



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

2025

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.
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.
Yu Min	International Research Centre for Environmental Membrane Biology, Foshan University, Foshan, China.

Физиология и клеточная биология

PHYSIOLOGY AND CELL BIOLOGY

УДК 577.352.46

РЕГУЛЯЦИЯ КАТИОННЫХ ТОКОВ ЧЕРЕЗ ПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ КЛЕТОК КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДОВ МЕДИ, ЖЕЛЕЗА И ТИТАНА

П. В. ГРИУСЕВИЧ¹⁾, В. Е. АРТИШЕВСКАЯ¹⁾, М. А. МЫСЛЕЙКО²⁾,
А. И. СОКОЛИК¹⁾, Н. Л. ПШИБЫТКО¹⁾, И. И. СМОЛИЧ¹⁾, В. В. ДЕМИДЧИК²⁾

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

²⁾Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Разработка и использование экологически безопасных и высокоэффективных форм удобрений на основе наночастиц являются важными задачами современной экспериментальной биологии растений. В данной области одним из актуальных вопросов выступает оценка влияния металлсодержащих наночастиц, таких как оксиды меди, железа и титана, на функционирование мембранных систем ионного транспорта в корнях высших растений. В рамках настоящей работы с использованием техники локальной фиксации потенциала (пэтч-кламп) исследовано воздействие наночастиц CuO, Fe₃O₄ и TiO₂ на функционирование наружувывпрямляющих K⁺-каналов и внутривывпрямляющих Ca²⁺-каналов плазматической мембраны клеток корня *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Продемонстрировано, что наночастицы CuO и TiO₂ в концентрации 300 мг/л ингибируют наружунаправленные K⁺-токи и внутринаправленные Ca²⁺-токи через плазматическую мембрану при воздействии в течение 15 мин. При увеличении времени влияния наночастиц CuO до 30 мин зарегистрирована активация K⁺- и Ca²⁺-токов, что, вероятно, было связано с редокс-зависимой стимуляцией соответствующих групп катионных каналов. Наночастицы Fe₃O₄

Образец цитирования:

Гриусевич ПВ, Артишевская ВЕ, Мыслейко МА, Соколик АИ, Пшибытко НЛ, Смолич ИИ, Демидчик ВВ. Регуляция катионных токов через плазматическую мембрану клеток корня высших растений под действием наночастиц оксидов меди, железа и титана. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2025;3:4–15.
EDN: WQHUTK

For citation:

Hryvusevich PV, Artsisheuskaya VYa, Mysleika MA, Sokolik AI, Pshybytko NL, Smolich II, Demidchik VV. Regulation of cation currents through the plasma membrane of root cells of higher plants under the influence of copper, iron and titanium oxide nanoparticles. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2025;3:4–15. Russian.
EDN: WQHUTK

Сведения об авторах см. на с. 15.

Information about the authors see p. 15.

не вызывали изменений в картине ионных токов через плазматическую мембрану клеток корня. Также эффекты отсутствовали при применении вместо наночастиц соответствующих макрочастиц (балк-форма; более 1 мкм). Наночастицы Fe_3O_4 , как не обладающие мембранотропными эффектами, протестированы в качестве стимуляторов роста в особых культивационных системах малого объема. Показано, что данные наночастицы, начиная с их концентрации в твердой среде свыше 300 мг/л, стимулировали рост растений *A. thaliana*. Этот факт указывает на значительный потенциал их использования в качестве наноудобрений. Полученные данные раскрывают новые закономерности воздействия перспективных наноматериалов на ионтранспортные механизмы мембран клеток корня высших растений, демонстрируя комплексные мембранотропные эффекты от наночастиц CuO и TiO_2 , а также относительную инертность по отношению к клеточным мембранам наночастиц Fe_3O_4 .

Ключевые слова: пэтч-кламп; *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.; калиевые каналы; кальциевые каналы; наночастицы оксидов металлов; наноудобрения.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований в рамках проекта Б25КИ-086, а также задания 2.04.5 «Установление закономерностей токсического воздействия металлосодержащих нанополлютантов атмосферы на физиологические процессы у высших растений» государственной программы научных исследований «Природные ресурсы и окружающая среда» на 2021–2025 гг. (№ гос. регистрации 20211705).

REGULATION OF CATION CURRENTS THROUGH THE PLASMA MEMBRANE OF ROOT CELLS OF HIGHER PLANTS UNDER THE INFLUENCE OF COPPER, IRON AND TITANIUM OXIDE NANOPARTICLES

P. V. HRYVUSEVICH^a, V. Ya. ARTSISHEUSKAYA^a, M. A. MYSLEIKA^b,
A. I. SOKOLIK^a, N. L. PSYBYTKO^a, I. I. SMOLICH^a, V. V. DEMIDCHIK^b

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

^bV. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

Corresponding author: V. V. Demidchik (demidchik@botany.by)

Abstract. The development and use of environmentally friendly and highly effective forms of fertilisers based on nanoparticles are important subjects in modern plant biology. In this area one of the key problems is the assessment of the impact of metal-containing nanoparticles, such as copper, iron and titanium oxides, on the functioning of membrane ion transport systems in root cells of higher plants. In the present work using the local potential clamp method (patch-clamp) the effect of CuO , Fe_3O_4 and TiO_2 nanoparticles on activities of outward-rectifying K^+ channels and inward-rectifying Ca^{2+} channels of the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. root cells were investigated in detail. It was demonstrated that CuO and TiO_2 nanoparticles at a concentration of 300 mg/L inhibited outward K^+ currents and inward Ca^{2+} currents across the plasma membrane, when the time exposure was up to 15 min. With an increase in the exposure time for CuO nanoparticles to 30 min, activation of K^+ and Ca^{2+} currents was recorded, which was probably associated with redox-dependent stimulation of the cation channels. Fe_3O_4 nanoparticles did not cause changes in the pattern of ionic currents through the plasma membrane of root cells. There were also no effects, when using the corresponding macroparticles (bulk form; more than 1 μm) instead of nanoparticles. Fe_3O_4 nanoparticles, which do not have membranotropic effects, were tested as growth stimulants in special small-volume cultivation systems. It was shown that these nanoparticles, starting from their level in the medium of 300 mg/L, stimulated growth of *A. thaliana*. This fact indicates a high potential for their use as nanofertilisers. The obtained data reveal new patterns of the effect of nanomaterials on the ion-transport mechanisms of plant cell membranes, demonstrating significant membranotropic effects of CuO and TiO_2 nanoparticles and relative inertness with respect to cell membranes of Fe_3O_4 nanoparticles.

Keywords: patch-clamp; *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.; potassium channels; calcium channels; metal oxide nanoparticles; nanofertilisers.

Acknowledgements. The work was carried out with financial support from the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research within the framework of project B25KI-086 as well as assignment 2.04.5 «Establishing the patterns of toxic effects of metal-containing atmospheric nanopollutants on physiological processes in higher plants» of the state programme of scientific research «Natural resources and environment» for 2021–2025 (state registration No. 20211705).

Введение

Функционирование корневой системы является основой поддержания всех процессов жизнедеятельности у большинства высших растений. Поглощение воды и минеральных веществ представляет собой одну из важнейших физиологических реакций растительного организма и ключевую функцию тканей корня. Водный и минеральный обмен в значительной степени определяет количество и качество урожая сельскохозяйственных растений, а также лимитирует распространение видов дикой флоры. В основе водного и минерального обмена лежит свойство полупроницаемости биологических мембран, которое обеспечивает избирательное поглощение веществ, необходимых для роста и развития организма. Многие минеральные вещества поглощаются клетками растений в катионной форме [1]. Среди них важнейшими являются катионы K^+ и Ca^{2+} , представляющие собой макроэлементы, обеспечение которыми вносит огромный вклад в достижение показателей набора биомассы и продуктивности культурных растений.

В последние годы большое внимание исследователей мира приковано к области нанотехнологий. Одним из направлений так называемого нанотехнологического прорыва в науке является все более активное использование различных наноматериалов, например наночастиц металлов, в практических целях, в том числе в качестве микроудобрений. Наночастицы обладают уникальными свойствами, такими как высокая для твердых систем подвижность и огромное отношение площади к объему, что определяет их особую биологическую активность [2]. Поскольку минеральные вещества поглощаются корнями, встает вопрос об особенностях влияния наночастиц, которые могут быть использованы в качестве минеральных удобрений (наноудобрений), на корневые клетки, главным образом на клетки ризодермы и кортекса (коры), ответственные за поглотительную функцию. Среди таких материалов особую группу образуют наночастицы, содержащие металлы-микроэлементы, особенно в стабильной форме (в частности, в виде оксидов).

Ранее мы исследовали влияние серебряных наночастиц, имеющих сферическую форму и диаметр около 40 нм, на K^+ - и Ca^{2+} -токи через плазматическую мембрану клеток корня резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) [3]. Было установлено, что данные наночастицы вызывают умеренный блок ионных каналов, который снижает их проводимость. Однако наиболее интересным эффектом стала активация всплесков ионной проводимости высокой амплитуды (включая входящие потоки Ca^{2+}), за которую, вероятно, были ответственны механочувствительные ионные каналы. Имеются данные, указывающие на широкий спектр потенциально мембранотропных эффектов наночастиц металлов-микроэлементов в клетках высших растений [4–6]. Например, обнаружено, что при воздействии наночастиц ZnO в относительно низких концентрациях снижается отток электролитов из клеток корня при засухе у *Lycopersicon esculentum* Mill [4]. В то же время имеются свидетельства того, что высокие концентрации металлосодержащих наночастиц могут воздействовать на мембрану разрушающе, приводя к неспецифическому выходу электролитов из тканей и снижению жизнеспособности клеток [6]. Показано, что наночастицы CuO способны модифицировать морфологию корневой системы *Lactuca sativa* L. и *Daucus carota* L., вызывая утолщение и снижение скорости роста главного корня, а также они могут подавлять водный транспорт в корневых клетках данных видов [7]. Эффект проявлялся при высоких концентрациях (более 100 мг/л) наночастиц CuO. Похожий характер воздействия был зарегистрирован и для наночастиц TiO₂, которые подавляли осмотический и ионный обмен клеток корня *Zea mays* L. [8]. Для наночастиц Fe₃O₄ установлено, что они способны стимулировать накопление калия и фосфора в тканях корня *Triticum aestivum* L., что может быть связано с влиянием на транспортеры данных элементов в плазматической мембране клеток корня [9].

Настоящая работа посвящена анализу воздействия металлосодержащих наночастиц, в частности CuO, Fe₃O₄ и TiO₂, на работу важнейших систем катионного транспорта плазматической мембраны клеток корня высших растений – наружувыврямляющих K^+ -каналов и внутривыврямляющих Ca^{2+} -каналов. Данные системы формируют основу пассивной катионной проводимости плазматической мембраны, составляя около 95 % ее суммарной величины [10]. Выбор наночастиц CuO, Fe₃O₄ и TiO₂ был обусловлен тем, что медь и железо представляют собой важнейшие микроэлементы минерального питания, а титан относится к группе веществ, обладающих гормезисным эффектом. Титан, не являясь эссенциальным элементом, значительно стимулирует рост растений [1].

Железо – первый по значимости микроэлемент живой клетки, относящийся к группе переходных металлов (*transition metals*), или к группе металлов с переходной валентностью. В функциональном отношении оно необходимо для окислительно-восстановительных процессов (редокс-процессов) как компонент гемовых белков и белков, содержащих железосерные центры, а также других органических комплексов клетки [9]. Железо в наноформе может быть представлено различными по степени окисления оксидами: магнетитом (Fe₃O₄), маггемитом (γ -Fe₂O₃) и гематитом (α -Fe₂O₃). В данном исследовании использовались сертифицированные наночастицы Fe₃O₄, имеющие сферическую форму. Известно, что железосодержащие

наночастицы проявляют низкую фитотоксичность [11], а регистрируемые эффекты, описанные для обширной группы видов растений, в основном выражаются в стимулирующих реакциях [12–16].

