые	17	7,7
Короткокорневищные	40	18,2
Длиннокорневищные	44	20,0
Рыхлодерновинные	18	8,2
Плотнодерновинные	3	1,4

Окончание табл. 2
Ending of the table 2

Группа растений	Количество видов	Доля от общего числа видов, %
Столонообразующие	5	2,2
Наземно-ползучие	3	1,4
Корнеотпрысковые	3	1,4

Экспозиция «выемка». В эдафотопической структуре экспозиции «выемка» доминируют мезотрофные виды со сдвигом в сторону эвтрофности, количество мезотрофов в секторах составляет 34,2–40,3 % (рис. 5). Наиболее распространены *Achillea millefolium*, *B. inermis*, *Plantago major* и др. Отмечается отрицательная корреляция между долей мезотрофов в секторе 2 (кювет) и секторе 3 (откос) ($r = -0,3$ при $p < 0,05$) вследствие эрозии почвогрунта на откосах и его смыва в кюветы. С мезотрофами содоминируют мезоэвтрофы (29,6–35,1 %) (*Artemisia vulgaris*, *Calamagrostis epigeios*, *D. glomerata* и др.) и эвтрофы (19,5–29,5 %) (*Echinochloa crus-galli*, *Elytrigia repens*, *Polygonum arenastrum* и др.). Влияние эрозии полосы отвода наиболее отражается в схожей динамике количества мезоэвтрофов в секторах 1 и 3 ($r = 0,4$ при $p < 0,05$). Вклад олигомезотрофов (3,4–7,5 %) (*Poa compressa*, *Rumex acetosella*, *Sedum acre* и др.) положительно коррелирует в секторах 1 и 4 ($r = 0,3$ при $p < 0,05$). Общий анализ участков экспозиции «выемка» показал увеличение количества олигомезотрофов в 2,4 раза от сектора 2 к сектору 3 (из-за смыва почвогрунта и элементов питания в результате эрозии) и рост количества мезоэвтрофов в 2,3 раза от сектора 1 к сектору 4 (за счет попадания в полосу отвода минеральных удобрений с примыкающих агрофитоценозов).

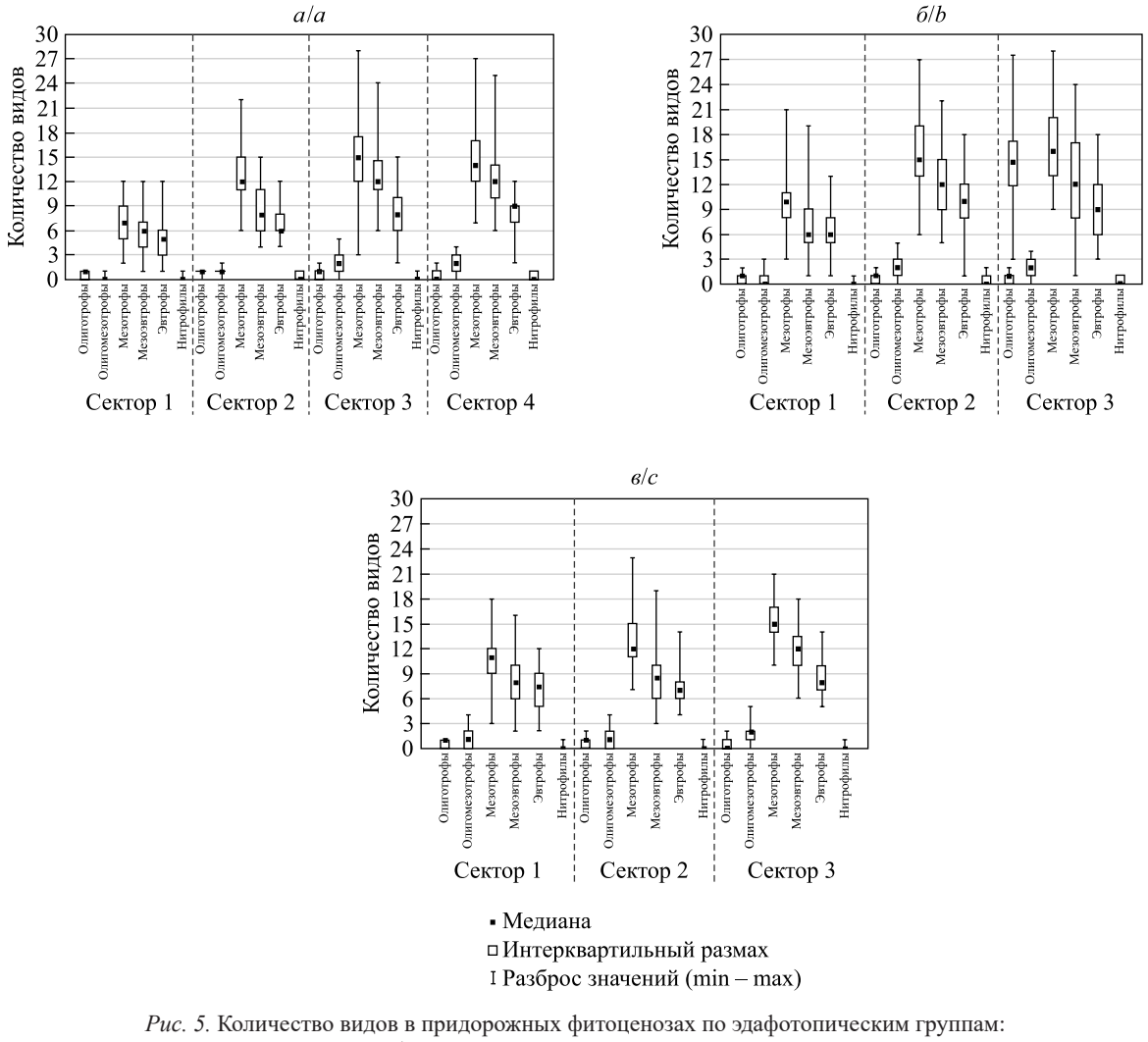


Рис. 5. Количество видов в придорожных фитоценозах по эдафотопическим группам:
а – экспозиция «выемка»; *б* – экспозиция «насыпь»; *в* – экспозиция «нулевое положение»

Fig. 5. Number of species in roadside phytocenoses by edaphotopic groups:
a – «notch» exposure; *b* – «embankment» exposure; *c* – «zero position» exposure

Среди гидротопических групп доминируют мезофиты (62,2–69,3 %) со сдвигом в сторону ксерофитизации растительности (насчитывается 20,1–23,5 % ксеромезофитов) (рис. 6). Отрицательная корреляция между долей гигромезофитов в секторах 1 и 2 ($r = -0{,}4$ при $p < 0{,}05$) обусловлена наличием выраженного кювета, который не позволяет гигромезофитам (*Deschampsia cespitosa*, *Juncus effusus*, *Lysimachia vulgaris* и др.) заселять сектор 1. Эрозия откосов приводит к росту доли ксеромезофитов в данном секторе и ее снижению в кюветах за счет смыва почвогрунта ($r = -0{,}4$ при $p < 0{,}05$). Также на откосах отмечен единственный ксерофит *Colutea arborescens*.

По мере удаления от дорожного полотна вместе с ростом видового разнообразия увеличивается количество терофитов и гемикриптофитов в секторах. Доля фанерофитов (*Cotoneaster lucidus*, *Swida alba* и др.) в секторах 3 и 4 возрастала из-за их использования в озеленении откосов или в результате естественного заноса (рис. 7). Положительная корреляция между количеством нанофанерофитов в секторах 2 и 3 и в секторах 2 и 4 ($r = 0{,}4$ при $p < 0{,}05$) отражает постепенное зарастание откосов и кюветов древесно-кустарниковыми растениями (*Corylus avellana*, *Frangula alnus*, *Rubus idaeus* и др.) на участках, примыкающих к лесным массивам. Для ряда участков отмечается размытие кюветов (сектор 2) вследствие смыва почвогрунта с откосов, что влияет на рост и развитие геофитов и обусловливает их дальнейшее распространение в секторе 1 ($r = 0{,}3$ при $p < 0{,}05$). Доля гемикриптофитов в секторах 1 и 2 возрастала с 48,9 до 58,0 %, а в секторах 3 и 4 снижалась до 56,3–57,2 % из-за эрозии почвы на откосах и увеличения количества фанерофитов. Доля терофитов уменьшалась с 31,8 до 24,1 % в связи с ростом конкуренции с другими группами растений; минимальный вклад (22,6 %) отмечался в секторе 3 по причине смыва семян с откосов атмосферными осадками. Наибольшая эрозия секторов 1 и 3 проявляется в положительной корреляции между долей терофитов в указанных секторах ($r = 0{,}4$ при $p < 0{,}05$) и отрицательной корреляции между их долей в секторах 2 и 3 ($r = -0{,}3$ при $p < 0{,}05$). Среди терофитов основной вклад вносят *Chenopodium album*, *Conyza canadensis*, *Lactuca serriola*, *P. arenastrum*, *Setaria viridis* и др.