Медь – второй по значимости микроэлемент минерального питания, также относящийся к группе переходных металлов. Медь необходима для работы ключевых редокс-ферментов растений, таких как пластоцианин, цитохром-с-оксидаза, Cu,Zn-супероксиддисмутаза, аскорбатоксидаза, полифенолоксидаза, аминоксидаза и др. [17; 18]. Дефицит меди отражается в подавлении реакций фотосинтеза, дыхания, углеводного обмена и синтеза аминокислот [1]. Известно, что обработка умеренными дозами наночастиц Cu и CuO может приводить к увеличению содержания хлорофилла и стимуляции ключевых редокс-ферментов, включая каталазы, супероксиддисмутазы, пероксидазы класса III и НАДФН-оксидазы [19]. В то же время большое количество медьсодержащих наночастиц может быть токсичным для высших растений [20].

Титан – переходный металл, представленный в земной коре в довольно высокой концентрации. Хорошо описаны его гормезисные эффекты в отношении роста и развития растений, фотосинтеза и стрессоустойчивости, хотя до конца непонятна их природа [21]. Установлено, что титаносодержащие наночастицы могут напрямую влиять на работу фотосинтетического аппарата на уровне тилакоидной мембраны, устраняя излишнюю энергию от возбужденных светом молекул хлорофилла [22]. Однако неясно, какие эффекты могут оказывать наночастицы титана и его оксидов на мембраны клеток корней и как они могут влиять на их транспортные и сигнальные свойства.

Цель настоящей работы – выявление особенностей воздействия наночастиц CuO, Fe₃O₄ и TiO₂ на K⁺- и Ca²⁺-токи через плазматическую мембрану клеток корня высших растений на примере модельного вида *A. thaliana*, а также биофизический анализ изменения мембранной проводимости под действием данных наночастиц. Исследование проведено с использованием техники локальной фиксации потенциала на мембране (пэтч-кламп) в конфигурации «целая клетка», что позволило зарегистрировать изменения в мембранной проницаемости целой живой клетки.

Материалы и методы исследования

Растительный материал и ростовые тесты. При проведении исследования с применением техники «пэтч-кламп» использовались 7–12-дневные проростки *A. thaliana* экотипа Columbia-0 (Col-0). Растения *A. thaliana* культивировались в стерильных условиях на поверхности среды Мурасиге и Скуга (*Duchefa*, Нидерланды) с добавлением 1,0 % сахарозы и 0,35 % геллановой камеди PhytigelTM (*Sigma-Aldrich*, США) в круглых, изолированных парафильмом пластиковых чашках (уровень pH 6,0 поддерживался при помощи КОН). После высадки семян чашки помещались в ростовую камеру с контролируемыми условиями температуры (22 °C) и освещения (плотность светового потока 100 мкмоль фотонов на 1 м² в секунду, световой режим 16 ч света и 8 ч темноты).

Для анализа воздействия наночастиц на прирост главного корня растений *A. thaliana* использовались растения экотипа Col-0. Наночастицы ресуспендировались ультразвуком в деионизованной воде (0,65 мл) и вводились непосредственно в твердый культивационный субстрат (1,0 мл), который представлял собой объемную смесь ультрадисперсного торфа (измельченного в кофемолке) и вермикулита в соотношении 1 : 1. Перед опытами производилась обработка торфяного субстрата лигандами, которые не поглощаются растениями и связывают железо (10 ммоль/л дефероксамина, 10 ммоль/л 2,2'-бипиридила), с последующим промыванием его деионизованной водой (тип I). Субстрат помещался в пластиковые емкости длиной 3,5 см. Растения культивировались в течение 3 сут для сравнения с контрольной группой.

Наночастицы. Наночастицы приобретались у компании *MTI Corporation* (США) и использовались после верификации их физических параметров, которая осуществлялась производителем с помощью просвечивающего электронного микроскопа CM200 HR-TEM (*Philips*, Нидерланды). Для этого наночастицы диспергировались в этаноле и обрабатывались ультразвуком в течение 30 мин. Примерно 10 мкл полученной суспензии вносилось в ячейку медной сетки, покрытую аморфной углеродной пленкой. Наночастицы CuO имели средний диаметр (81,0 ± 7,0) нм, наночастицы Fe₃O₄ – (13,5 ± 5,0) нм (около 27 % наночастиц имели диаметр менее 10 нм, поэтому они могут быть отнесены к квантовым точкам), наночастицы TiO₂ – (45,0 ± 10,0) нм. Базовые взвеси наночастиц готовили непосредственно перед проведением опыта с помощью ультразвукового диспергатора и вортекса.

Выделение протопластов. Протопласты изолировались преимущественно из клеток ризодермиса ферментативным методом согласно ранее разработанным протоколам [23]. Применялся ферментативный раствор, содержащий 1,5 % целлюлазы Onozuka RS (*Yakult Honsha*, Япония), 1,0 % целлюлизына (*CalBiochem*, Великобритания), 0,1 % пектолиазы Y-23 (*Yakult Honsha*), 0,1 % альбумина (*Sigma*, США), 2 ммоль/л KCl, 10 ммоль/л CaCl₂, 1 ммоль/л MgCl₂ (уровень pH 5,8–6,0 фиксировался с помощью буферов Tris и MES (1 и 2 ммоль/л соответственно)). Осмоляльность всех растворов для работы

в технике «пэтч-кламп» поддерживалась на уровне 300 мосмоль/кг с помощью D-сорбитола. После выделения протопласты содержались на льду, сохраняя жизнеспособность на протяжении 24 ч.

Регистрация и анализ ионных токов. Регистрация и анализ трансмембранных ионных токов проводились с использованием техники «пэтч-кламп» [10]. Для создания гигаомной изоляции между пэтч-пипеткой и плазматической мембраной протопласта применялся наружный раствор с высоким содержанием Ca^{2+} : 20,0 ммоль/л CaCl_2 , 0,1 ммоль/л KCl (уровень pH 6,0 фиксировался с помощью буферов Tris и MES (1 и 2 ммоль/л соответственно)). Гигаомный контакт достигался за счет создания импульса негативного давления в пэтч-пипетке. Регистрация токов производилась в конфигурации «целая клетка». Пипеточный раствор имел следующий состав: 90 ммоль/л K^+ -глюконата, 10 ммоль/л KCl, 100 нмоль/л Ca^{2+} (2,0 ммоль/л 1,2-бис(*o*-аминофеноксид)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты, 1,2 ммоль/л CaCl_2) (уровень pH 7,2 фиксировался с помощью буферов Tris и MES (1 и 2 ммоль/л соответственно), осмоляльность поддерживалась на уровне 300 мосмоль/кг). Экспериментальные растворы фильтровались через бактериальный фильтр (*Millipore*, Великобритания). Диффузионный потенциал растворов вычислялся с помощью компьютерной программы *JPCalc* (*SDR Scientific*, Австралия), активность ионов рассчитывалась с помощью компьютерной программы *Geochem* (*Geochem-EZ*, США).

Ионные токи через плазматическую мембрану регистрировались посредством усилителя PC-one Path/Whole Cell Clamp (*Dagan*, США) с использованием компьютеризированного аналого-цифрового преобразователя Digidata 1322A (*Molecular Devices*, США). Для анализа данных применялись компьютерные программы *Clampex* (версия 9.2) и *Clampfit* (версия 9.2) (*Molecular Devices*). Протокол фиксации напряжения включал подачу прямоугольных импульсов от –200 до +100 мВ с шагом 30 мВ при потенциале фиксации –80 мВ. Электрофизиологическая система была установлена на антивибрационном столе PCT-12 (*OFC Systems*, Великобритания). Использовались инвертированный микроскоп IM-2F (*Carl Zeiss*, Германия), микропозиционер компании *Hodgkin – Huxley Ltd.* (Великобритания) и набор периферийных компонентов компании *Axon Instruments* (США). Токковые кривые и вольт-амперные характеристики анализировались с помощью компьютерной программы *SigmaPlot* (версия 10.0) (*Systat Software Inc.*, США).

Статистическая обработка. Для обработки полученных результатов использовались стандартные методы вариационной статистики. Основными статистическими характеристиками послужили средняя арифметическая величина ($\bar{X}$), среднее квадратичное отклонение (σ) и ошибка средней величины ($S\bar{X}$). Достоверность различий (p) рассчитывалась на основе стандартного дисперсионного анализа (*analysis of variance*, ANOVA).

Результаты и их обсуждение

С использованием электрофизиологической техники «пэтч-кламп» в конфигурации «целая клетка» были зарегистрированы ионные токи через плазматическую мембрану клеток корневых волосков *A. thaliana* экотипа Col-0 при воздействии 300 мг/л наночастиц CuO (рис. 1). В пипеточном растворе был задан высокий уровень K^+ (100 ммоль/л) для регистрации выходящего катионного потока из клеток, а также в него было введено 90 ммоль/л глюконата, который плохо проникает через плазматическую мембрану на фоне 10 ммоль/л Cl^- , обеспечивающего электрический контакт с системой усиления. Наружный раствор содержал 20 ммоль/л Ca^{2+} для формирования стабильного гигаомного контакта и измерения входа Ca^{2+} в клетку.

Регистрация и дальнейший анализ выходящих ионных токов продемонстрировали наличие классических компонентов, быстро и медленно активирующихся в наружунаправленной проводимости мембраны. В контрольных условиях максимальная плотность ионного тока при деполяризации плазматической мембраны была равна $(573,4 \pm 93,4) \text{ мА/м}^2$ ($n = 6$; $\bar{X} \pm S\bar{X}$), а при гиперполяризации – $(-117,3 \pm 19,7) \text{ мА/м}^2$ ($n = 6$; $\bar{X} \pm S\bar{X}$). Наночастицы CuO вызывали разные эффекты в зависимости от времени их воздействия. Так, по истечении экспозиции на протяжении 10–15 мин в растворе, содержащем 300 мг/л наночастиц CuO, происходило двукратное (по сравнению с контролем) снижение выходящего тока (до $(319,7 \pm 34,2) \text{ мА/м}^2$; $n = 6$; $\bar{X} \pm S\bar{X}$; $p < 0,001$; ANOVA) и входящего тока (до $(-48,3 \pm 7,4) \text{ мА/м}^2$; $n = 6$; $\bar{X} \pm S\bar{X}$; $p < 0,05$; ANOVA). При увеличении времени экспозиции до 30 мин наблюдался противоположный эффект: токи возрастали, причем если выходящий ток возрастал приблизительно в 2 раза $(931,5 \pm 107,2) \text{ мА/м}^2$; $n = 6$; $\bar{X} \pm S\bar{X}$; $p < 0,001$; ANOVA), то входящий ток увеличивался в 3 раза $(-351,3 \pm 36,2) \text{ мА/м}^2$; $n = 6$; $\bar{X} \pm S\bar{X}$; $p < 0,001$; ANOVA). Аналогичные эксперименты с крупными частицами CuO (балк-форма; 90–100 мкм) показали отсутствие влияния плазматической мембраны на электрические токи (данные не представлены).

Выходящий из клеток корня K^+ -ток может быть обусловлен функционированием такого типа K^+ -каналов, как канал GORK (*guard cell outward-rectifying K^+ channel*), и неселективных катионных каналов плазматической мембраны. Входящий Ca^{2+} -ток, вероятно, был опосредован работой Ca^{2+} -проницаемых катионных каналов или Ca^{2+} -селективных каналов плазматической мембраны [24; 25]. Снижение наружу- и внутрьнаправленных катионных токов могло быть связано с блокированием соответствующих катионных каналов. В то же время значительное возрастание токов обоих направлений после экспозиции в течение 30 мин, вероятно, было обусловлено активацией токов под действием активных форм кислорода [26; 27] либо нарушением целостности плазматической мембраны [28].

Исследователи выявили, что характер воздействия наночастиц CuO зависит от их размеров [29]. Например, обработка этими наночастицами диаметром 25 нм приводила к повышению содержания меди в семенах сои и уменьшению размеров корня [29]. Вместе с тем данные эффекты не регистрировались при обработке наночастицами CuO размером 50 и 250 нм или при обработке Cu^{2+} .

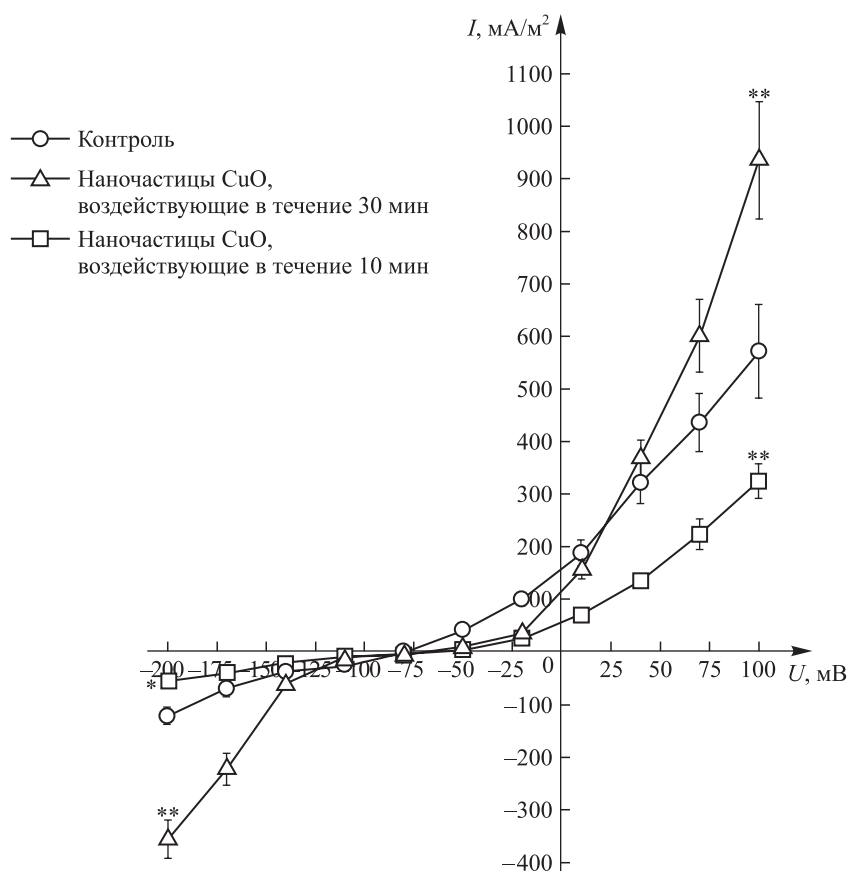


Рис. 1. Воздействие наночастиц CuO на вольт-амперные характеристики плазматической мембраны протопластов, изолированных из корневых волосков *A. thaliana* экотипа Col-0 ($n = 6$; $\bar{X} \pm S\bar{x}$).

Наружный раствор: 20,0 ммоль/л $CaCl_2$, 0,1 ммоль/л KCl

(pH 6,0 (1 ммоль/л Tris, 2 ммоль/л MES), осмоляльность 300 мосмоль/кг).

Пипеточный раствор: 90 ммоль/л K^+ -глюконата, 10 ммоль/л KCl, 100 нмоль/л Ca^{2+} (2,0 ммоль/л 1,2-бис(*o*-аминофенокси)этан- N,N,N',N' -тетрауксусной кислоты, 1,2 ммоль/л $CaCl_2$) (pH 7,2 (1 ммоль/л Tris, 2 ммоль/л MES), осмоляльность 300 мосмоль/кг).

Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю при $p < 0,05$, знаком ** – достоверные различия по отношению к контролю при $p < 0,001$

Fig. 1. Influence of CuO nanoparticles on the current-voltage curves of the plasma membrane of protoplasts isolated from root hairs of *A. thaliana* ecotype Col-0 ($n = 6$; $\bar{X} \pm S\bar{x}$). The standard bathing solution contained 20.0 mmol/L $CaCl_2$, 0.1 mmol/L KCl (pH 6.0 (1 mmol/L Tris, 2 mmol/L MES), osmolality 300 mosmol/kg).

The pipette solution contained 90 mmol/L K^+ gluconate, 10 mmol/L KCl, 100 nmol/L Ca^{2+} (2.0 mmol/L 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane- N,N,N',N' -tetraacetic acid, 1.2 mmol/L $CaCl_2$) (pH 7.2 (1 mmol/L Tris, 2 mmol/L MES), osmolality 300 mosmol/kg).

Sign * marked significant differences in relation to control at $p < 0.05$, sign ** – significant differences in relation to control at $p < 0.001$

Были проанализированы изменения трансмембранных токов через плазматическую мембрану протопластов, полученных из корневых волосков *A. thaliana* при введении в наружный раствор 300 мг/л наночастиц Fe_3O_4 (рис. 2). В контрольных условиях максимальная плотность наружунаправленного тока составила $(567,4 \pm 87,2)$ мА/м^2 ($n = 6$; $X \pm S\bar{x}$), внутрьнаправленного тока – $(-117,3 \pm 12,7)$ мА/м^2 ($n = 6$; $X \pm S\bar{x}$). Не были зарегистрированы достоверные изменения как наружунаправленных токов $((487,2 \pm 67,7)$ мА/м^2 ; $n = 6$; $X \pm S\bar{x}$), так и внутрьнаправленных токов $((-105,7 \pm 12,5)$ мА/м^2 ; $n = 6$; $X \pm S\bar{x}$) при инкубации протопластов в растворе, содержащем наночастицы Fe_3O_4 до 60 мин. В результате проведения аналогичных экспериментов с макрочастицами Fe_3O_4 (балк-форма; диаметр более 100 мкм) также не были выявлены изменения проводимости мембраны на протяжении 60 мин (данные не представлены).

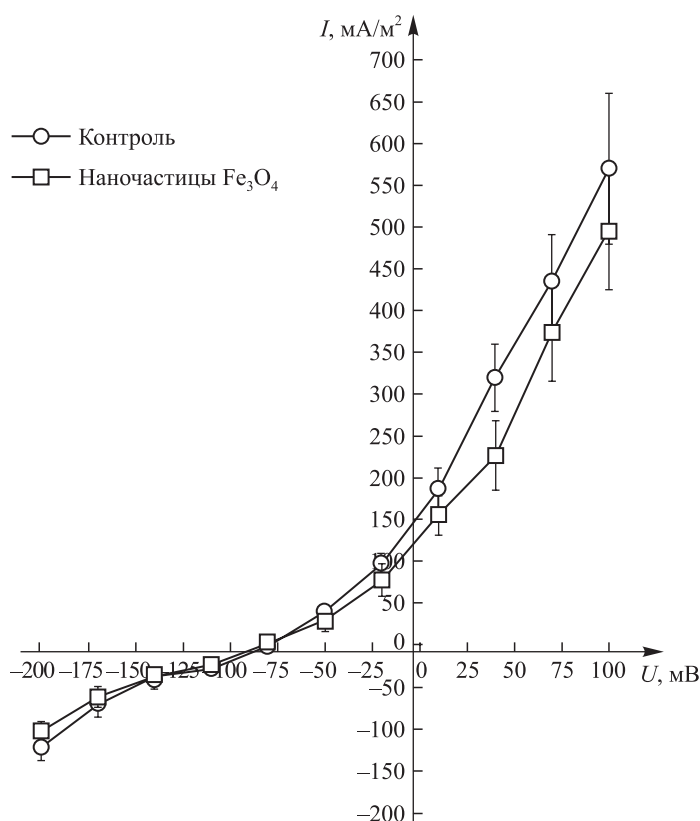


Рис. 2. Воздействие наночастиц Fe_3O_4 на вольт-амперные характеристики плазматической мембраны протопластов, изолированных из корневых волосков *A. thaliana* экотипа Col-0 ($n = 6$; $X \pm S\bar{x}$). Наружный раствор: 20,0 ммоль/л CaCl_2 , 0,1 ммоль/л KCl (pH 6,0 (1 ммоль/л Tris, 2 ммоль/л MES), осмоляльность 300 мосмоль/кг). Пипеточный раствор: 90 ммоль/л K^+ -глюконата, 10 ммоль/л KCl, 100 ммоль/л Ca^{2+} (2,0 ммоль/л 1,2-бис(*o*-аминофенокси)этан- N,N,N',N' -тетрауксусной кислоты, 1,2 ммоль/л CaCl_2) (pH 7,2 (1 ммоль/л Tris, 2 ммоль/л MES), осмоляльность 300 мосмоль/кг)

Fig. 2. Influence of Fe_3O_4 nanoparticles on the current-voltage curves of the plasma membrane of protoplasts isolated from root hairs of *A. thaliana* ecotype Col-0 ($n = 6$; $X \pm S\bar{x}$). The standard bathing solution contained 20.0 mmol/L CaCl_2 , 0.1 mmol/L KCl (pH 6.0 (1 mmol/L Tris, 2 mmol/L MES), osmolality 300 mosmol/kg). The pipette solution contained 90 mmol/L K^+ gluconate, 10 mmol/L KCl, 100 mmol/L Ca^{2+} (2.0 mmol/L 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane- N,N,N',N' -tetraacetic acid, 1.2 mmol/L CaCl_2) (pH 7.2 (1 mmol/L Tris, 2 mmol/L MES), osmolality 300 mosmol/kg)

Кроме того, было исследовано влияние наночастиц TiO_2 (300 мг/л) на ионные токи через плазматическую мембрану протопластов, полученных из корневых волосков *A. thaliana* (рис. 3). В контрольных условиях максимальная плотность наружунаправленного тока была равна $(573,4 \pm 87,4)$ мА/м^2 ($n = 6$; $X \pm S\bar{x}$), внутрьнаправленного тока – $(-117,3 \pm 13,4)$ мА/м^2 ($n = 6$; $X \pm S\bar{x}$). Введение в наружный раствор 300 мг/л TiO_2 обусловило снижение тока при деполяризации плазматической мембраны до $(223,6 \pm 40,8)$ мА/м^2 ($n = 6$; $X \pm S\bar{x}$; $p < 0,001$; ANOVA) и при гиперполяризации до $(-67,5 \pm 9,3)$ мА/м^2 ($n = 6$; $X \pm S\bar{x}$; $p < 0,05$; ANOVA).

При анализе изменения вольт-амперных характеристик плазматической мембраны было выявлено ингибирующее воздействие наночастиц TiO_2 как на наружунаправленные K^+ -токи, так и на внутрьнаправ-

ленные Ca^{2+} -токи. Следует отметить, что действие было неодинаково: если выходящий K^{+} -ток снижался более чем в 2,5 раза, то входящий Ca^{2+} -ток уменьшался в 1,7 раза. Этот факт может свидетельствовать об избирательности влияния наночастиц TiO_2 на разные транспортные системы клеток ризодермиса. В результате проведения аналогичных экспериментов с макрочастицами TiO_2 (балк-форма; диаметр более 100 мкм) не были выявлены изменения проводимости мембраны.