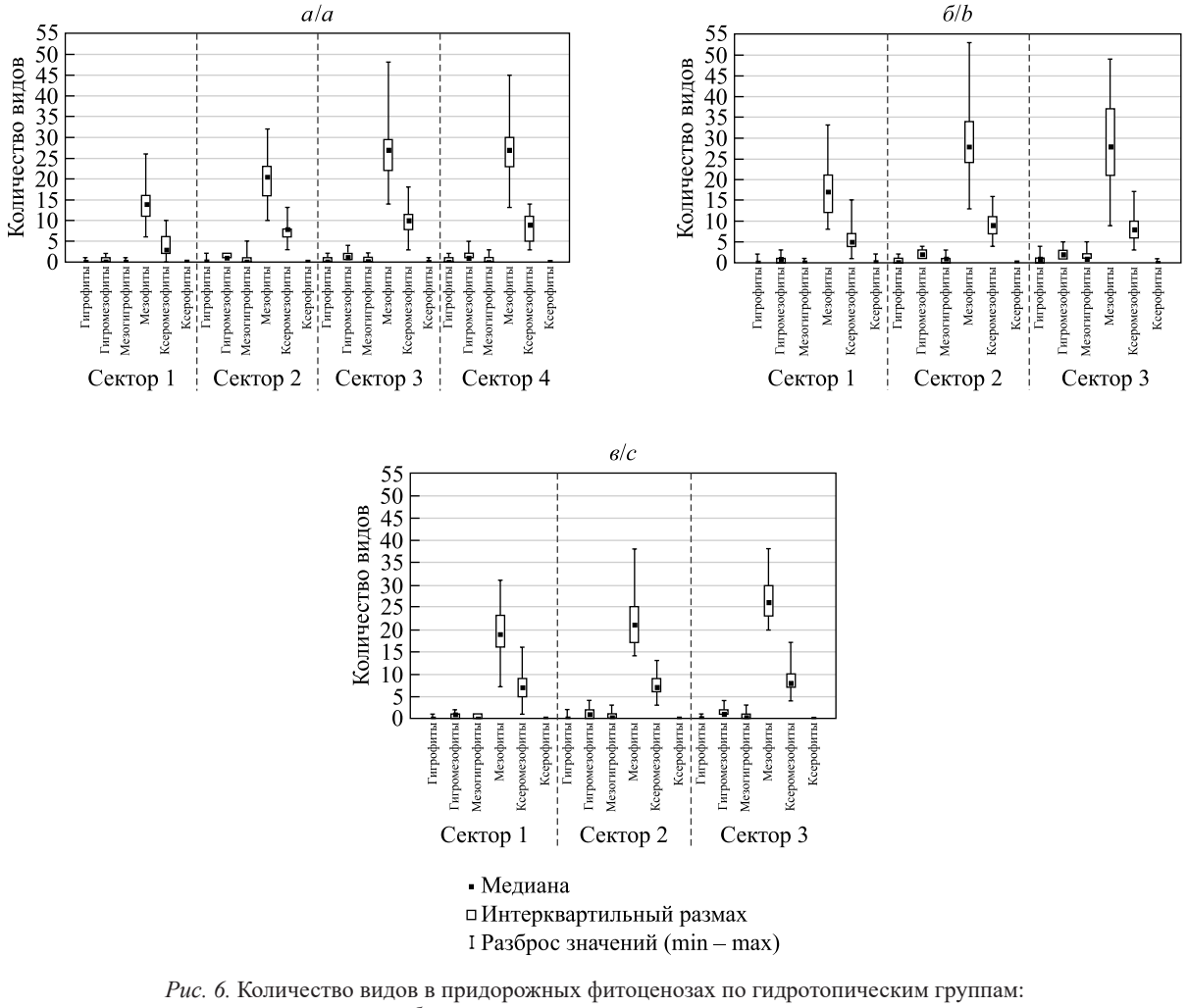


Рис. 6. Количество видов в придорожных фитоценозах по гидротопическим группам:
а – экспозиция «выемка»; *б* – экспозиция «насыпь»; *в* – экспозиция «нулевое положение»

Fig. 6. Number of species in roadside phytocenoses by hydrotopic groups:
a – «notch» exposure; *b* – «embankment» exposure; *c* – «zero position» exposure

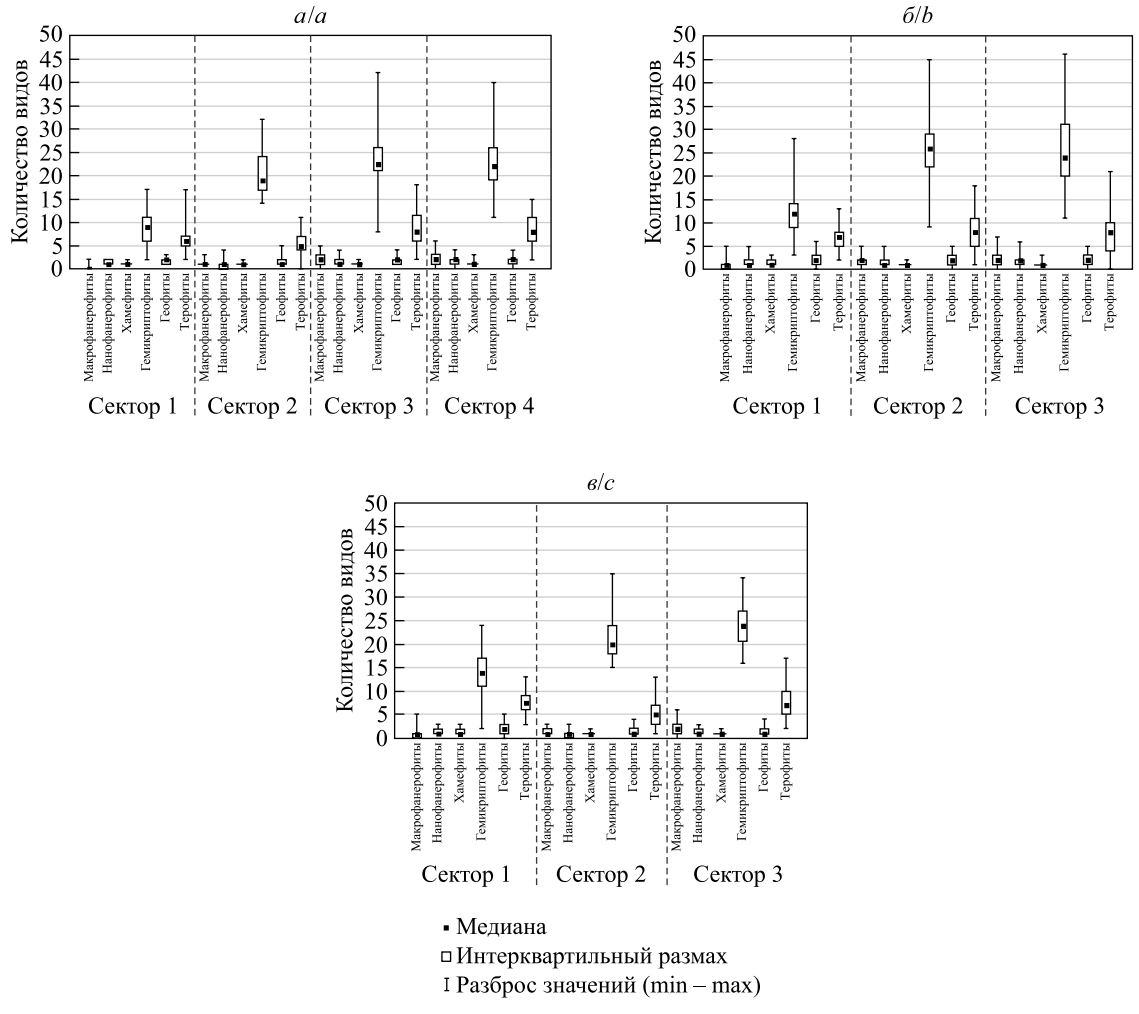


Рис. 7. Количество видов в придорожных фитоценозах по классификации Раункиера:
а – экспозиция «выемка»; *б* – экспозиция «насыпь»; *в* – экспозиция «нулевое положение»

Fig. 7. Number of species in roadside phytocenoses according to the Raunkiaer classification:
a – «notch» exposure; *b* – «embankment» exposure; *c* – «zero position» exposure

Особенности полосы отвода обусловили доминирование стержнекорневых форм растений и рост их доли по мере приближения к дорожному полотну (с 37,8 % в секторе 4 до 44,3 % в секторе 1) (рис. 8). Среди стержнекорневых форм встречаются *Artemisia campestris*, *Taraxacum officinale*, *Trifolium campestre* и др. Отмечается положительная корреляция между долей корнеотпрысковых форм (*Cirsium arvense*, *Convolvulus arvensis* и *Linaria vulgaris*) в секторах 3 и 4 ($r = 0{,}3$ при $p < 0{,}05$).

Различия в периодичности сезонного кошения полосы отвода между исследуемыми участками проявляются в общей положительной корреляции ($r = 0{,}4$ при $p < 0{,}05$) между долей кистекорневых и длиннокорневищных форм растений в секторах 1 и 3, а также между долей длиннокорневищных форм растений в секторах 3 и 4. Высокая периодичность сезонного кошения приводит к деградации почвенного покрова, что обусловливает рост вклада кистекорневых форм, тогда как на участках с более низкой интенсивностью ухода отмечается увеличение количества длиннокорневищных форм. Наиболее благоприятные условия для формирования растительности наблюдаются в секторе 2 (кювет): происходит рост доли длиннокорневищных форм до 25,0 % относительно их доли в секторе 1. По мере удаления от дорожного полотна доля длиннокорневищных форм уменьшается, достигая 18,2 % в секторе 4 вследствие увеличения количества короткокорневищных и рыхлодерновинных форм, что служит показателем дальнейшего снижения степени антропогенного воздействия по мере удаления от автодороги. В сообществах длиннокорневищные формы представлены видами *B. inermis*, *C. epigeios*, *E. repens* и др. По мере удаления от дорожного полотна также возрастает вклад короткокорневищных форм (*A. vulgaris*, *Centaurea jacea*, *Hypericum perforatum*, *Rumex confertus* и др.) с 12,7 до 20,3 % (в 1,6 раза).