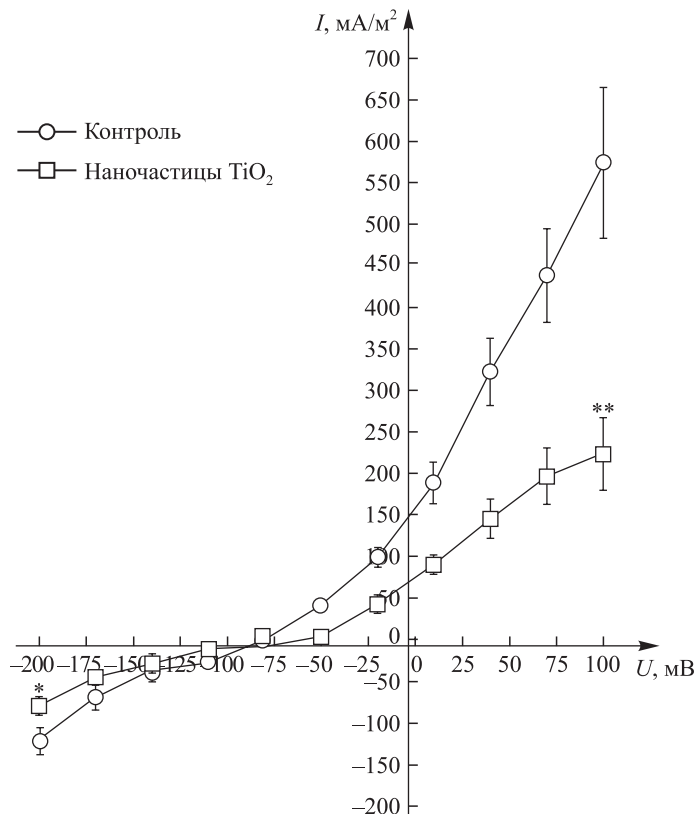


Рис. 3. Воздействие наночастиц TiO_2 на вольт-амперные характеристики плазматической мембраны протопластов, изолированных из корневых волосков *A. thaliana* экотипа Col-0 ($n = 6$; $\bar{X} \pm S\bar{x}$). Наружный раствор: 20,0 ммоль/л CaCl_2 , 0,1 ммоль/л KCl (pH 6,0 (1 ммоль/л Tris, 2 ммоль/л MES), осмоляльность 300 мосмоль/кг). Пипеточный раствор: 90 ммоль/л K^{+} -глюконата, 10 ммоль/л KCl, 100 нмоль/л Ca^{2+} (2,0 ммоль/л 1,2-бис(*o*-аминофенокси)этан- N,N,N',N' -тетрауксусной кислоты, 1,2 ммоль/л CaCl_2) (pH 7,2 (1 ммоль/л Tris, 2 ммоль/л MES), осмоляльность 300 мосмоль/кг). Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю при $p < 0,05$, знаком ** – достоверные различия по отношению к контролю при $p < 0,001$

Fig. 3. Influence of TiO_2 nanoparticles on the current-voltage curves of the plasma membrane of protoplasts isolated from root hairs of *A. thaliana* ecotype Col-0 ($n = 6$; $\bar{X} \pm S\bar{x}$). The standard bathing solution contained 20.0 mmol/L CaCl_2 , 0.1 mmol/L KCl (pH 6.0 (1 mmol/L Tris, 2 mmol/L MES), osmolality 300 mosmol/kg). The pipette solution contained 90 mmol/L K^{+} gluconate, 10 mmol/L KCl, 100 nmol/L Ca^{2+} (2.0 mmol/L 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane- N,N,N',N' -tetraacetic acid, 1.2 mmol/L CaCl_2) (pH 7.2 (1 mmol/L Tris, 2 mmol/L MES), osmolality 300 mosmol/kg). Sign * marked significant differences in relation to control at $p < 0.05$, sign ** – significant differences in relation to control at $p < 0.001$

Среди протестированных наночастиц наиболее слабые мембранные эффекты были отмечены для наночастиц Fe_3O_4 . Соответственно, данные наночастицы, вероятно, обладают низкой мембранотропной модифицирующей активностью, т. е. могут быть использованы в качестве наиболее безопасных нанодобавок. Было протестировано их воздействие на прирост главного корня растений *A. thaliana* (рис. 4). С этой целью использовалась система культивирования модельных растений *A. thaliana* в малом объеме почвенного субстрата (1,0–1,5 мл), что позволило провести анализ влияния дорогостоящего сертифицированного наноматериала на растения с достаточной статистической достоверностью.

Тесты показали, что прирост главного корня статистически достоверно стимулировался, начиная с концентрации наночастиц Fe_3O_4 в среде свыше 300 мг/л, и достигал максимума (30–40 % выше контроля;

$n = 75$; $X \pm S\bar{x}$; $p < 0,001$; ANOVA) при концентрациях 3000–10 000 мг/л. Таким образом, наночастицы Fe_3O_4 обладают определенным потенциалом для использования в качестве наноудобрений. Как отмечается в некоторых источниках, себестоимость наночастиц Fe_3O_4 может быть значительно снижена при их массовом производстве, что делает данные наночастицы перспективным материалом для создания инновационных наноагротехнологий [30].

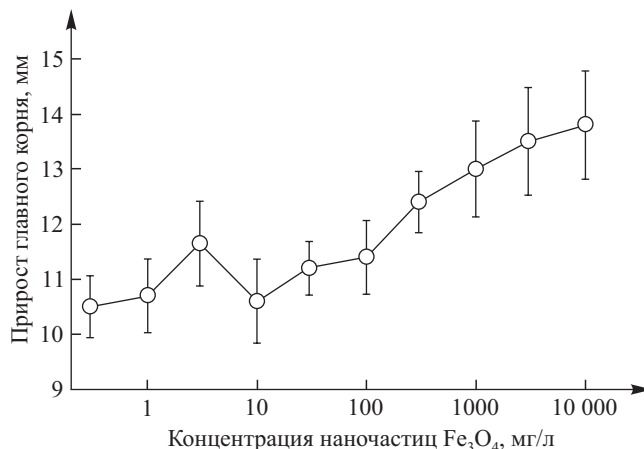


Рис. 4. Воздействие наночастиц Fe_3O_4 на прирост главного корня растений *A. thaliana* экотипа Col-0 ($n = 75$; $X \pm S\bar{x}$). Наночастицы вводились в твердый железообедненный культивационный субстрат (1 мл; смесь ультрадисперсного торфа и вермикулита в соотношении 1 : 1) в виде суспензии и сравнивались с контрольной группой через 3 сут выращивания

Fig. 4. Influence of Fe_3O_4 nanoparticles on the main root of *A. thaliana* ecotype Col-0 plants ($n = 75$; $X \pm S\bar{x}$). Nanoparticles were introduced into a solid iron-depleted cultivation substrate (1 ml; a mixture of ultrafine peat and vermiculite in a 1 : 1 ratio) as a suspension and compared with the control group after 3 days of cultivation

Выявленные эффекты указывают на модифицирующее воздействие наночастиц CuO и TiO_2 на катионные каналы плазматических мембран клеток корня. Первые вызывали активацию классических редокс-зависимых K^+ - и Ca^{2+} -каналов [26; 27], а вторые индуцировали блокирование данных систем, которое ранее было описано для клеток животных при влиянии ряда тяжелых металлов, включая ионы титана [31]. Воздействие наночастиц CuO и TiO_2 на ионные каналы клеток растений ранее не было описано. Эффект от наночастиц TiO_2 похож на эффект от наночастиц Ag , выявленный в нашей работе [3]. Примечательно, что при проведении настоящего исследования не были обнаружены всплески проводимости, характерной для наночастиц Ag . Данное обстоятельство может быть связано с отличием как размеров частиц, так и их состава. Возможно, отсутствие кислорода в структуре наночастицы определяет ее потенциал в качестве активатора механочувствительных ионных каналов. Этот факт может быть подтвержден при выполнении исследований, которые потенциально могут быть проведены на наночастицах, состоящих из чистых элементов.

Ранее специалисты показали, что обработка умеренным количеством медьсодержащих наночастиц (до 10–30 мг/л) может повышать качество семян, урожайность и устойчивость к засухе у *Z. mays* [32] и *Glycine max* (L.) Merr. [33]. Однако данные наночастицы могут ингибировать те же процессы при высоких концентрациях (более 100 мг/л). Например, наночастицы CuO вызывали подавление прорастания семян и утечку электролитов из клеток корня *Oryza sativa* L. [34]. Настоящая работа показала, что в основе влияния наночастиц CuO на растения, вероятно, может лежать их воздействие на плазматическую мембрану, выражающееся в росте ее проводимости и потере важных электролитов клеток.

Интересно, что под действием соединений титана могут возрастать пероксидазная, каталазная и нитратредуктазная активность растительных клеток и содержание хлорофилла, как это показано на примере растений *Capsicum annuum* L. и *Chlorella pyrenoidosa* H. Chick в исследовании [35]. Применение наночастиц TiO_2 может повышать активность рубиско и эффективность фотосинтетических реакций за счет увеличения потока электронов между фотосистемой II и фотосистемой I [36; 37]. Имеются сведения о том, что эти наночастицы могут стимулировать прорастание семян *Spinacia oleracea* L. [38] и ускорять рост молодых растений *G. max* [39]. Тем не менее высокие концентрации наночастиц TiO_2 (более 100 мг/л) способны замедлять ростовые процессы и подавлять фотосинтез, напрямую ингибируя

АТФ-синтазу, как это показано в публикации [36] для *T. aestivum*. Обнаруженное в настоящей работе влияние наночастиц TiO_2 на катионный транспорт может лежать в основе подавления роста высших растений, так как ингибирование транспорта калия и кальция на 35–40 %, несомненно, отразится на всех процессах минерального питания. Снижение уровня K^+ может привести к повреждению водного обмена, потере тургорного давления и разобщению транспортных потоков на мембране растительной клетки, что отразится на энергетическом балансе клетки, так как калий является активатором ферментов гликолиза, цикла Кребса и анаболизма [40]. Ингибирование входа Ca^{2+} может модифицировать сигнальные реакции клетки, которые лежат в основе большинства регуляторных и адаптивных явлений [25]. В целом эффекты наночастиц CuO и TiO_2 указывают на то, что данные наноматериалы можно использовать на практике, вероятно, лишь в очень небольших дозах. При воздействии их большого количества высока вероятность появления мембранной токсичности и подавления роста растений.

В некоторых научных источниках отмечается, что применение наночастиц Fe_3O_4 в качестве нанодобровений представляется очень перспективным направлением ввиду их малого размера, дешевизны и высокой доступности для разных частей растения, включая надземные органы [41]. Наночастицы железа способны выделять очень важное для жизни растений железо, связываясь в клеточной стенке вблизи плазматической мембраны. Например, обработка семян *T. aestivum* наночастицами Fe_2O_3 стимулировала их прорастание, повышение «железного статуса» проростков и их дальнейший рост, существенно увеличивая содержание железа в клеточных стенках, молодых тканях растений и зерне [42].

В последние годы возросло количество исследований, посвященных влиянию наночастиц на рост и развитие высших растений [43; 44]. При изучении воздействия наночастиц Al , Ce_2O_3 , Cu , Au , Fe , Ag , Si , TiO_2 , Zn и ZnO было зарегистрировано повышение урожайности сельскохозяйственных культур [45], что, вероятно, связано с очень высоким отношением площади поверхности, обуславливающей способность металлов переходить в раствор, транспортироваться и взаимодействовать с клеточными компонентами, к объему [46]. Согласно оценке ряда авторов перспективным представляется использование металл-содержащих наночастиц в сельском хозяйстве и биотехнологии растений не только как нанодобровений, но и как агентов-антидотов, которые обеспечивают медленное выделение эссенциальных металлов, приводящее к снижению накопления более опасных тяжелых металлов (например, кадмий и свинец) [47]. Результаты настоящей работы показали, что наночастицы Fe_3O_4 , вероятно, обладают подобными свойствами в очень широком диапазоне концентраций, в то время как наночастицы CuO и TiO_2 должны применяться только в низких концентрациях.

Заключение

В данном исследовании с использованием техники локальной фиксации потенциала впервые выявлены особенности воздействия наночастиц CuO , Fe_3O_4 и TiO_2 на катионные потоки через плазматическую мембрану протопластов клеток корня *A. thaliana*. Продemonстрировано, что после экспозиции на протяжении 10 мин в растворе, содержащем 300 мг/л наночастиц CuO , происходило двукратное снижение проводимости K^+ - и Ca^{2+} -проницаемых ионных каналов плазматической мембраны. Более продолжительная обработка наночастицами CuO , а именно в течение 30 мин, вызвала увеличение проводимости K^+ - и Ca^{2+} -каналов, что, вероятно, было обусловлено активацией данных систем под действием активных форм кислорода. Наночастицы Fe_3O_4 в концентрации 300 мг/л не проявляли модифицирующего воздействия на катионные каналы, в то время как наночастицы TiO_2 в такой же концентрации подавляли проводимость K^+ - и Ca^{2+} -каналов. В результате проведения аналогичных экспериментов с макрочастицами CuO , Fe_3O_4 и TiO_2 (балк-форма; более 100 мкм) не были обнаружены эффекты, похожие на эффекты, вызываемые наночастицами CuO и TiO_2 . Наночастицы Fe_3O_4 , начиная с их концентрации в среде свыше 300 мг/л, вызвали статистически достоверное увеличение прироста главного корня молодых растений *A. thaliana*. Данный факт в совокупности с отсутствием у наночастиц Fe_3O_4 выраженного модифицирующего воздействия на катионную проводимость мембраны указывает на возможность их использования в качестве минеральных нанодобровений.

Библиографические ссылки

1. Marschner H. *Mineral nutrition of higher plants*. London: Academic Press; 2012. 651 p.
2. Nongbet A, Mishra AK, Mohanta YK, Mahanta S, Ray MK, Khan M, et al. Nanofertilizers: a smart and sustainable attribute to modern agriculture. *Plants*. 2022;11(19):2587. DOI: 10.3390/plants11192587.
3. Sosan A, Svistunenko D, Straltsova D, Tsiurkina K, Smolich I, Lawson T, et al. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Journal*. 2016;85(2):245–257. DOI: 10.1111/tpj.13105.
4. el-Zohri M, al-Wadaani NA, Bafeel SO. Foliar sprayed green zinc oxide nanoparticles mitigate drought-induced oxidative stress in tomato. *Plants*. 2021;10(11):2400. DOI: 10.3390/plants10112400.

5. Semida WM, Abdelkhalik A, Mohamed GF, Abd El-Mageed TA, Abd El-Mageed SA, Rady MM, et al. Foliar application of zinc oxide nanoparticles promotes drought stress tolerance in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plants*. 2021;10(2):421. DOI: 10.3390/plants10020421.
6. Wang Q, Ebbs SD, Chen Y, Ma X. Trans-generational impact of cerium oxide nanoparticles on tomato plants. *Metallomics*. 2013;5:753–759. DOI: 10.1039/c3mt00033h.
7. Margenot AJ, Rippner DA, Dumlao MR, Nezami S, Green PG, Parikh SJ, et al. Copper oxide nanoparticle effects on root growth and hydraulic conductivity of two vegetable crops. *Plant Soil*. 2018;431:333–345. DOI: 10.1007/s11104-018-3741-3.
8. Asli S, Neumann PM. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant, Cell & Environment*. 2009;32(5):577–584. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.01952.x.
9. Feng Y, Kreslavski VD, Shmarev AN, Ivanov AA, Zharmukhamedov SK, Kosobryukhov A, et al. Effects of iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4) on growth, photosynthesis, antioxidant activity and distribution of mineral elements in wheat (*Triticum aestivum*) plants. *Plants*. 2022;11(14):1894. DOI: 10.3390/plants11141894.
10. Demidchik V. Characterisation of root plasma membrane Ca^{2+} -permeable cation channels: techniques and basic concepts. In: Volkov AG. *Plant electrophysiology*. Berlin: Springer-Verlag; 2012. p. 339–369.
11. Ebrahiminezhad A, Zare-Hoseinabadi A, Berenjian A, Ghasemi Y. Green synthesis and characterization of zero-valent iron nanoparticles using stinging nettle (*Urtica dioica*) leaf extract. *Green Processing and Synthesis*. 2017;6(5):469–475. DOI: 10.1515/gps-2016-0133.
12. Palchoudhury S, Jungjohann KL, Weerasena L, Arabshahi A, Gharge U, Albattah A, et al. Enhanced legume root growth with pre-soaking in $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticle fertilizer. *RSC Advances*. 2018;8(43):24075–24083. DOI: 10.1039/c8ra04680h.
13. Srivastava G, Das CK, Das A, Singh SK, Roy M, Kim H, et al. Seed treatment with iron pyrite (FeS_2) nanoparticles increases the physical effects of spinach. *RSC Advances*. 2014;4:58495–58504. DOI: 10.1039/C4RA06861K.
14. Li J, Chang PR, Huang J, Wang Y, Yuan H, Ren H. Physiological effects of magnetic iron oxide nanoparticles towards watermelon. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2013;13(8):5561–5567. DOI: 10.1166/jnn.2013.7533.
15. Maswada HF, Djanaguiraman M, Prasad PVV. Seed treatment with nano-iron(III) oxide enhances germination, seedling growth and salinity tolerance of sorghum. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 2018;204(6):577–587. DOI: 10.1111/jac.12280.
16. al-Amri N, Tombuloglu H, Slimani Y, Akhtar S, Barghouthi M, Almessiere M, et al. Size effect of iron(III) oxide nanomaterials on the growth, and their uptake and translocation in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2020;194:110377. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.110377.
17. Chen G, Li J, Han H, Du R, Wang X. Physiological and molecular mechanisms of plant responses to copper stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(21):12950. DOI: 10.3390/ijms232112950.
18. Mydy LS, Chigumba DN, Kersten RD. Plant copper metalloenzymes as prospects for new metabolism involving aromatic compounds. *Frontiers in Plant Science*. 2021;12:692108. DOI: 10.3389/fpls.2021.692108.
19. Gaucin-Delgado JM, Ortiz-Campos A, Hernandez-Montiel LG, Fortis-Hernandez M, Reyes-Pérez JJ, González-Fuentes JA, et al. CuO – NPs improve biosynthesis of bioactive compounds in lettuce. *Plants*. 2022;11(7):912. DOI: 10.3390/plants11070912.
20. Abbasirad S, Ghotbi-Ravandi AA. Toxicity of copper oxide nanoparticles in barley: induction of oxidative stress, hormonal imbalance, and systemic resistances. *BMC Plant Biology*. 2025;25(1):187. DOI: 10.1186/s12870-025-06213-6.
21. Lyu S, Wei X, Chen J, Wang C, Wang X, Pan D. Titanium as a beneficial element for crop production. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:597. DOI: 10.3389/fpls.2017.00597.
22. Skiba E, Pietrzak M, Michlewska S, Gruszka J, Malejko J, Godlewska-Żyłkiewicz B, et al. Photosynthesis governed by nanoparticulate titanium dioxide. The *Pisum sativum* L. case study. *Environmental Pollution*. 2024;340(2):122735. DOI: 10.1016/j.envpol.2023.122735.
23. Demidchik V, Tester M. Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology*. 2002;128(2):379–387. DOI: 10.1104/pp.010524.
24. Demidchik V. Mechanisms and physiological roles of K^+ efflux from root cells. *Journal of Plant Physiology*. 2014;171(9):696–707. DOI: 10.1016/j.jplph.2014.01.015.
25. Demidchik V, Shabala S, Isayenkov S, Cuin TA, Pottosin I. Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions. *New Phytologist*. 2018;220:49–69. DOI: 10.1111/nph.15266.
26. Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 2003;422:442–446. DOI: 10.1038/nature01485.
27. Demidchik V, Cuin TA, Svistunenko D, Smith SJ, Miller AJ, Shabala S, et al. *Arabidopsis* root K^+ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science*. 2010;123(9):1468–1479. DOI: 10.1242/jcs.064352.
28. Angel BM, Batley GE, Jarolimek CV, Rogers NJ. The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. *Chemosphere*. 2013;93(2):359–365. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.04.096.
29. Yusefi-Tanha E, Fallah S, Rostamnejadi A, Pokhrel LR. Root system architecture, copper uptake and tissue distribution in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) grown in copper oxide nanoparticle (CuO-NP)-amended soil and implications for human nutrition. *Plants*. 2020;9:1326. DOI: 10.3390/plants9101326.
30. Liu X, Nadeem M, Rui Y. Effects of nanofertilizers on the mechanism of photosynthetic efficiency in plants: a review. *Phyton – International Journal of Experimental Botany*. 2024;93(12):3197–3216. DOI: 10.32604/phyton.2024.059281.
31. Kiss T, Osipenko ON. Toxic effects of heavy metals on ionic channels. *Pharmacological Reviews*. 1994;46(3):245–267.
32. Nguyen DV, Nguyen HM, Le NT, Nguyen KH, Nguyen HT, Le HM, et al. Copper nanoparticle application enhances plant growth and grain yield in maize under drought stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2022;41:364–375. DOI: 10.1007/s00344-021-10301-w.
33. Linh TMT, Mai NC, Hoe PT, Lien LQ, Ban NK, Hien LTT, et al. Metal-based nanoparticles enhance drought tolerance in soybean. *Journal of Nanomaterials*. 2020;2020:1–13. DOI: 10.1155/2020/4056563.
34. Shaw AK, Hossain Z. Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*. 2013;93(6):906–915. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.044.
35. Hruby MM, Cigler P, Kuzel S. Contribution to understanding the mechanism of titanium action in plants. *Journal of Plant Nutrition*. 2002;25(3):577–598. DOI: 10.1081/PLN-120003383.

36. Hong F, Zhou J, Liu C, Yang F, Wu C, Zheng L, et al. Effect of nano-TiO₂ on photochemical reaction of chloroplasts of spinach. *Biological Trace Element Research*. 2005;105(1–3):269–279. DOI: 10.1385/BTER:105:1–3:269.
37. Djanaguiraman M, Nair R, Giraldo JP, Prasad PVV. Cerium oxide nanoparticles decrease drought-induced oxidative damage in sorghum leading to higher photosynthesis and grain yield. *ACS Omega*. 2018;3(10):14406–14416. DOI: 10.1021/acsomega.8b01894.
38. Zheng L, Hong F, Lu S, Liu C. Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biological Trace Element Research*. 2005;105:83–91. DOI: 10.1385/BTER:104:1:083.
39. Lu CM, Zhang CY, Wu JQ, Tao MX. Research of the effect of nanometer on germination and growth enhancement of *Glycine max* and its mechanism. *Soybean Science*. 2002;21:168–172.
40. Demidchik V, Straltsova D, Medvedev SS, Pozhvanov GA, Sokolik A, Yurin V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of Experimental Botany*. 2014;65:1259–1270. DOI: 10.1093/jxb/eru004.
41. Mazaherinia S, Astaraci A, Fotovvat A, Monshi A. Nano iron oxide particles efficiency on Fe, Mn, Zn and Cu concentrations in wheat plant. *World Applied Sciences Journal*. 2010;7(1):36–40.
42. Sundaria N, Singh M, Upreti P, Chauhan RP, Jaiswal JP, Kumar A. Seed priming with iron oxide nanoparticles triggers iron acquisition and biofortification in wheat (*Triticum aestivum* L.) grains. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2018;38:122–131. DOI: 10.1007/s00344-018-9818-7.
43. Farooqui A, Tabassum H, Ahmad A, Mabood A, Ahmad A, Ahmad IZ. Role of nanoparticles in growth and development of plants: a review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016;7:22–37. DOI: 10.3389/fpls.2022.976179.
44. Siddiqi KS, Rahman AU, Tajuddin T, Husen A. Biogenic fabrication of iron/iron oxide nanoparticles and their application. *Nanoscale Research Letters*. 2016;11(1):498. DOI: 10.1186/s11671-016-1714-0.
45. Raza MAS, Amin J, Valipour M, Iqbal R, Aslam MU, Zulfiqar B, et al. Cu-nanoparticles enhance the sustainable growth and yield of drought-subjected wheat through physiological progress. *Scientific Reports*. 2024;14(1):14254. DOI: 10.1038/s41598-024-62680-1.
46. Rashad YM, El-Sharkawy HHA, Belal BEA, Razik EAS, Galilah DA. Silica nanoparticles as a probable anti-oomycete compound against downy mildew, and yield and quality enhancer in grapevines: field evaluation, molecular, physiological, ultrastructural, and toxicity investigations. *Frontiers in Plant Science*. 2021;12:763365. DOI: 10.3389/fpls.2021.763365.
47. Bakhtiari M, Moaveni P, Sani B. The effect of iron nanoparticles spraying time and concentration on wheat. *Biological Forum – an International Journal*. 2015;7:679–683.