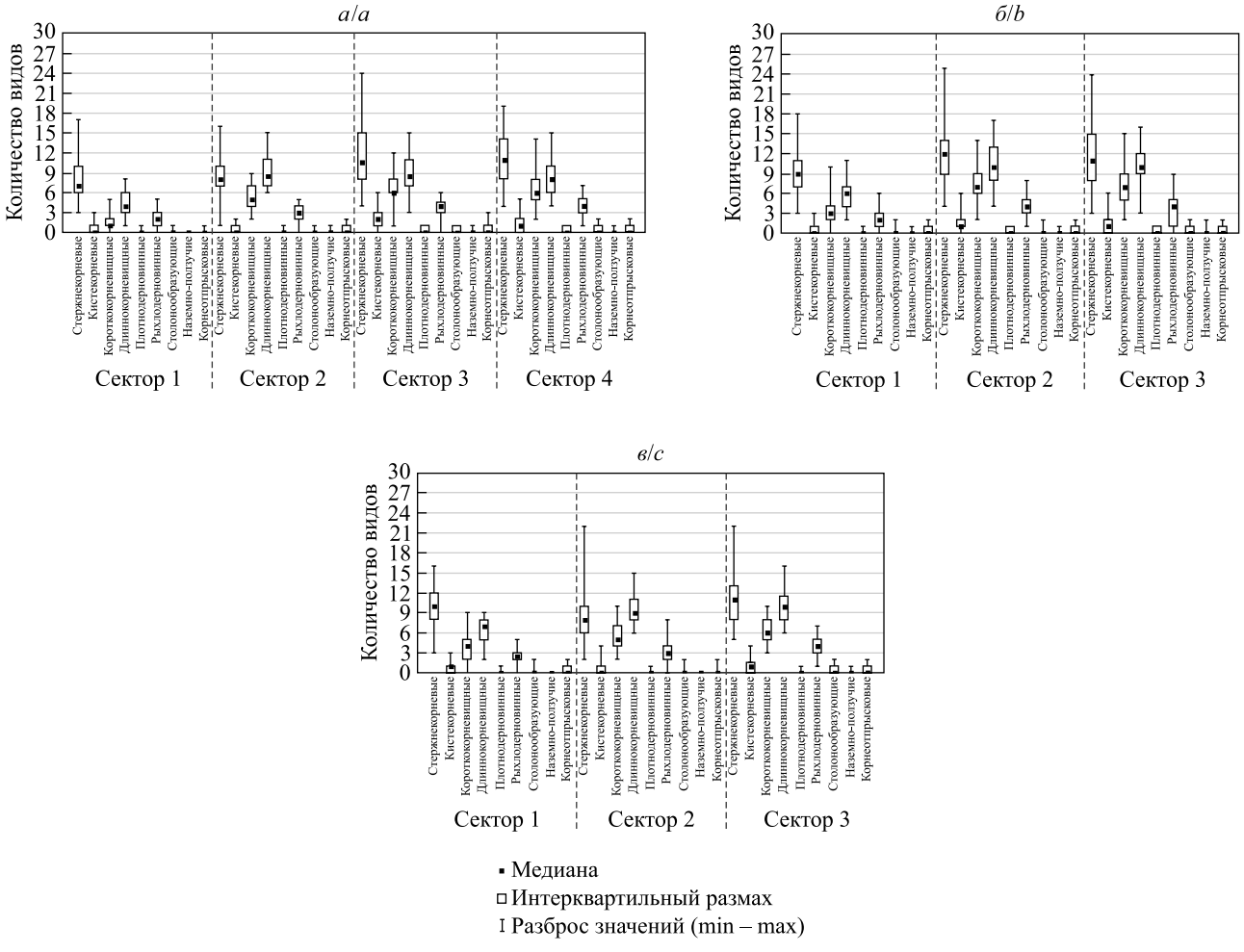


Рис. 8. Количество видов в придорожных фитоценозах по классификации Серебрякова:
а – экспозиция «выемка»; *б* – экспозиция «насыпь»; *в* – экспозиция «нулевое положение»

Fig. 8. Number of species in roadside phytocenoses according to the Serebryakov classification:
a – «notch» exposure; *b* – «embankment» exposure; *c* – «zero position» exposure

Экспозиция «насыпь». В эдафотопической структуре экспозиции «насыпь» очевидно доминируют мезотрофы (34,9–37,1 %), мезоэвтрофы (30,8–33,2 %) и эвтрофы (22,8–25,3 %) (см. рис. 5). Широко встречается мезоэвтроф *Arrhenatherum elatius*. Процессы эрозии в секторах 1 и 2 схожи: отмечается слабая положительная корреляция между долей мезоэвтрофов ($r = 0{,}2$ при $p < 0{,}05$) и долей эвтрофов ($r = 0{,}3$ при $p < 0{,}05$). Отрицательная корреляция между долей мезоэвтрофов в секторах 2 и 3 ($r = -0{,}2$ при $p < 0{,}05$) указывает на накопление почвогрунта у подножия насыпи вследствие его смыва с откосов, а также рост количества видов древесно-кустарникового яруса (*Salix purpurea*, *Tilia cordata* и др.). Количество олиготрофов, олигомезотрофов и нитрофилов изменялось минимально, количество мезотрофов и мезоэвтрофов по мере удаления от дорожного полотна возрастало в 1,5 раза, количество эвтрофов – в 1,2 раза.

Среди гидротопических групп преобладают мезофиты (61,4–66,4 %) и ксеромезофиты (20,4–23,4 %) (см. рис. 6). Отмечена положительная корреляция между долей мезофитов в секторах 1 и 2 ($r = 0{,}3$ при $p < 0{,}05$) и в секторах 1 и 3 ($r = 0{,}2$ при $p < 0{,}05$). На некоторых участках наблюдалось длительное переувлажнение почвогрунта в секторе 3, что привело к росту количества гигрофитов и мезогигрофитов в 2,5 и 3,3 раза соответственно по сравнению с их количеством в секторе 1. В результате локального подтопления доминируют гигрофит *Phragmites australis* и мезогигрофит *Phalaroides arundinacea*.

Характерна общая тенденция к увеличению доли гемикриптофитов с 51,4 до 55,4 % и уменьшению доли терофитов с 30,0 до 22,9 % по мере удаления от дорожного полотна (см. рис. 7). Частое отсутствие кошения склона и подножия приводит к проникновению в сектор 1 фанерофитов: отмечается положительная корреляция между долей макрофанерофитов в секторах 1 и 3 ($r = 0{,}3$ при $p < 0{,}05$). На большинстве участков происходит равномерная эрозия почвы в секторах 1 и 2, что подтверждается положительной корреляцией между долей терофитов ($r = 0{,}2$ при $p < 0{,}05$) и долей гемикриптофитов ($r = 0{,}4$ при $p < 0{,}05$).

Как и в случае с экспозицией «выемка», снижается вклад стержнекорневых форм (с 42,5 до 38,8 %) по мере увеличения расстояния до автодороги (см. рис. 8). Рост доли корневищных форм по мере удаления от дорожного полотна обусловливается снижением интенсивности деградации почвы и общего антропогенного воздействия: вклад короткокорневищных форм увеличивался с 15,7 до 18,2 %, вклад длиннокорневищных форм – с 18,9 до 20,0 %. Относительно равномерное антропогенное воздействие определяет вклад стержнекорневых и длиннокорневищных форм в секторах 1 и 2 ($r = 0{,}2$ при $p < 0{,}05$) и вклад рыхлодерновинных и столонообразующих форм в секторах 1 и 3 ($r = 0{,}3$ при $p < 0{,}05$). Отрицательная корреляция между долей кистекорневых и короткокорневищных форм наблюдалась в секторах 2 и 3 ($r = -0{,}2$ при $p < 0{,}05$).

Экспозиция «нулевое положение». В эдафотопической структуре экспозиции «нулевое положение» доминируют мезотрофы (34,1–37,5 %), мезоэвтрофы (30,3–31,9 %) и эвтрофы (23,6–27,3 %) (см. рис. 5). Простая конструкция полосы отвода (отсутствие откосов и кюветов) обусловливает минимальные различия эдафотопических групп между секторами. Обнаружен единственный нитрофил *Amaranthus retroflexus*. Увеличение количества мезотрофов и мезоэвтрофов в секторах 1–3 минимально (в 1,1–1,2 раза).

Среди гидротопических групп доминируют мезофиты (62,5–68,2 %) и ксеромезофиты (19,4–24,3 %) (см. рис. 6). Положительная корреляция между долей мезофитов в секторах 1 и 3 ($r = 0{,}4$ при $p < 0{,}05$) обусловлена отсутствием кюветов и откосов. Положительная корреляция между долей гигромезофитов в секторах 2 и 3 ($r = 0{,}4$ при $p < 0{,}05$) указывает на более благоприятные условия для развития растительности в этих секторах, а отсутствие кювета способствует равномерному распространению данной группы растений.

Характерна общая тенденция к увеличению вклада гемикриптофитов с 53,7 до 58,3 % и уменьшению вклада терофитов с 30,3 до 22,2 % по мере удаления от дорожного полотна (см. рис. 7). Отмечены положительная корреляция между долей нанофанерофитов и гемикриптофитов в секторах 1 и 2 ($r = 0{,}3$ при $p < 0{,}05$) и отрицательная корреляция между долей геофитов в секторах 1 и 3 ($r = -0{,}4$ при $p < 0{,}05$).

Вклад стержнекорневых форм в структуре фитоценозов по мере удаления от дорожного полотна уменьшался с 41,3 до 36,6 % (см. рис. 8). Сектор 2 показал снижение доли короткокорневищных форм до 14,4 % и рост доли длиннокорневищных форм до 24,6 % относительно их доли в секторах 1 и 3.

Сравнение экспозиций. Эдафотопическая структура растительности в полосе отвода определялась различиями в деградации почвенного покрова: разрушение почвогрунта вдоль откосов в экспозициях «выемка» и «насыпь» привело к снижению вклада мезотрофов и мезоэвтрофов при росте их вклада в кюветах. Эрозия почвы на откосах сопровождалась увеличением количества олигомезотрофов в 2,4 раза по сравнению с таковым в кювете для экспозиции «выемка». Высокая доля мезоэвтрофов и эвтрофов, вероятно, обусловлена примыканием автодорог к агрофитоценозам.

Доминирование мезофитов объясняется широкой экологической пластичностью и приспособляемостью видов данной группы в условиях антропогенного воздействия, а высокий вклад ксеромезофитов – эрозионными процессами в полосе отвода[8]. Количество ксеромезофитов на откосах и количество гигрофитов, гигромезофитов и мезогигрофитов в кюветах определялось условиями удержания атмосферных осадков. В экспозиции «насыпь» рост доли гигрофитов, гигромезофитов и мезогигрофитов в 2,5; 1,7 и 3,3 раза соответственно по мере удаления от дорожного полотна также связан с длительным переувлажнением почвогрунта в секторе 3.

Во всех экспозициях отмечались снижение вклада терофитов и рост доли гемикриптофитов по мере удаления от дорожного полотна. Особые различия наблюдались в экспозиции «выемка»: количество гемикриптофитов увеличилось в 2,3 раза, а количество терофитов уменьшилось в 1,5 раза. В экспозиции «насыпь» доля гемикриптофитов выросла в 1,5 раза. Влияние древесно-кустарникового яруса привело к увеличению количества макро- и нанофанерофитов на откосах в экспозиции «выемка» в 2,1 раза по сравнению с их количеством в кюветах; в экспозиции «насыпь» в нижней части откосов и у подножия насыпей количество фанерофитов возрастает в 1,8 раза, в экспозиции «нулевое положение» – в 1,9 раза.

Кроме того, во всех экспозициях отмечалось снижение доли стержнекорневых форм растений по мере удаления от автодороги. В экспозициях «выемка» и «насыпь» их количество на откосах в 1,5 и 1,3 раза соответственно превышало количество стержнекорневых форм в секторе 1. В экспозиции «выемка» вклад корневищных и дерновинных форм растений в секторе 4 был в 2,0 раза больше их вклада в секторе 1. В экспозиции «насыпь» эрозия почвы характеризовалась меньшей интенсивностью: количество корневищных и дерновинных форм в секторах 1 и 3 возросло в 1,5 и 1,4 раза соответственно. В экспозиции «нулевое положение» вследствие отсутствия откосов количество данных форм существенно не изменилось. Таким образом, по мере приближения к дорожному полотну увеличивается роль синантропных видов, свойственных терофитам и стержнекорневым формам растений.

[8] *Степановских А. С.* Общая экология : учеб. для вузов по экол. специальностям. М. : Юнити-дана, 2000. 510 с.

Краткие рекомендации по сохранению придорожного газона (в пределах полосы отвода вдоль автомобильных дорог). Предлагаются следующие мероприятия по уходу за полосой отвода.