Получена 22.07.2025 / принята 12.09.2025.
Received 22.07.2025 / accepted 12.09.2025.

Авторы:

Полина Вацлавовна Гриусевич – кандидат биологических наук; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Вероника Евгеньевна Артишевская – соискатель кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Маргарита Алексеевна Мыслейко – специалист лаборатории иммунитета и биотехнологии растений.

Анатолий Иосифович Соколик – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Наталья Лёгкиновна Пишбытко – кандидат биологических наук, доцент; ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории клеточной и системной биологии кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Игорь Иванович Смолич – кандидат биологических наук, доцент; ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории клеточной и системной биологии кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, член-корреспондент НАН Беларуси, профессор; главный научный сотрудник лаборатории роста и развития растений.

Authors:

Palina V. Hryvusevich, PhD (biology); associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

hryvusevich@bsu.by

<https://orcid.org/0000-0002-4851-7290>

Veranika Ya. Artsisheuskaya, competitor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

delasadovie@mail.ru

<https://orcid.org/0009-0008-5343-751X>

Marharyta A. Mysleika, specialist at the laboratory of plant immunity and biotechnology.

margaritamyslejko@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0005-9487-7202>

Anatoliy I. Sokolik, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

sokolik@bsu.by

<https://orcid.org/0000-0002-1513-9465>

Natallia L. Pshybytko, PhD (biology), docent; leading researcher at the laboratory of cell and systems biology, department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

pshybytko@bsu.by

<https://orcid.org/0000-0003-3634-1889>

Ihar I. Smolich, PhD (biology), docent; leading researcher at the laboratory of cell and systems biology, department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

smolich@bsu.by

<https://orcid.org/0000-0001-7828-606X>

Vadim V. Demidchik, doctor of science (biology), corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, full professor; chief researcher at the laboratory of plant growth and development.

demidchik@botany.by

<https://orcid.org/0000-0003-3765-8386>

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТАТУС ЗДОРОВЫХ И ИНФИЦИРОВАННЫХ ГРИБОМ *FUSARIUM OXYSPORUM* РАСТЕНИЙ ОГУРЦА *CUCUMIS SATIVUS* L. ПРИ РАЗНЫХ СООТНОШЕНИЯХ СИНЕГО СВЕТА В ПОЛНОСПЕКТРАЛЬНЫХ КОМПОЗИЦИЯХ LED-ОСВЕЩЕНИЯ

И. Н. ДОМАНСКАЯ¹⁾, Л. Ф. КАБАШНИКОВА¹⁾,
Л. В. ПАШКЕВИЧ¹⁾, Я. Н. АРТЕМЧУК¹⁾, О. В. МОЛЧАН²⁾

¹⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

²⁾Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Исследовано влияние синего света (СС) на окислительный статус здоровых и инфицированных грибным патогеном *Fusarium oxysporum* растений огурца. Установлено, что воздействие патогенного гриба на растения огурца проявляется в усилении синтеза вторичных метаболитов – фенольных соединений, включая гидроксикоричные кислоты. Зарегистрировано высокое содержание полифенолов в здоровых листьях огурца, выращенных при длительном и коротком освещении с долей СС 20 % в полноспектральных LED-композициях, а также в образцах, сформировавшихся при коротком освещении с долей СС 60 %. В растениях, культивированных при длительном освещении в режимах белого света и 60 % СС, по сравнению с контрольными образцами инфицирование грибом *F. oxysporum* вызвало усиление синтеза полифенолов в 2,3 и 5,0 раза соответственно. Разные режимы полноспектрального LED-освещения с варьируемым соотношением СС и продолжительностью действия отличаются по своему влиянию на реализацию иммунного ответа в листьях огурца при фузариозном увядании: интенсивность перекисного окисления липидов усиливалась только при коротком пребывании растений на LED-освещении. Использование длительного LED-освещения с высокой долей СС (60 %) привело к значительному увеличению в инфицированных листьях огурца антирадикальной активности и содержания вторичных метаболитов, что свидетельствует об активации системы антиоксидантной защиты в качестве адаптационного механизма защиты от фитопатогена.

Образец цитирования:

Доманская ИН, Кабашникова ЛФ, Пашкевич ЛВ, Артемчук ЯН, Молчан ОВ. Окислительный статус здоровых и инфицированных грибом *Fusarium oxysporum* растений огурца *Cucumis sativus* L. при разных соотношениях синего света в полноспектральных композициях LED-освещения. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2025;3:16–25. EDN: PURFRS

For citation:

Domanskaya IN, Kabashnikova LF, Pashkevich LV, Artemchuk YaN, Molchan OV. Oxidative status of healthy and fungus *Fusarium oxysporum* infected cucumber *Cucumis sativus* L. plants at different blue light ratio in full-spectrum LED lighting compositions. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2025;3:16–25. Russian. EDN: PURFRS

Авторы:

Ирина Николаевна Доманская – кандидат биологических наук, доцент; старший научный сотрудник лаборатории прикладной биофизики и биохимии.

Людмила Федоровна Кабашникова – доктор биологических наук, член-корреспондент НАН Беларуси, доцент; заведующий лабораторией прикладной биофизики и биохимии.

Любовь Валерьевна Пашкевич – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории прикладной биофизики и биохимии.

Яна Николаевна Артемчук – младший научный сотрудник лаборатории прикладной биофизики и биохимии.

Ольга Викторовна Молчан – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией водного обмена и фотосинтеза растений.

Authors:

Irina N. Domanskaya, PhD (biology), docent; senior researcher at the laboratory of applied biophysics and biochemistry. domanin07@mail.ru

Luidmila F. Kabashnikova, doctor of science (biology), corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, docent; head of the laboratory of applied biophysics and biochemistry.

kabashnikova@ibp.org.by

Lyubov V. Pashkevich, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of applied biophysics and biochemistry.

ljubi.k87@gmail.com

Yana N. Artemchuk, junior researcher at the laboratory of applied biophysics and biochemistry.

yanaart222@gmail.com

Olga V. Molchan, PhD (biology), docent; head of the laboratory of water exchange and photosynthesis of plants.

olga_molchan@mail.ru

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L.; *Fusarium oxysporum*; фенольные соединения; гидроксикоричные кислоты; перекисное окисление липидов; антирадикальная активность.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Биотехнологии-2» на 2021–2025 гг. (подпрограмма «Молекулярные и клеточные биотехнологии – 2»).

OXIDATIVE STATUS OF HEALTHY AND FUNGUS *FUSARIUM OXYSPORUM* INFECTED CUCUMBER *CUCUMIS SATIVUS* L. PLANTS AT DIFFERENT BLUE LIGHT RATIO IN FULL-SPECTRUM LED LIGHTING COMPOSITIONS

I. N. DOMANSKAYA^a, L. F. KABASHNIKOVA^a,
L. V. PASHKEVICH^a, Ya. N. ARTEMCHUK^a, O. V. MOLCHAN^b

^aInstitute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

^bV. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

Corresponding author: I. N. Domanskaya (domanin07@mail.ru)

Abstract. The effect of blue lighting (BL) on the oxidative status of healthy and fungal pathogen *Fusarium oxysporum* infected cucumber plants was studied. It was found that the impact of the pathogenic fungus on cucumber plants is manifested in increased synthesis of secondary metabolites – phenolic compounds, including hydroxycinnamic acids. A high content of polyphenols was recorded in healthy cucumber leaves under long and short lighting with a BL share of 20 % in full-spectrum LED compositions, as well as in samples formed under short lighting with a BL share of 60 %. In plants grown under long lighting in white light and 60 % BL modes, compared to control samples, infection with the fungus *F. oxysporum* caused an increase in the synthesis of polyphenols by 2.3 and 5.0 times, respectively. Different modes of full-spectrum LED lighting with a variable BL ratio and duration of action differ in their effect on the immune response in cucumber leaves during fusarium wilt: the intensity of lipid peroxidation increases only with a short stay of plants on LED lighting. The use of long LED lighting with a high BL share (60 %) leads to a significant increase in antiradical activity in infected cucumber leaves and the content of secondary metabolites, which indicates the activation of the antioxidant defense system as an adaptive mechanism of protection against phytopathogen.

Keywords: *Cucumis sativus* L.; *Fusarium oxysporum*; phenolic compounds; hydroxycinnamic acids; lipid peroxidation; antiradical activity.

Acknowledgements. This work was carried out within the framework of the state programme of scientific research «Biotechnology-2» for 2021–2025 (subprogramme «Molecular and cellular biotechnology – 2»).

Введение

Выращивание овощных культур, включая огурцы, часто происходит в теплицах с использованием светодиодной технологии. Ее преимуществами являются значительно улучшенная энергоэффективность освещения и возможность контролировать спектральный состав света в течение суточного цикла и онтогенеза растений. Применяемые в настоящее время светодиодные технологии весьма перспективны, они требуют научного обоснования и проверки качества LED-освещения. Спектральный состав света выступает важным фактором, определяющим морфогенез растения. Известно, что в процессе формирования растений *Arabidopsis thaliana* на светодиодном красном свете (КС) при варьировании соотношения КС и синего света (СС) от КС/СС = 1 до КС/СС = 5 стимулировались прибавка сухой массы растений, разрастание корней, стеблей и другие процессы [1], повышалось содержание хлорофилла, возрастала эффективность функционирования фотосистемы II, наблюдалось более раннее образование соцветий и увеличение их количества по сравнению с тем результатом, который достигался при использовании люминесцентного освещения [2]. Добавление СС оказывало позитивное влияние на развитие растений, а применение в светокультуре КС и СС имело синергетический эффект, причем оптимальное соотношение КС, дальнего красного света (ДКС) и СС для каждой культуры индивидуально [3; 4]. В работе [3] описано увеличение антиоксидантной способности листьев салата, шпината, капусты при выращивании на КС

с добавлением 17 % СС, базилика и перца при выращивании на КС с добавлением 9 % СС. В этой связи важным условием успешного формирования огурца в светокультуре является подбор оптимального спектрального состава света.