1. Для снижения доли терофитов и стержнекорневых форм растений в структуре придорожных фитоценозов на протяжении последующего вегетационного сезона следует проводить раннее скашивание в полосе отвода. Периодичность кошения должна составлять не более 3–5 раз за сезон.

2. В состав придорожных травосмесей должны входить длиннокорневищные (*B. inermis*, *E. repens*) и рыхлодерновинные (*D. glomerata*, *Festuca pratensis*, *F. rubra*, *L. perenne*, *Poa pratensis*) злаки, способные формировать придорожный газон в условиях интенсивного антропогенного воздействия вдоль автодорог.

3. Постоянное и интенсивное антропогенное воздействие приводит к постепенной деградации придорожного газона, что вызывает необходимость периодического подсеивания семян предлагаемых видов растений и подсыпания почвогрунта на участках с частотой кошения от 5 и более раз за сезон. Дополнительно данные участки рекомендуется засеивать семенами *C. epigeios* из-за устойчивости и экологической пластичности вида.

Заключение

Состав придорожной флоры вдоль автодорог г. Минска и Минской области насчитывает 267 видов, включая 7 видов мохообразных и 37 видов древесно-кустарниковых растений.

В эдафотопической структуре полосы отвода преобладают мезотрофы и мезоэвтрофы (69,6 % от общего числа видов). В экспозиции «выемка» наблюдается рост количества олигомезотрофов на откосах в 2,4 раза (7,5 %). Степень увлажненности почвогрунта обусловила доминирование мезофитов (61,5 %) с переходом к ксеромезофитам (21,2 %). Общий анализ не выявил существенных различий экологических групп между секторами и экспозициями.

С точки зрения гидротопических условий придорожная флора относится к гемикриптофитно-терофитному типу. По мере приближения к дорожному полотну вклад гемикриптофитов в фитоценозах уменьшается (в 2,3 раза в экспозиции «выемка» и в 1,5 раза в экспозиции «насыпь»), а вклад терофитов увеличивается (в 1,5 раза в экспозиции «выемка»). В экспозиции «нулевое положение» доля терофитов минимальна вследствие отсутствия откосов и полноценно функционирующих выраженных кюветов. По сравнению с секторами 1 всех экспозиций отмечается рост количества фанерофитов на откосах (в экспозициях «выемка» и «насыпь» в 2,1 и 1,8 раза соответственно, в экспозиции «нулевое положение» в 1,9 раза) благодаря использованию древесно-кустарникового яруса в озеленении и (или) естественному заносу.

Стержнекорневые формы растений преобладают вдоль всей полосы отвода со снижением их доли по мере удаления от дорожного полотна. На откосах полосы отвода с наибольшей деградацией почвы доля стержнекорневых форм возрастает в 1,5 раза в экспозиции «выемка» и в 1,3 раза в экспозиции «насыпь». Количество корневищных и дерновинных форм растений по мере удаления от дорожного полотна увеличивалось в 2,0 раза в экспозиции «выемка» и в 1,4–1,5 раза в экспозиции «насыпь». В экспозиции «нулевое положение» различия биоморф между секторами были минимальными.

Учитывая доминирование в составе придорожной растительности терофитов и стержнекорневых форм растений, предлагается проводить раннее скашивание в полосе отвода для снижения их доли в структуре фитоценозов и использовать для озеленения наиболее устойчивые виды длиннокорневищных и рыхлодерновинных злаков, способных формировать дернину и сохранять конструкцию полосы отвода.

Библиографические ссылки

1. Sudnik AV, Voznyachuk IP. On the impact of road construction and maintenance on roadside vegetation. *Science and Innovations.* 2021;11:34–41. Russian. DOI: 10.29235/1818-9857-2021-11-34-41.

2. Шадрин ВА. Орбитоценозы: понятие, структура, особенности. В: Баранова ОГ, Пузырев АН, редакторы. *Проблемы изучения адвентивной и синантропной флор России и стран ближнего зарубежья. Материалы IV Международной научной конференции; 4–7 декабря 2012 г.; Ижевск, Россия.* Ижевск: Институт компьютерных исследований; 2012. с. 227–232.

3. Преображенский ВС, Александрова ТД, редакторы. *Геоэкологические основы территориального проектирования и планирования.* Москва: Наука; 1989. 144 с.

4. Arepieva LA. On new syntaxa of synanthropic vegetation in the city of Bryansk. *Diversity of Plant World.* 2019;2:18–37. Russian. DOI: 10.22281/2686-9713-2019-2-18-37.

5. Telesnina VM, Semenyuk OV. The indicative role of the grass tier in soil-ecological research in the conditions of caring for the green areas of Moscow (case study of the MSU territory). *Bulletin of the Moscow State University. Series 17, Soil Science.* 2022;1:42–51. Russian. EDN: KNGIEG.

6. Telesnina VM, Semenyuk OV, Bogatyrev LG, Benediktova AI. Features of a ground cover and forest litter of artificial lime plantations depending on the nature of care. *Bulletin of the Moscow State University. Series 17, Soil Science.* 2018;2:3–11. Russian. EDN: YSEOHL.

7. Kokorina NV, Bezdenezhnykh IV. Recreative load capacity value on forest stands of natural park «Samarovsky chugas» on field layes. *Agrarian Bulletin of the Urals.* 2009;12:89–91. Russian. EDN: LALTGH.

8. Khmelev KF, Berezutsky MA. State and tendencies in development of floras of man-transformed ecosystems. *Journal of General Biology.* 2001;62(4):339–351. Russian. EDN: MPHZHN.

9. Kurskoy AY, Tokhtar VK. The analysis of synanthropic flora of especially protected natural territories of the southwest of Central Russian Upland. *Fundamental Research.* 2013;11(part 6):1177–1180. Russian. EDN: RUDDUB.

10. Khromova TM. An overview of the flora of the cities of Orel Region and recommendations for improving its condition. *Contemporary Horticulture.* 2018;3:154–162. Russian. DOI: 10.24411/2312-6701-2018-10320.

Получена 08.05.2024 / исправлена 10.05.2024 / принята 13.09.2024.
Received 08.05.2024 / revised 10.05.2024 / accepted 13.09.2024.

Исторические материалы и знаменательные даты

Historical materials and significant dates

УДК 606:579.66 + 579.66’124.24

ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ АЦЕТОНО-БУТИЛОВОГО БРОЖЕНИЯ: К 150-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ Х. ВЕЙЦМАНА, УЧЕНОГО И ПОЛИТИКА, УРОЖЕНЦА БЕЛАРУСИ

***Т. А. ПУЧКОВА*[1)], *В. В. ЛЫСАК*[1)], *С. Л. ВАСИЛЕНКО*[1)]**

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

Аннотация. Х. Вейцман – ученый и государственный деятель, родиной которого является территория, в настоящее время принадлежащая Беларуси. Он вошел в историю мировой биотехнологии, внедрив в промышленность процесс ацетоно-бутилового брожения. В начале XX в. это был крупнейший биотехнологический процесс, уступавший по объему только производству этанола. Одним из продуктов ацетоно-бутилового брожения является бутанол, который может служить альтернативным, возобновляемым источником энергии. Конкурентоспособность микробиологического получения бутанола зависит от мировых цен на нефть и совершенствования процессов его производства.

Ключевые слова: Х. Вейцман; ацетоно-бутиловое брожение; бутанол.

Образец цитирования:
Пучкова ТА, Лысак ВВ, Василенко СЛ. История изучения и перспективы применения ацетоно-бутилового брожения: к 150-летию со дня рождения Х. Вейцмана, ученого и политика, уроженца Беларуси. *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2024;3:82–88.
EDN: RKKRBD

For citation:
Puchkova TA, Lysak VV, Vasylenko SL. History of investigation and prospects for application of acetone – butyl fermentation: to the 150th anniversary of the birth of Ch. Weizmann, scientist, politician, native of Belarus. *Experimental Biology and Biotechnology.* 2024;3:82–88. Russian.
EDN: RKKRBD

Авторы:
Татьяна Антоновна Пучкова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры микробиологии биологического факультета.
Владимир Васильевич Лысак – кандидат биологических наук, доцент; профессор кафедры микробиологии биологического факультета.
Светлана Леонидовна Василенко – кандидат биологических наук; заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета.

Authors:
Tatsiana A. Puchkova, PhD (biology), docent; associate professor at the department of microbiology, faculty of biology.
puchkova@bsu.by
https://orcid.org/0000-0001-9897-8127
Vladimir V. Lysak, PhD (biology), docent; professor at the department of microbiology, faculty of biology.
lysak@bsu.by
https://orcid.org/0009-0007-8241-3034
Svetlana L. Vasylenko, PhD (biology); head of the department of microbiology, faculty of biology.
vasylenko@bsu.by
https://orcid.org/0009-0003-6036-1705

HISTORY OF INVESTIGATION AND PROSPECTS FOR APPLICATION OF ACETONE – BUTYL FERMENTATION: TO THE 150th ANNIVERSARY OF THE BIRTH OF Ch. WEIZMANN, SCIENTIST, POLITICIAN, NATIVE OF BELARUS

***T. A. PUCHKOVA*[a], *V. V. LYSAK*[a], *S. L. VASYLENKO*[a]**

[a]*Belarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*
Corresponding author: T. A. Puchkova (puchkova@bsu.by)

Abstract. Ch. Weizmann is a scientist and statesman whose homeland is the territory that currently belongs to the Belarus. He went down in the history of world biotechnology by introducing the process of acetone – butyl fermentation into industrial production. At the beginning of the 20th century, it was the largest biotechnological process, second in volume only to ethanol production. One of the products of acetone – butyl fermentation is butanol, which can serve as an alternative, renewable source of energy. The competitiveness of microbiological production of butanol depends on world oil prices and the improvement of the processes for its production.

Keywords: Ch. Weizmann; acetone – butyl fermentation; butanol.

Введение

В 2024 г. исполняется 150 лет со дня рождения выдающегося ученого – химика, биохимика и микробиолога Хаима Азриэля Вейцмана (1874–1952). В справочной литературе он в основном упоминается как политик, ставший первым президентом Израиля. Но, перед тем как стать государственным деятелем, Х. Вейцман был известным ученым-химиком, который выделил бактерии – продуценты ацетона и внедрил в промышленность микробиологический процесс его получения. В иностранных публикациях Х. Вейцмана заслуженно считают основоположником промышленного направления микробиологии. Так как все его научные труды опубликованы под именем Чарльз Вейцман (Charles Weizmann), то в русскоязычной литературе по биотехнологии мало информации о том, что он родом с Полесья, территории, относящейся к современной Беларуси.

Данная статья посвящена процессу ацетоно-бутилового брожения, промышленное внедрение которого осуществил Х. Вейцман. Микробиологическое получение ацетона, проводимое в крупных промышленных масштабах, оказалось инновацией, которая не только помогла Великобритании одержать ряд побед в Первой мировой войне, но и во многом способствовала в последующем созданию Государства Израиль[1] [1; 2].

Основная часть

Х. Вейцман (рис. 1) родился 27 ноября 1874 г. в м. Мотоль Кобринского уезда Гродненской губернии (сейчас аг. Мотоль Ивановского района Брестской области). В аг. Мотоль до настоящего времени сохранился дом, в котором когда-то проживала семья Вейцманов. Теперь в нем организован музей (рис. 2). Информации о Х. Вейцмане посвящен стенд в Пинской городской центральной библиотеке.

Стоит отметить, что Х. Вейцман был третьим ребенком в еврейской семье, где росло 15 детей. Его отец служил в конторе по сплаву леса, мать занималась детьми. В семье поддерживалось стремление к наукам. После завершения учебы в начальной еврейской школе (хедере) Х. Вейцман изучал химию в реальном училище в г. Пинске. По окончании училища он продолжил образование в высших учебных заведениях Европы – Дармштадтском политехническом институте и Королевском техническом колледже в г. Берлине (Германия), а также Фрибурском университете (Швейцария). После завершения обучения в 1901 г. Х. Вейцман начал преподавать биохимию в Женевском университете, а в 1904 г. был приглашен в Манчестерский университет, где он занимал должность профессора, читал лекции по биохимии. В 1910 г. Х. Вейцман принял британское подданство[2].

[1] *Шмид Р.* Наглядная биотехнология и генетическая инженерия : справ. изд. / пер. с нем. А. А. Виноградовой, А. А. Синюшина ; под ред. Т. П. Мосоловой, А. А. Синюшина. 3-е изд., испр. М. : Лаборатория знаний, 2019. 324 с.

[2] *Meltzer J. L.* Chaim Weizmann: Israeli president and scientist // Encyclopædia Britannica : website. Chicago, 2024. URL: https://www.britannica.com/biography/Chaim-Weizmann (date of access: 21.06.2024).

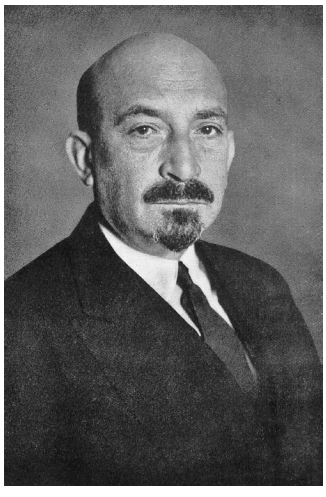


Рис. 1. Х. Вейцман. Фотография. 1925.
Источник: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bd/Dr._Chajim_Weizmann.jpg

Fig. 1. Ch. Weizmann. Photo. 1925.
Source: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bd/Dr._Chajim_Weizmann.jpg

Рис. 2. Дом-музей Х. Вейцмана в аг. Мотоль с фотографиями и вещами семьи.
Источник: https://vmotol.by/spravochnik/muzei/dom-muzey-khaima-veytsmana/

Fig. 2. Weizmann House Museum in Motol with family photos and things.
Source: https://vmotol.by/spravochnik/muzei/dom-muzey-khaima-veytsmana/

Во время работы в Манчестерском университете главным направлением исследований Х. Вейцмана являлось получение синтетического каучука для производства резины, поскольку ресурс сока гевеи, из которого получали натуральный каучук, для растущих потребностей промышленности начала XX в. был ограничен. В лаборатории, где работал Х. Вейцман, проводили исследования процессов бактериального брожения в целях получения изоамилового спирта или бутанола, чтобы затем использовать их для химического синтеза изопрена или бутадиена соответственно – предшественников искусственного каучука. Х. Вейцман отвечал за химическое выделение продуктов брожения. Во время своей работы он обратил внимание на то, что кукуруза при длительном хранении может приобретать запах ацетона. Путем многократных пересевов Х. Вейцман выделил культуру бактерий, которая хорошо синтезировала и накапливала ацетон при ее выращивании на содержащих крахмал питательных средах. Эти бактерии были названы «организм Вейцмана», а затем идентифицированы как *Clostridium acetobutylicum*. В 1915 г. Х. Вейцман получил патент на процесс ацетоно-бутиловой ферментации с использованием *C. acetobutylicum* на содержащей крахмал среде. Это был первый патент, выданный на микробиологический процесс [3–5].

В начале Первой мировой войны Великобритания столкнулась с острой нехваткой ацетона – растворителя, который применялся при производстве бездымного пороха кордита для артиллерийских орудий на флоте. Ацетон получали из ацетата кальция, образующегося при коксовании древесины. До начала Первой мировой войны ацетон производили в основном на территории Австро-Венгрии, где произрастало много лесов. Англичане, воевавшие с Германией, не имели к нему доступа. Запатентовав технологию получения ацетона, Х. Вейцман обратил на себя внимание первого лорда Адмиралтейства Великобритании У. Черчилля и министра вооружений Д. Ллойда Джорджа, которые поручили ему организовать промышленное производство для обеспечения растущих потребностей военной промышленности в данном сырье [3; 4].

Собрав исследовательскую группу, Х. Вейцман разработал и создал экспериментальную установку для получения ацетона на заводе по производству джина на юге Великобритании в 1915 г. Технически процесс ацетоно-бутилового брожения оказался намного сложнее при его осуществлении в крупнотоннажном производстве, чем широко применявшееся в то время спиртовое брожение. Проведение ацетоно-бутилового брожения требовало знаний в области микробиологии для поддержания чистоты культуры бактерий и строгой асептики на производстве. Бактерии культивировались в строго анаэробных условиях. Ацетон нужно было выделить из культуральной жидкости, содержащей смесь веществ – компонентов питательной среды и микробных метаболитов.

Так как при ацетоно-бутиловом брожении, кроме ацетона, образуются еще два коммерчески важных продукта – бутанол и этанол, то в литературе этот процесс сокращенно называют АБЭ-ферментацией [3; 5; 6].

По технологии Вейцмана из 100 т кукурузы можно было получить около 12 т ацетона, который содержал меньше посторонних примесей, чем при химическом синтезе из древесины, и практически не нуждался в дорогостоящей очистке перед дальнейшим использованием. В 1916 г. для промышленного производства ацетона в Великобритании было переоборудовано шесть винокуренных заводов. В качестве компонента питательной среды для *C. acetobutylicum* требовалось много крахмала, который получали из зерен кукурузы. Когда ее запасов было недостаточно, использовали непищевые источники – плоды конского каштана. Для расширения производства ацетона построили несколько заводов в Канаде и США. После заключения перемирия в 1918 г. часть заводов по производству ацетона были остановлены. В мирное время ацетон применяли в промышленности как растворитель и чистящее средство [4].

В годы Первой мировой войны технология Вейцмана приобрела в Великобритании статус национальной важности. Всего с 1915 по 1918 г. было произведено более 30 тыс. т ацетона. Впервые в крупных промышленных масштабах вместо химических технологий для получения органических веществ начали использовать микробиологический процесс, поэтому разработчик промышленной технологии ацетонобутилового брожения химик Х. Вейцман в научной литературе считается одним из основателей промышленной микробиологии[3] [1; 4].

После окончания Первой мировой войны коммерчески более важным продуктом АБЭ-ферментации стал бутанол. В основном он применялся в США для производства быстросохнущих лаков для автомобильной промышленности. В 1927 г. на двух заводах в США работало в общей сложности 148 ферментеров емкостью 190 м^3 каждый. Во время Второй мировой войны военно-воздушные силы Великобритании и Японии использовали полученный при микробном синтезе бутанол в качестве топлива для самолетов [7].

В 1930-х гг. к моменту истечения срока действия патента Х. Вейцмана в разных странах начали создаваться предприятия по производству бутанола. Этому способствовала возможность использования бутанола как растворителя. В СССР исследованием процессов ацетоно-бутилового брожения занимался В. Н. Шапошников, а завод по производству ацетона и бутанола начал работу в 1935 г. в г. Грозном[4]. Примерно в это же время выделили штаммы *C. acetobutylicum*, сбраживающие отходы производства сахара (мелассу) и продуцирующие из них более высокие концентрации растворителей, чем ранее из кукурузного крахмала.

Во время Второй мировой войны Х. Вейцман являлся почетным советником Министерства снабжения Великобритании, а также проводил исследования синтетического каучука и высокооктановых соединений бензина. Получив вознаграждение за патенты, Х. Вейцман стал обеспеченным человеком. За организацию промышленного производства ацетона в годы Первой мировой войны к нему благосклонно относилось британское правительство [4].

Еще во время учебы в Германии Х. Вейцман заинтересовался сионистскими идеями Т. Герцля. После Первой мировой войны Х. Вейцман занял пост президента Всемирной сионистской организации. Общаясь с представителями правящих кругов Великобритании, он продвигал идею создания еврейского государства. Считается, что Х. Вейцман сыграл ключевую роль в дискуссиях с британским правительством, которые привели к принятию декларации Бальфура в ноябре 1917 г. В ней было рекомендовано создать еврейское государство в Палестине, территория которой тогда относилась к Османской империи. Геополитические идеи Х. Вейцмана были поддержаны и другими еврейскими учеными, внесшими неоценимый вклад в современную науку, в частности А. Эйнштейном (рис. 3). Личность Х. Вейцмана и его научные исследования во многом способствовали возникновению Государства Израиль, где он стал первым президентом (1949–1952) [1; 2].

Рис. 3. А. Эйнштейн и Х. Вейцман. Фотография. 1925.
Источник: [2]

Fig. 3. A. Einstein and Ch. Weizmann. Photo. 1925.
Source: [2]

[3] *Meltzer J. L.* Chaim Weizmann: Israeli president and scientist // Encyclopædia Britannica : website. Chicago, 2024. URL: https://www.britannica.com/biography/Chaim-Weizmann (date of access: 21.06.2024).

[4] *Воробьева Л. И.* Промышленная микробиология : учеб. пособие. М. : Изд-во МГУ, 1989. 294 с.

Уже будучи президентом Израиля, Х. Вейцман основал в г. Реховоте научный институт фундаментальных исследований, первоначально называвшийся Исследовательским институтом имени Даниэля Зифа (*Daniel Sieff Research Institute*) (рис. 4). До конца жизни оставаясь ученым, Х. Вейцман видел в науке большие перспективы для развития Израиля и других государств региона. В лабораториях института Х. Вейцман активно проводил исследования в области органической химии. В 1949 г. исследовательский институт в г. Реховоте был переименован в Научный институт Вейцмана (*Weizmann Institute of Science*) [4]. В его структуру входят 5 факультетов (математики и информатики, физики, химии, биохимии и биологии), которые разделены на 20 научных кафедр. Чтобы стимулировать междисциплинарное сотрудничество и появление новых областей исследований, в учреждении функционирует около 100 многопрофильных исследовательских институтов и центров, которые занимаются научной деятельностью в самых разных областях.