В постоянно изменяющихся условиях внешней среды растения подвергаются воздействию различных факторов биотической и абиотической природы, к негативному влиянию которых они адаптируются, формируя механизмы противодействия. К объективным причинам значительного снижения урожая важнейших продовольственных культур можно отнести заражение возбудителями грибных болезней. Огромное разнообразие грибных патогенов, их высокая вариабельность и возможность приспосабливаться к растению-хозяину представляют собой серьезную проблему защиты растений. Одним из опаснейших патогенов является грибок *Fusarium oxysporum*. В исследовании [5] отмечено, что световые сигналы модулируют защитные реакции растений в ответ на атаки патогенов. В настоящее время светозависимое формирование устойчивости растений к фитопатогенам показано на ряде растений [6–8]. В работах, выполненных в основном на мутантах *A. thaliana*, обсуждаются механизмы регуляции активности про- и антиоксидантных систем в инфицированных растениях при изменении светового режима [9; 10]. Сегодня разрабатываются и применяются на практике множество методов борьбы с грибной инфекцией на сельскохозяйственных культурах, однако наиболее перспективным направлением является поиск средств повышения общей неспецифической устойчивости растений (иммунного статуса) путем изменения антиоксидантной защиты. Наряду с конститутивной устойчивостью у растений существуют механизмы активной устойчивости, нацеленной на предотвращение последствий инвазии патогена. Важным компонентом такой защиты служат низкомолекулярные антиоксиданты, к которым относят аскорбиновую кислоту, глутатион, каротиноиды, фенольные соединения и другие соединения, которые нейтрализуют образующиеся активные формы кислорода для сохранения жизнеспособности растений в стрессовых условиях фузариоза.

Фенольные соединения (более 9000 соединений) являются обязательными компонентами клеток высших растений, выполняющими разнообразные функции [11; 12]. В публикациях [11; 13–17] описано их участие в окислительно-восстановительных процессах (компоненты электрон-транспортных цепей дыхания и фотосинтеза) и реакциях иммунитета, а также в процессах передачи сигналов при патогенезах, формирования устойчивости, образования структурных компонентов клеточной стенки (лигнина), накопления запасных веществ. Основными фенольными соединениями у высших растений являются фенилпропаноиды и флавоноиды. Будучи весьма реакционноспособными веществами, эти вторичные метаболиты могут инактивировать свободные радикалы. Наибольшее внимание исследователи уделяют анализу антиоксидантных свойств флавоноидов, которые активно используются в медицине и фармакологии. Функции фенилпропаноидов, в состав которых входят гидроксикоричные кислоты, интенсивно изучаются [18]. В последнее время отечественные исследователи используют препарат «Циркон», синтезированный на основе смеси гидроксикоричных кислот [19; 20], которые принимают участие в регуляции физиолого-биохимических процессов.

Цель настоящего исследования – изучение роли полноспектрального LED-освещения с варьлируемым соотношением и продолжительностью действия СС в реализации иммунного ответа при фузариозном увядании растений огурца, который наблюдался по изменению количества в листьях вторичных метаболитов – полифенольных соединений, включая гидроксикоричные кислоты, а также по антирадикальной активности и содержанию продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили с зелеными растениями огурца *Cucumis sativus* L. сорта Кустовой, выращенными с фотопериодом 14 ч света и 10 ч темноты при температуре 24 °С и влажности 65 % в грунте на основе торфа «Универсальный» (*Terra Vita*, Россия).

Выращивание образцов, режимы освещения и обработка патогенным грибом. Для подбора оптимальных световых режимов использовали два варианта светодиодного освещения: 1) длительное освещение (25 дней); 2) короткое освещение (7 дней). В первом случае растения огурца выращивали на полихроматическом свете с разной долей квантов СС (20 и 60 %) с начала появления настоящих листьев до 25 дней, затем переносили в условия белого света (БС) на 3 дня, предварительно обработав листья первого и второго ярусов спорами патогенного гриба *F. oxysporum*. Во втором случае растения огурца культивировали на полихроматическом БС до 18 дней с последующим переносом на синее LED-освещение с разной долей квантов СС (20 и 60 %) на 7 дней, после чего инфицировали патогенным грибом и помещали под белое LED-освещение на 3 дня. Использовали LED-светильники, включающие все диапазоны физиологически активной радиации (400–800 нм) в различном соотношении. В варианте «20 % СС» доля СС, КС + ДКС и зеленого света составила около 20; 70 и 10 % суммарного светового потока соответственно

(рис. 1, а). В варианте «60 % СС» доля СС, КС + ДКС и зеленого света была равна 60; 30 и 10 % суммарного светового потока соответственно (рис. 1, б). Контролем служили растения огурца, сформированные под белыми LED-светильниками (вариант «БС»). Интенсивность света составляла около 100 мкмоль квантов на 1 м² в секунду для всех вариантов освещения. Искусственное инфицирование грибным патогеном *F. oxysporum*, вызывающим фузариозное увядание растений, проводили суспензией, которая содержит $1 \cdot 10^6$ спор на 1 мл из расчета 5 мл на растение. Анализ проводили через 3 дня после заражения, используя листья первого яруса. Контролем служили растения всех вариантов, обработанные дистиллированной водой. Патогенный грибок *F. oxysporum* предварительно выращивали на картофельно-глюкозном агаре в течение 2 недель.

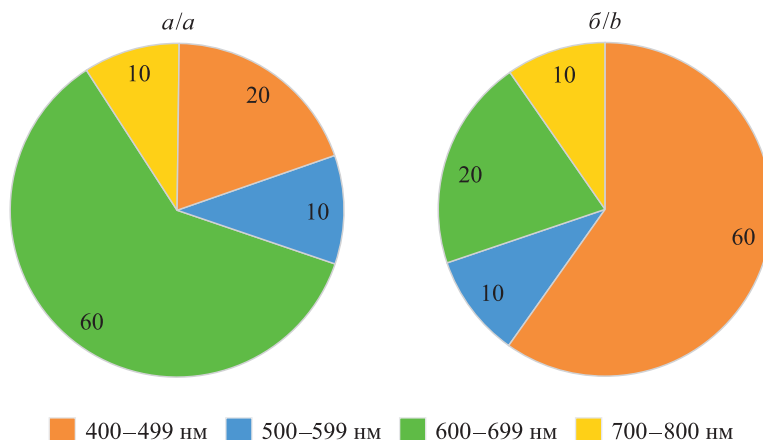


Рис. 1. Соотношение физиологически значимых спектральных диапазонов LED-освещения в разных вариантах опыта (20 % СС (а), 60 % СС (б))

Fig. 1. Ratio of physiologically significant spectral ranges of LED lighting in different experimental variants (20 % blue light (BL) (а), 60 % BL (б))

Определение фенольных соединений, включая гидроксикоричные кислоты. Фенольные соединения экстрагировали 96 % этанолом из измельченного и замороженного жидким азотом растительного материала в течение 60 мин при температуре 45 °С [21]. Гомогенат центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 5 мин (центрифуга Microfuge-16 (*Beckman Coulter*, США)). Супернатант использовали для определения суммарного содержания фенольных соединений с коммерческим реактивом Фолина – Чокальтеу (*PanReas AppliChem*, Германия). Для проведения реакции к 0,075 мл исследуемого экстракта добавляли 0,075 мл реактива Фолина – Чокальтеу, 0,150 мл 20 % раствора Na₂CO₃ и 1,20 мл дистиллированной воды. Смесь выдерживали 24 ч. Спектры поглощения веществ, образовавшихся при взаимодействии реактива Фолина – Чокальтеу и этанольных экстрактов из листьев огурца, регистрировали на спектрофотометре UV-2401PC (*Shimadzu*, Япония) в области 400–800 нм, при этом наблюдали широкий максимум в диапазоне 760–765 нм. Суммарное содержание фенольных соединений рассчитывали исходя из калибровочной кривой, построенной для препарата галловой кислоты. Раствор галловой кислоты готовили путем разведения коммерческого препарата (*Serva*, Германия) в 96 % этаноле в пределах концентраций 10–100 мкг/мл.

Для определения содержания гидроксикоричных кислот использовали 96 % спиртовой экстракт из листьев огурца (0,1 г) с последующей инкубацией в течение 45 мин при температуре 45 °С. Затем в кювету наливали 0,1 мл экстракта и 0,9 мл дистиллированной воды. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре UV-VIS PB 2201 (ЗАО «Солар», Беларусь) при 330 и 400 нм [22]. Расчет содержания гидроксикоричных кислот осуществляли по калибровочной кривой, которая была построена по кофейной кислоте.

Определение антирадикальной активности. Для проведения оценки антирадикальной активности использовали методику спектрофотометрического измерения кинетики восстановления молекул стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH) антиоксидантами растений [23]. Стандартный раствор DPPH ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) в этаноле, подкисленном уксусной кислотой, разводили этанолом в соотношении 1 : 10 в целях получения рабочего раствора. Данный раствор должен иметь оптическую плотность не выше 0,9 при 517 нм. К 5 мл рабочего раствора DPPH добавляли 50 мкл исследуемых экстрактов, перемешивали и регистрировали кинетику убыли оптической плотности раствора в течение 30 мин при 517 нм на спектрофотометре UV-2401PC. В качестве контрольного образца использовали рабочий раствор DPPH.

Антирадикальную активность определяли по следующей формуле:

$$\text{процент ингибирования} = A_{\text{контр}} - \frac{A_x}{A_{\text{контр}}} \cdot 100,$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{\text{контр}}$ – оптическая плотность исследуемого образца.

Определение активности ПОЛ. Для анализа активности ПОЛ определяли количество малонового диальдегида (МДА) по методу, приведенному в работе [24]. Растительный материал гомогенизировали в 5 ммоль/л фосфатном буфере (pH 7,2). К гомогенату добавляли равный объем 0,5 % тиобарбитуровой кислоты (ТБК) в 20 % трихлоруксусной кислоте. Полученные образцы нагревали на кипящей бане в течение 20 мин, охлаждали и центрифугировали при 3000 об/мин (центрифуга Microfuge-16). Измерение оптической плотности проводили при 532 нм на спектрофотометре UV-VIS PB 2201. Количество МДА рассчитывали с учетом миллимолярного коэффициента экстинкции комплекса МДА – ТБК, который с поправкой на неспецифическое поглощение при 600 нм составил $155 \cdot 10^5$ моль/(л⁻¹ · см⁻¹) [25].

Статистическая обработка полученных результатов. Исследования проводили в 3–4-кратной биологической повторности. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью методов параметрической и непараметрической статистики [26]. Достоверность различий средних значений между вариантами определяли с учетом *t*-критерия Стьюдента для принятого уровня значимости ($p \leq 0,05$), использовали компьютерные программы *Statistica* (версия 10.0) (*StatSoft*) и *Excel 2019* (*Microsoft*). Приводили средние значения и ошибки средней величины.

Результаты и их обсуждение

Анализ роста и развития растений огурца в условиях LED-освещения и последующего фузариозного инфицирования. Проведены эксперименты на растениях огурца, формирование которых происходило при LED-освещении различного спектрального состава (БС, 20 % СС, 60 % СС) и варьировании продолжительности такого освещения, а затем при их инфицировании патогенным грибом *F. oxysporum*. На рис. 2 видно, что при выращивании в условиях разного соотношения СС и КС в полноспектральных композициях светодиодного освещения с уровнем плотности потока фотонов 100 мкмоль квантов на 1 м² в секунду ростовые показатели растений огурца (общая длина стебля, длина междоузлий и площадь листьев) различаются. Известное увеличение высоты растений под влиянием СС наблюдали как при длительном, так и при коротком периоде роста под синими LED-светильниками с разным вкладом СС, что, вероятно, связано с отсутствием в них полноценной фитохромной системы, принимающей участие в регуляции ростовых процессов, либо опосредовано действием фототропинов, запускающих реакцию фототропизма [27]. Так, образцы, выросшие при длительном и коротком освещении с долей СС 60 %, были выше, чем образцы, выросшие при БС, в 3,5 и 2,0 раза соответственно. Листья огурца разных вариантов в наших опытах также отличались по таким биометрическим показателям, как общая площадь листовой пластинки и показатель удельной поверхностной плотности листа (данные не приведены). Растения становились более компактными, площадь листовых пластинок увеличилась уже через 7 дней развития на свету с низкой долей СС (20 %). Площадь листьев огурца, выращенных при коротком освещении с долей СС 60 %, была меньше на 40 % по сравнению с этим параметром у растений, выращенных в тех же условиях с долей СС 20 %. За 3 дня фузариозного инфицирования значительные изменения в измеряемых параметрах не были зарегистрированы.