Рис. 4. Научный институт Вейцмана в г. Реховоте (Израиль).
Источник: https://www.weizmann-usa.org/news-media/news-releases/weizmann-institute-of-science-ranked-eighth-in-the-world-for-research-quality/

Fig. 4. Weizmann Institute of Science in Rehovot (Israel).
Source: https://www.weizmann-usa.org/news-media/news-releases/weizmann-institute-of-science-ranked-eighth-in-the-world-for-research-quality/

Предприятия по производству биобутанола работали во многих странах мира до конца 1960-х гг., а в СССР, Китае, ЮАР и Бразилии до конца 1980-х гг. В качестве источников сырья для приготовления питательных сред использовалась кукурузная, пшеничная, ржаная мука или меласса [6; 8].

Начиная с 1960-х гг. в связи с развитием химической промышленности и установлением в мире низких цен на нефть микробиологическое производство ацетона и бутанола уступило место их химическому синтезу из нефти.

На территории СССР до конца 1980-х гг. работали восемь заводов по производству бутанола на основе микробной ферментации. Процесс получения бутанола велся на высоком научном уровне. Так, на Докшукинском ацетоно-бутаноловом заводе функционировала центральная научно-исследовательская лаборатория, где поддерживали коллекцию промышленных штаммов бактерий рода *Clostridium*. Эти микроорганизмы сотрудники лаборатории выделяли своими силами и далее проводили селекцию микробных культур в целях повышения их продуктивности, обеспечения возможности использования недорогих, доступных субстратов для промышленного культивирования бактерий, а также осуществляли отбор штаммов по устойчивости к бактериофагам. В качестве компонентов питательных сред на предприятии сначала использовали зерновой крахмал и мелассу. Затем стали проводить кислотный гидролиз сельскохозяйственных лигноцеллюлозных отходов, что увеличило количество сырья для производства. Если в европейских странах и США бутанол получали периодическим способом, то в СССР начали применять более производительный процесс непрерывно-проточного культивирования. Его проводили в нескольких соединенных батареях бродильных емкостей объемом 250–275 м^3 каждая. После выделения растворителей находили применение побочным продуктам и отходам производства. Отходы бражки после отгонки растворителей на одних предприятиях использовали для выращивания кормовых дрожжей, а на других – для получения кормового витамина B_{12} путем термофильного метаногенеза, что способствовало повышению рентабельности процесса. Углекислый газ, выделяющийся при ацетоно-бутиловом брожении, собирали и получали жидкую углекислоту и сухой лед [9].

В связи с распадом СССР и появлением более дешевых альтернативных нефтехимических процессов все ацетоно-бутаноловые заводы были закрыты в конце 1980-х гг.[5] [10].

В Китае процесс АБЭ-ферментации впервые организовали в 1950-х гг. Своего пика он достиг в 1980-х гг. и завершился к 2000 г. На заводах использовали местные штаммы и применяли процесс непрерывного культивирования бактерий, который мог длиться без остановок на стерилизацию и загрузку в течение примерно 170–480 ч. Обычно на заводах размещалось несколько линий, включающих до восьми последовательно соединенных бродильных резервуаров объемом 300–400 м^3. После окончания брожения для извлечения ацетона, бутанола и этанола использовали перегонку. Из 100 кг кукурузного крахмала получали 11,0 кг ацетона, 22,5 кг бутанола и 2,7 кг этанола. Выделяющийся при анаэробном сбраживании отходов биогаз использовали для выработки тепла и электроэнергии. В последнее десятилетие в Китае построено или реконструировано более десяти заводов для возобновления АБЭ-ферментации и производства бутанола. Ученые работают над получением мутантных штаммов, способных к производству растворителей из лигноцеллюлозной биомассы, в частности из сельскохозяйственных отходов. В настоящий момент в Китае существует потребность в более дешевом сырье для различных отраслей промышленного производства, что, в свою очередь, ведет к совершенствованию процесса ферментации (разработке нового технологического оборудования, получению новых штаммов-сверхпродуцентов и т. п.) и способов выделения растворителей. Общий объем микробиологического производства растворителей на заводах в Китае может составить около 1 млн т в год при использовании всех реконструированных и вновь созданных производств для проведения АБЭ-ферментации [6; 8].

В настоящее время ежегодный объем производства бутанола оценивается примерно в 5–10 млн т [8]. Бутанол широко применяется в химической и фармацевтической промышленности в качестве растворителя или сырья для химического синтеза различных веществ (вискозы, нитроцеллюлозы, пластификаторов, покрытий, моющих средств, тормозных жидкостей, бутадиена для производства синтетического каучука). Также его используют как растворитель в лакокрасочной промышленности. Поскольку сегодня особым приоритетом пользуется производство биоразлагаемых полимеров и полимеров со специфическими свойствами, то направления применения бутанола будут расширяться [8; 11].

В последние годы растет обеспокоенность ученых, с одной стороны, перспективами снижения мировых запасов нефти и роста цен на нее, а с другой стороны, вредными экологическими последствиями сжигания ископаемого топлива (выбросы в атмосферу углекислого и угарного газов, глобальное потепление). Все это стимулирует интерес к микробиологическому получению бутанола как возобновляемого источника энергии. Бутанол рассматривают в качестве перспективного вида топлива для автомобильных двигателей: он негигроскопичен, нелетуч, при горении выделяет много энергии, имеет низкую коррозийную активность, близкое к бензину октановое число, в его выхлопах не содержатся оксиды серы и азота. Кроме того, бутанол можно смешивать с бензиновым топливом в любом соотношении без необходимости модификации двигателей транспортных средств, а также транспортировать и хранить в существующей инфраструктуре трубопроводов и резервуаров [6; 8; 10; 12–14].

Конкурентоспособность микробиологического производства бутанола напрямую зависит от цен на нефть. Повышению конкурентоспособности биотехнологий относительно конкурентоспособности химического синтеза будут содействовать получение продуктивных генетически модифицированных штаммов, способных расти на субстратах из лигноцеллюлозных отходов, совершенствование методов культивирования бактерий и выделения бутанола из растворов [13; 15–17].

Заключение

Таким образом, Х. Вейцман вошел в историю как политический деятель, а в первую очередь как ученый, один из основоположников промышленной микробиологии и биотехнологии, разработавший и внедривший в промышленное производство технологию ацетоно-бутилового брожения, которое в начале XX в. являлось крупнейшим биотехнологическим процессом, уступавшим по объему только производству этанола. Весь прошлый век микробное получение ацетона и бутанола активно развивалось, но в связи со значительным удешевлением использования нефти для их производства на время потеряло свою актуальность. Большинство заводов были перепрофилированы. В настоящий момент технологии на основе АБЭ-ферментации снова стали весьма актуальными и конкурентоспособными, так как запасы нефти не являются безграничными, ученые научились эффективно конструировать штаммы – сверхпродуценты нужных субстанций и возросла востребованность данных веществ для различных промышленных производств. Личность Х. Вейцмана и результаты его научных исследований во многом способствовали возникновению Государства Израиль.

[5] *Воробьева Л. И.* Промышленная микробиология… 294 с.

Библиографические ссылки

1. Adams MR. The birth of modern industrial microbiology: the acetone – butanol fermentation. *The International Journal for the History of Engineering & Technology.* 2017;87(1):81–95. DOI: 10.1080/17581206.2017.1329970.

2. Kauffman GB, Mayo I. Chaim Weizmann (1874–1952): chemist, biotechnologist, and statesman. The fateful interweaving of political conviction and scientific talent. *Journal of Chemical Education.* 1994;71(3):209–214. DOI: 10.1021/ed071p209.

3. Jones DT, Woods DR. Acetone – butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews.* 1986;50(4):484–524. DOI: 10.1128/MMBR.50.4.484-524.1986.

4. Bunch AW. How biotechnology helped maintain the supply of acetone for the manufacture of cordite during World War I. *The International Journal for the History of Engineering & Technology.* 2014;84(2):211–226. DOI: 10.1179/1758120614Z.00000000043.

5. Sauer M. Industrial production of acetone and butanol by fermentation – 100 years later. *FEMS Microbiology Letters.* 2016; 363(13):fnw134. DOI: 10.1093/femsle/fnw134.

6. Green EM. Fermentative production of butanol – the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology.* 2011;22(3): 337–343. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.02.004.

7. Janssen H, Wang Y, Blaschek HP. *Clostridium acetobutylicum*. In: Batt CA, Tortorello ML, editors. *Encyclopedia of food microbiology. Volume 1*. 2nd edition. Amsterdam: Academic Press; 2014. p. 449–457. DOI: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00070-7.

8. Ni Y, Sun Z. Recent progress on industrial fermentative production of acetone – butanol – ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2009;83(3):415–423. DOI: 10.1007/s00253-009-2003-y.

9. Zverlov VV, Berezina O, Velikodvorskaya GA, Schwarz WH. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2006;71(5): 587–597. DOI: 10.1007/s00253-006-0445-z.

10. Dürre P. Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnology Journal.* 2007;2(12):1525–1534. DOI: 10.1002/biot.200700168.

11. Lee SY, Park JH, Jang SH, Nielsen LK, Kim J, Jung KS. Fermentative butanol production by clostridia. *Biotechnology and Bioengineering.* 2008;101(2):209–228. DOI: 10.1002/bit.22003.

12. Болотник ЕВ, Литвинович НЕ, Коломиец ЭИ. Ацетоно-бутиловое брожение как основа получения нового вида топлива из возобновляемого сырья. В: Коломиец ЭИ, Лобанок АГ, Ившина ИБ, Зинченко АИ, Галушко ВМ, Михайлова РВ и др., редакторы. *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Том 5*. Минск: Беларуская навука; 2013. с. 411–429.

13. Moon HG, Jang Y-S, Cho C, Lee J, Binkley R, Lee SY. One hundred years of clostridial butanol fermentation. *FEMS Microbiology Letters.* 2016;363(3):fnw001. DOI: 10.1093/femsle/fnw001.

14. Xue C, Zhao J, Chen L, Yang S-T, Bai F. Recent advances and state-of-the-art strategies in strain and process engineering for biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Advances*. 2017;35(2):310–322. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.01.007.

15. Lin Z, Cong W, Zhang J. Biobutanol production from acetone – butanol – ethanol fermentation: developments and prospects. *Fermentation.* 2023;9(9):847. DOI: 10.3390/fermentation9090847.

16. Lee J, Jang Y-S, Choi SJ, Im JA, Song H, Cho JH, et al. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for isopropanol – butanol – ethanol fermentation. *Applied and Environmental Microbiology.* 2012;78(5):1416–1423. DOI: 10.1128/AEM.06382-11.

17. Hussain A, Liao H, Ahmad K, Ahsan M, Hussain MI, Iqbal MW, et al. Bacterial metabolic engineering for the production of second-generation (2G) bioethanol and biobutanol: a review. *Journal of Applied Microbiology.* 2023;134(2):lxac061. DOI: 10.1093/jambio/lxac061.

Получена 19.08.2024 / исправлена 03.09.2024 / принята 03.09.2024.
Received 19.08.2024 / revised 03.09.2024 / accepted 03.09.2024.

Краткие сообщения

Short communications

УДК 595.799(476)

ПЕРВАЯ НАХОДКА ПЧЕЛЫ *CERATINA CHALYBEA* CHEVRIER, 1872 В БЕЛАРУСИ

***А. А. ШЕЙКО*[1)], *Д. О. КОРОТЕЕВА*[1)]**

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

Аннотация. Приводятся данные о первой находке вида *Ceratina chalybea* Chevrier, 1872 (Hymenoptera: Apidae) на территории Национального парка «Нарочанский» (Беларусь).

Ключевые слова: *Ceratina chalybea*; Hymenoptera; первая регистрация; охраняемые территории; Беларусь.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Природные ресурсы и окружающая среда» на 2021–2025 гг. (№ гос. регистрации 20211658).

FIRST RECORD OF BEE *CERATINA CHALYBEA* CHEVRIER, 1872 IN BELARUS

***A. A. SHEIKO*[a], *D. O. KOROTEEVA*[a]**

[a]*Belarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*
Corresponding author: A. A. Sheiko (sheiko7091@gmail.com)

Abstract. The first record of *Ceratina chalybea* Chevrier, 1872 (Hymenoptera: Apidae) in the territory of the National Park «Narochansky» (Belarus) is given.

Keywords: *Ceratina chalybea*; Hymenoptera; first registration; nature reserve; Belarus.

Acknowledgements. This work was carried out within the framework of the state programme of scientific research «Natural resources and environment» for 2021–2025 (state registration No. 20211658).

Образец цитирования:
Шейко АА, Коротеева ДО. Первая находка пчелы *Ceratina chalybea* Chevrier, 1872 в Беларуси. *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2024;3:89–91.
EDN: VIXKMW

For citation:
Sheiko AA, Koroteeva DO. First record of bee *Ceratina chalybea* Chevrier, 1872 in Belarus. *Experimental Biology and Biotechnology.* 2024;3:89–91. Russian.
EDN: VIXKMW

Авторы:
Анна Александровна Шейко – младший научный сотрудник кафедры зоологии биологического факультета.
Дарья Олеговна Коротеева – старший преподаватель, младший научный сотрудник кафедры зоологии биологического факультета.

Authors:
Anna A. Sheiko, junior researcher at the department of zoology, faculty of biology.
sheiko7091@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-2519-5089
Daria O. Koroteeva, senior lecturer and junior researcher at the department of zoology, faculty of biology.
daryakoroteeva1996@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-3010-6573

CC BY NC

Введение

Род *Ceratina* Latreille, 1802 относится к семейству Apidae, подсемейству Xylocopinae, трибе Ceratinini и включает в себя в Палеарктике 67 видов [1, p. 310]. В Беларуси он представлен 1 видом – *C. cyanea* (Kirby, 1802)[1]. Пчелы этого рода гнездятся в сердцевинах мертвых стеблей растений, формируя неразветвленные гнезда. Традиционно они считаются одиночными пчелами, однако у некоторых видов было зафиксировано восстановление гнезд самками, а также разделение труда взрослых самок в одном и том же гнезде. Представители данного рода – полилекты, питающиеся на широком спектре цветковых растений [2, p. 611–612].

Основная часть

Экземпляр был коллектирован вручную с ястребиночки обыкновенной (*Pilosella officinarum* F. W. Schultz et Sch. Bip.) во время полевых сборов по изучению антофильных перепончатокрылых – опылителей цветковых растений Национального парка «Нарочанский». Он хранится на кафедре зоологии биологического факультета БГУ (Минск, Беларусь).

Hymenoptera
Apidae: Xylocopinae: Ceratinini
Ceratina Latreille, 1802
Ceratina (Euceratina) chalybea Chevrier, 1872

Материал: 1♀, место сбора – Минская область, Мядельский район, суходольный луг недалеко от оз. Рудаково, 54° 53′ 38,5″ с. ш., 26° 53′ 40,2″ в. д., дата сбора – 12.06.2021 г., коллектор – А. А. Шейко.

Принадлежность экземпляра к виду *C. chalybea* была установлена по ряду характерных признаков, указанных в определительном ключе [3]. Отличительными особенностями данного вида являются тело металлически-сине-зеленого цвета, равномерно пунктированный наличник с белой полосой. Верхняя губа и усики черные. Проподеум у основания с морщинистой горизонтальной зоной. Срединное поле непунктированное, гладкое и очень блестящее. Остальная часть промежуточного сегмента снаружи густо пунктированная, к середине более разбросанно пунктированная. Шестой тергит синеватого цвета, килевидный посередине, сильно опушенный, край по бокам зазубренный. Ноги голубоватые, голени и лапки черные.

Основным дистинктивным признаком, отличающим вид *C. chalybea* от отмеченного ранее на территории Беларуси вида *C. cyanea*, является наличие отчетливого светлого пятна на наличнике (для *C. cyanea* характерен полностью черный наличник или наличник с небольшим светлым пятном) [3].

Изображения коллектированного экземпляра представлены на рис. 1.

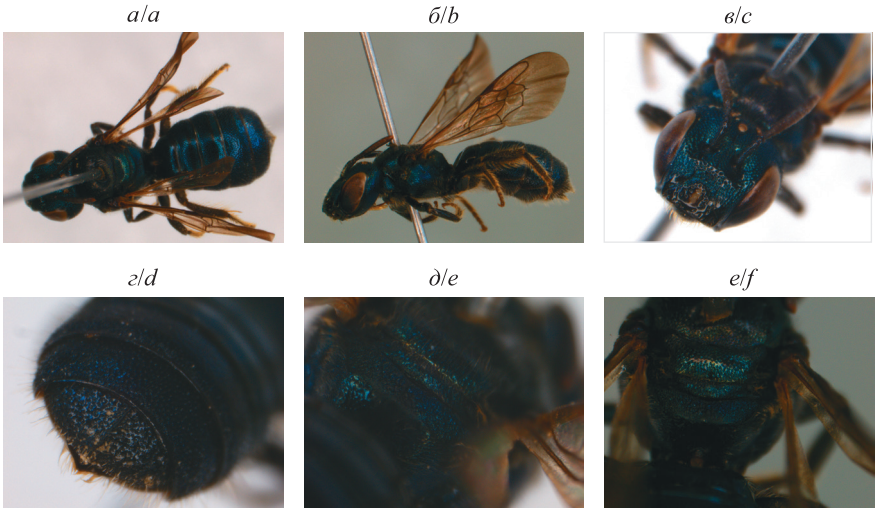


Рис. 1. Коллектированный экземпляр *C. chalybea* (имаго, самка):
а, *б* – общий вид; *в* – наличник; *г* – 6-й тергит; *д* – вертикальная часть промежуточного сегмента;
е – горизонтальная часть промежуточного сегмента

Fig. 1. Collected specimen of *C. chalybea* (adult, female):
a, *b* – general view; *c* – clypeus; *d* – 6th tergite; *e* – vertical part of propodeum;
f – horizontal part of propodeum

[1] *Прищепчик О. В.* Фауна и экология пчелиных (Hymenoptera, Apoidea) Минской возвышенности : автореф. дис. … канд. биол. наук : 03.00.09. Прилуки, 2000. 20 с.

Пчела *C. chalybea* – средиземноморский вид, встречающийся от атлантического побережья Португалии и Атласских гор Марокко до Каспийского моря. Данный вид представлен на Корсике, Сицилии и Крите, но отсутствует на Балеарских островах, Сардинии и Кипре. На севере его распространение простирается от северной Франции и южной Германии до юга европейской части России через Центральную Европу[2] (рис. 2). В России вид обитает в центральной, южной и восточной частях страны, встречается на Северном Кавказе. Также он распространен в Северной Африке, Абхазии, Грузии, Азербайджане, Турции, Иордании и Казахстане [1, p. 310].

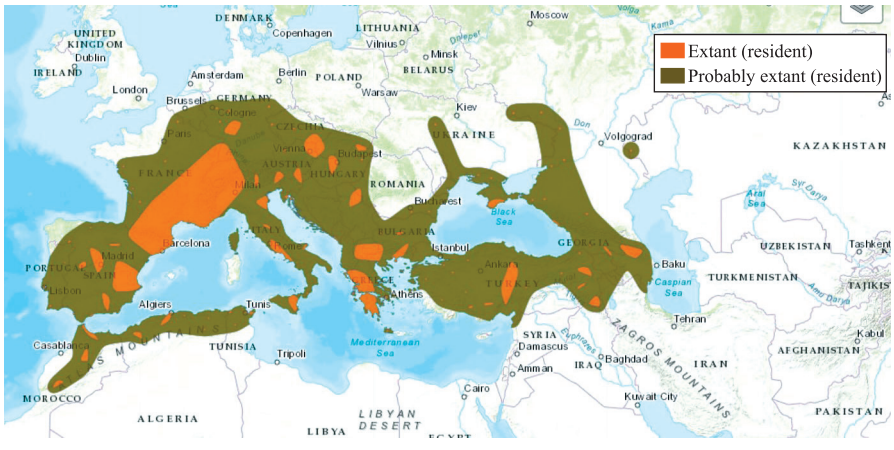


Рис. 2. Распространение вида *C. chalybea* в Европе и на сопредельных территориях
(extant (resident) – обитает на выделенной территории;
probably extant (resident) – вероятно, обитает на выделенной территории).
И с т о ч н и к: https://www.iucnredlist.org/species/13318663/13321476

Fig. 2. Distribution of *C. chalybea* in Europe and adjacent territories.
S o u r c e: https://www.iucnredlist.org/species/13318663/13321476

Статус вида в Красной книге Международного союза охраны природы – «least concern» («вызывающие наименьшие опасения»)[3].

Библиографические ссылки

1. Belokobylskij 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.

2. Michener CD. *The bees of the world.* 2nd edition. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 2007. XVI, 953 p.

3. Scheuchl E. *Illustrierte Bestimmungstabellen der Wildbienen Deutschlands und Österreichs. Band 1, Schlüssel der Gattungen und der Arten der Familie Anthophoridae.* 2. Auflage. Velden: Eigenverlag; 2000. XXXI, 158 S.

Получена 19.06.2024 / исправлена 27.08.2024 / принята 02.09.2024.
Received 19.06.2024 / revised 27.08.2024 / accepted 02.09.2024.

[2] *Terzo M., Nieto A. Ceratina chalybea* (Europe assessment) // The IUCN Red List of Threatened Species : website. Cambridge, 2013. URL: https://www.iucnredlist.org/species/13318663/13321476 (date of access: 09.01.2024).

[3] Ibid.

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

УДК 57:004.032.045(075.8)
Бондаренко В. Ю. **Программирование на Python в биологии** [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 6-05-0511-05 «Биоинженерия и биоинформатика» / В. Ю. Бондаренко ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2024. 68 с. : ил. Библиогр.: с. 67–68. Режим доступа: https://elib.bsu.by/handle/123456789/314531. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 24.06.2024, № 010124062024.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов 1-й ступени высшего образования специальности 6-05-0511-05 «Биоинженерия и биоинформатика». Содержание ЭУМК посвящено формированию у студентов целостной системы знаний по применению языка программирования Python для решения задач биологии и биоинформатики.

УДК 575(075.8)
Левыкина С. С. **Анализ биологических последовательностей** [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 04 «Биоинженерия и биоинформатика» / С. С. Левыкина ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2024. 47 с. Библиогр.: с. 47. Режим доступа: https://elib.bsu.by/handle/123456789/315761. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 04.07.2024, № 010904072024.

Электронный учебно-методический комплекс предназначен для студентов специальности 1-31 01 04 «Биоинженерия и биоинформатика», он включает в себя следующие разделы: теоретический, контроля знаний и вспомогательный, содержащий учебно-программные материалы и список рекомендованной литературы. Курс «Анализ биологических последовательностей» предполагает изучение общих вопросов, касающихся структуры биологических последовательностей и методов работы с ними.

УДК 577.1(075.8) + 577.2(075.8)
Биохимия и структурная биология [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец.: 6-05-0511-05 «Биоинженерия и биоинформатика», 1-31 01 04 «Биоинженерия и биоинформатика» / БГУ ; сост.: Т. А. Кукулянская, Н. М. Орёл. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2024. 243 с. : ил., табл. Библиогр.: с. 242–243. Режим доступа: https://elib.bsu.by/handle/123456789/320361. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 11.10.2024, № 014311102024.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальностей 6-05-0511-05 «Биоинженерия и биоинформатика» и 1-31 01 04 «Биоинженерия и биоинформатика» биологического факультета Белорусского государственного университета. Содержание ЭУМК предполагает изучение следующих вопросов: структурной организации и особенностей метаболизма белков, нуклеиновых кислот, моно- и полисахаридов, липидов, структуры и функциональной активности ферментов, витаминов, общих механизмов гормональной регуляции.

УДК 577.1(075.8)
Биохимия [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец.: 6-05-0511-01 «Биология», 6-05-0511-03 «Микробиология», 6-05-0521-01 «Экология», 7-07-0511-01 «Фундаментальная и прикладная биотехнология» / БГУ ; сост.: Т. А. Кукулянская, Н. М. Орёл. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2024. 215 с. : ил., табл. Библиогр.: с. 214–215. Режим доступа: https://elib.bsu.by/handle/123456789/320369. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 11.10.2024, № 014411102024.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальностей 6-05-0511-01 «Биология», 6-05-0511-03 «Микробиология», 6-05-0521-01 «Экология», 7-07-0511-01 «Фундаментальная и прикладная биотехнология» биологического факультета Белорусского государственного университета. Содержание ЭУМК предполагает изучение следующих вопросов: структуры и функций макромолекул и биополимеров, метаболизма основных классов соединений, основных принципов и механизмов регуляции метаболических процессов.

УДК 578(075.8)
Русь О. Б. **Вирусология** [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс с креативным компонентом для спец.: 6-05-0511-01 «Биология», 6-05-0511-02 «Биохимия», 6-05-0511-03 «Микробиология», 6-05-0511-05 «Биоинженерия и биоинформатика», 6-05-0511-06 «Биотехнология», 7-07-0511-06 «Фундаментальная и прикладная биотехнология» / О. Б. Русь, А. Н. Евтушенков ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2024. 241 с. : ил., табл. Библиогр.: с. 224–225, 240–241. Режим доступа: https://elib.bsu.by/handle/123456789/320649. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 21.10.2024, № 015221102024.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) с креативным компонентом предназначен для студентов специальностей 6-05-0511-01 «Биология», 6-05-0511-02 «Биохимия», 6-05-0511-03 «Микробиология», 6-05-0511-05 «Биоинженерия и биоинформатика», 6-05-0511-06 «Биотехнология», 7-07-0511-06 «Фундаментальная и прикладная биотехнология». Содержание ЭУМК предполагает изучение теоретических основ и достижений классической и новейшей вирусологии. ЭУМК включает также лабораторный практикум по вирусологии, позволяющий получить навыки работы с бактериофагами. Раздел контроля знаний призван облегчить подготовку к итоговой аттестации по дисциплине.

СОДЕРЖАНИЕ

ФИЗИОЛОГИЯ И КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

Потапович А. И., Костюк Т. В., Шутова Т. Г., Костюк В. А. Получение полидисперсных наночастиц зеина, содержащих кверцетин, и оценка их биологической активности 4

Курьянчик Т. Г., Козел Н. В. Влияние прайминга семян 5-аминолевулиновой кислотой на адаптацию фотосинтетического аппарата растений ячменя к почвенной засухе 10

БИОХИМИЯ

Приступа К. В., Кукулянская Т. А., Храмцова Е. А. Изучение активности некоторых антиоксидантных ферментов в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях абиотического стресса 22

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

Шао Чэнюе, Евтушенков А. Н. Пектатлиазная активность разных видов пектобактерий при заражении стеблей и клубней картофеля 30

Евдокимова О. В., Охремчук А. Э., Охремчук Е. В., Дормешкин Д. О., Валентович Л. Н. Создание штаммов бактерий *Lactococcus lactis*, синтезирующих белок S или рецепторсвязывающий домен вируса SARS-CoV-2 37

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Керезь М. А., Богатенкова Д. А., Вшивкова О. С., Мелешко А. Н. Анализ точек разрыва при делециях гена *IKZF1* у пациентов с острым лимфобластным лейкозом из В-клеток-предшественников 50

Песоцкая К. Ю., Лагоненко А. Л., Евтушенков А. Н. Фенотипическая характеристика фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora*, мутантных по гену *bssS* 59

ЭКОЛОГИЯ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ

Шавалда Е. С., Судник А. В. Эколого-биоморфологическая структура придорожной растительности вдоль автомобильных дорог г. Минска и Минской области 69

ИСТОРИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ

Пучкова Т. А., Лысак В. В., Василенко С. Л. История изучения и перспективы применения ацетоно-бутилового брожения: к 150-летию со дня рождения Х. Вейцмана, ученого и политика, уроженца Беларуси 82

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Шейко А. А., Коротеева Д. О. Первая находка пчелы *Ceratina chalybea* Chevrier, 1872 в Беларуси 89

Аннотации депонированных в БГУ работ 92

CONTENTS

PHYSIOLOGY AND CELL BIOLOGY

Potapovich A. I., Kostyuk T. V., Shutava T. G., Kostyuk V. A. Obtaining and assessing the biological activity of quercetin included in polydisperse nanoparticles of zein 4

Kuryanchyk T. G., Kozel N. V. Influence of seed priming with 5-aminolevulinic acid on adaptation of the photosynthetic apparatus of barley plants to soil drought 10

BIOCHEMISTRY

Pristupa K. V., Kukulianskaya T. A., Khramtsova E. A. The study of activity of several antioxidant enzymes in transgenic plants *Nicotiana tabacum* under abiotic stress conditions 22

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

Shao Chengyue, Evtushenkov A. N. Pectate lyase activity of different species of pectobacteria when infecting potato stems and tubers 30

Evdokimova O. V., Akhremchuk A. E., Akhremchuk K. U., Dormeshkin D. O., Valentovich L. N. Design of *Lactococcus lactis* strains producing S protein or receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 virus 37

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

Keraz M. A., Bogatenkova D. A., Vshyukova V. S., Meleshko A. N. Breakpoint analysis of *IKZF1* gene deletions in patients with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia 50

Pesotskaya K. Yu., Lagonenko A. L., Evtushenkov A. N. Phenotypic characteristics of *bssS* mutant of phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora* 59

ECOLOGY AND CONSERVANCY

Shavalda Ya. S., Sudnik A. V. Ecological-biomorphological structure of roadside vegetation along the highways of Minsk and the Minsk Region 69

HISTORICAL MATERIALS AND SIGNIFICANT DATES

Puchkova T. A., Lysak V. V., Vasylenko S. L. History of investigation and prospects for application of acetone – butyl fermentation: to the 150th anniversary of the birth of Ch. Weizmann, scientist, politician, native of Belarus 82

SHORT COMMUNICATIONS

Sheiko A. A., Koroteeva D. O. First record of bee *Ceratina chalybea* Chevrier, 1872 in Belarus 89

Indicative abstracts of the papers deposited in BSU 92

Журнал включен Высшей аттестационной комиссией Республики Беларусь в Перечень научных изданий для опубликования результатов диссертационных исследований по биологическим наукам.

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

Экспериментальная биология и биотехнология. № 3. 2024

Учредитель:
Белорусский государственный университет

Юридический адрес: пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь.
Почтовый адрес: пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь.
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».

Редактор *О. А. Семенец*
Технический редактор *В. В. Пишкова*
Корректор *Л. А. Меркуль*

Подписано в печать 31.10.2024.
Тираж 60 экз. Заказ 1051.

Республиканское унитарное предприятие «СтройМедиаПроект».
ЛП № 02330/71 от 23.01.2014.
Ул. В. Хоружей, 13/61, 220123, г. Минск, Республика Беларусь.

© БГУ, 2024

Experimental Biology and Biotechnology. No. 3. 2024

Founder:
Belarusian State University

Registered address: 4 Niezaliezhnasci Ave., Minsk 220030, Republic of Belarus.
Correspondence address: 4 Niezaliezhnasci Ave., Minsk 220030, Republic of Belarus.
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».

Editor *O. A. Semenets*
Technical editor *V. V. Pishkova*
Proofreader *L. A. Merkul'*

Signed print 31.10.2024.
Edition 60 copies. Order number 1051.

Republic Unitary Enterprise «StroiMediaProekt».
License for publishing No. 02330/71, 23 January, 2014.
13/61 V. Haruzhaj Str., Minsk 220123, Republic of Belarus.

© BSU, 2024