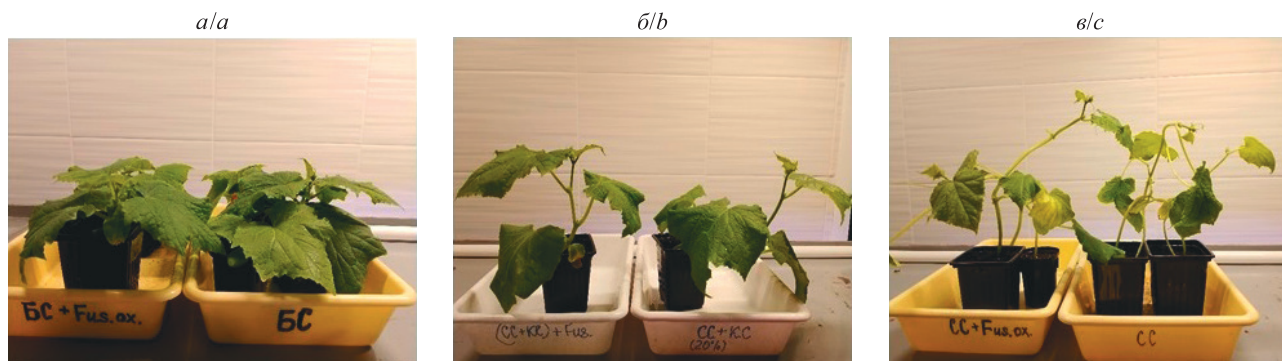


Рис. 2. Внешний вид здоровых и инфицированных грибом *F. oxysporum* растений огурца сорта Кустовой, выращенных при длительном LED-освещении разного спектрального состава (БС (а), 20 % СС (б), 60 % СС (в))

Fig. 2. External appearance of healthy and fungus *F. oxysporum* infected cucumber plants of the Kustovoi variety, grown under long LED lighting of different spectral compositions (white light (WL) (a), 20 % BL (b), 60 % BL (c))

Влияние LED-освещения и последующего фузариозного инфицирования на антирадикальную активность в листьях огурца. Антирадикальную активность в исследуемых образцах регистрировали спектрофотометрическим методом по изменению кинетики восстановления молекул DPPH антиоксидантами растений (рис. 3). У образцов из инфицированных листьев огурца, выращенных при длительном и коротком освещении с долей СС 60 %, зарегистрировали наиболее высокую способность к тушению свободных радикалов в расчете на 1 мл экстракта и факт увеличения этого показателя относительно контроля (178 и 169 % соответственно). Спиртовые растворы, которые изготовлены из инфицированных листьев огурца, находившихся на длительном и коротком освещении в режиме 20 % СС, показали статистически достоверное снижение антирадикальной активности. Следует отметить, что для установления механизма антирадикальной активности требуется детальное исследование качественного и количественного состава экстрактов на содержание составных компонентов (полифенолов, флавоноидов, танинов и др.).

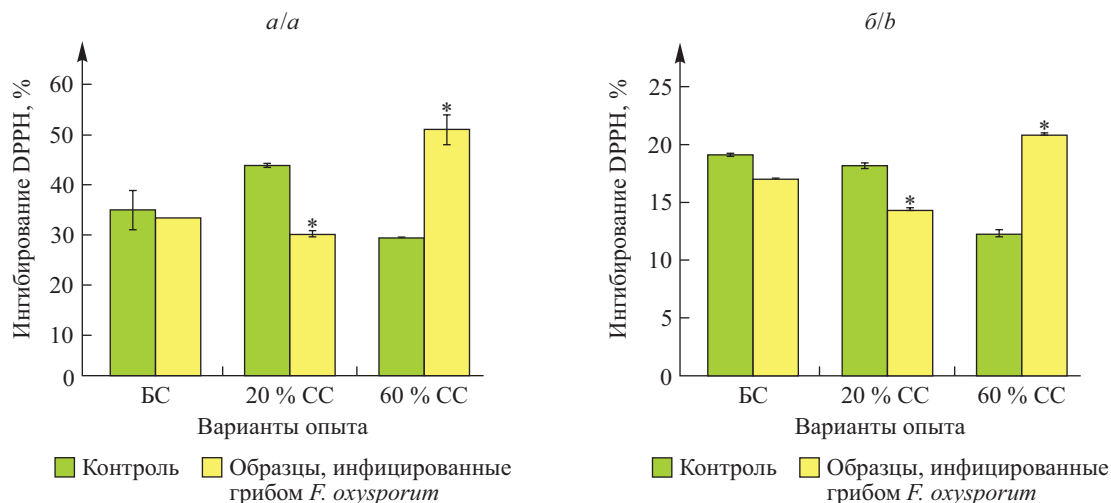


Рис. 3. Антирадикальная активность в листьях огурца, выращенных при длительном (а) и коротком (б) LED-освещении разного спектрального состава (БС, 20 % СС, 60 % СС), а затем инфицированных грибом *F. oxysporum*. Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю ($p \leq 0,05$)

Fig. 3. Antiradical activity in cucumber leaves grown under long (a) and short (b) LED lighting of different spectral compositions (WL, 20 % BL, 60 % BL) and then infected with the fungus *F. oxysporum*. Sign * marked significant differences in relation to control ($p \leq 0.05$)

Влияние LED-освещения и последующего фузариозного инфицирования на накопление вторичных метаболитов в листьях огурца. Антиоксидантные и антирадикальные свойства вторичных метаболитов обусловлены их химической структурой. Наличие гидроксильных групп позволяет им взаимодействовать со свободными радикалами разного происхождения и ликвидировать дисбаланс, возникающий при влиянии грибных токсинов или экологических стрессоров. Результаты тестирования здоровых растений огурца, культивированных при длительном и коротком освещении на БС и 20 % СС, приведены на рис. 4. В ходе анализа данных установлено, что листья огурца, выращенные на БС, синтезировали в 2 раза меньше фенольных соединений (10 мг-экв галловой кислоты на 1 г сырой массы), чем образцы, выращенные на 20 % СС. В физиологических условиях культивирования при длительном освещении с долей СС 60 % содержание полифенолов составило в среднем 4,7 мг-экв галловой кислоты на 1 г сырой массы, в то время как при коротком освещении с той же долей СС оно осталось на уровне 20,0 мг-экв галловой кислоты на 1 г сырой массы. В ответ на патогенное заражение грибом *F. oxysporum* растения, находившиеся на длительном освещении в режимах БС и 60 % СС, по сравнению с контрольными образцами, накапливали в листьях в 2,3 и 5,0 раза больше полифенолов соответственно. Длительное и короткое освещение с долей СС 20 % вызвало лишь небольшую деградацию полифенолов в инфицированных листьях. Следовательно, воздействие патогена на растения огурца, формировавшиеся длительное время в условиях БС и 60 % СС, приводит к увеличению способности синтеза защитных вторичных метаболитов. Среди многочисленных функций полифенолов особенно выделяют их влияние на устойчивость растений к грибным заболеваниям. Сделано предположение о том, что высокое содержание фенольных соединений в образцах, выращенных при длительном и коротком освещении в режиме 20 % СС (приблизительно 20,0 мг-экв галловой кислоты на 1 г сырой массы), может способствовать локализации инфекции и ограничению развития патологического процесса (данный факт был визуально отмечен в таких образцах).

К группе фенольных соединений относятся и биологически активные вещества – гидроксикоричные кислоты, широко распространенные в растениях и принимающие участие в их защите от инфекционных заболеваний и повреждений насекомыми [18]. Эти соединения характеризуются антиоксидантными свойствами, которые связаны с торможением свободнорадикальных процессов окисления за счет наличия гидроксильных групп, присоединенных непосредственно к ароматическому ядру. Согласно представленным на рис. 5 результатам при исследовании здоровых листьев огурца наибольшее количество гидроксикоричных кислот наблюдалось в контрольных образцах, которые формировались длительное время при 20 % CC (10,0 мг-экв кофейной кислоты на 1 г сырой массы). Для образцов, выращенных в режимах БС и 60 % CC, количество этих производных кофейной кислоты зарегистрировано на уровне 2,6 и 3,9 мг-экв кофейной кислоты на 1 г сырой массы соответственно. Заражение грибом *F. oxysporum* спровоцировало значительное увеличение содержания данных вторичных метаболитов: почти в 3,5 раза по сравнению с контрольными образцами, выращенными на БС, и в 2,5 раза по сравнению с листьями огурца, находившимися на длительном освещении с долей CC 60 %.

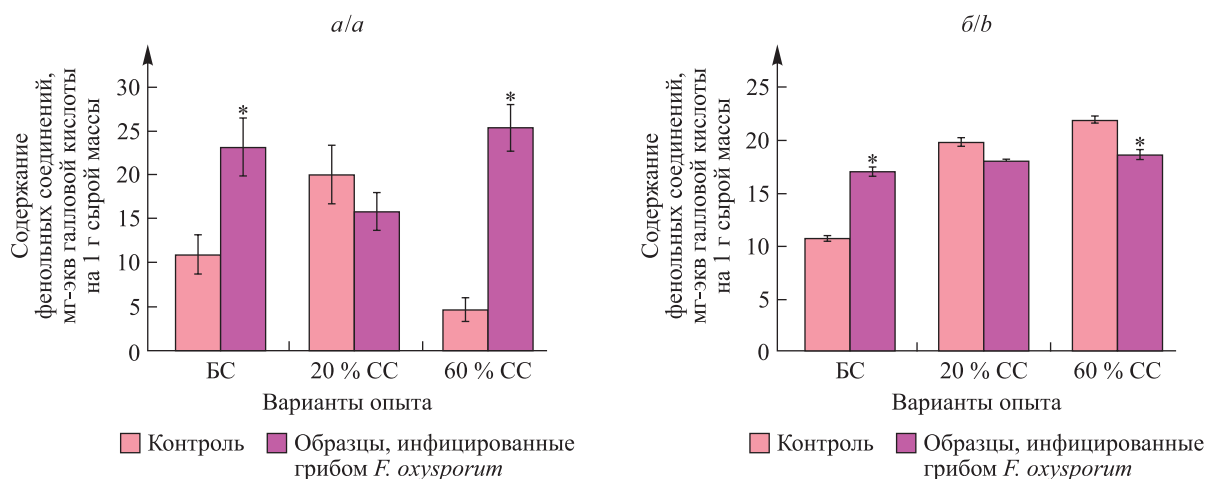


Рис. 4. Содержание фенольных соединений в листьях огурца, выращенных при длительном (а) и коротком (б) LED-освещении разного спектрального состава (БС, 20 % CC, 60 % CC), а затем инфицированных грибом *F. oxysporum*. Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю ($p \leq 0,05$)

Fig. 4. Content of phenolic compounds in cucumber leaves grown under long (a) and short (b) LED lighting of different spectral compositions (WL, 20 % BL, 60 % BL) and then infected with the fungus *F. oxysporum*. Sign * marked significant differences in relation to control ($p \leq 0.05$)

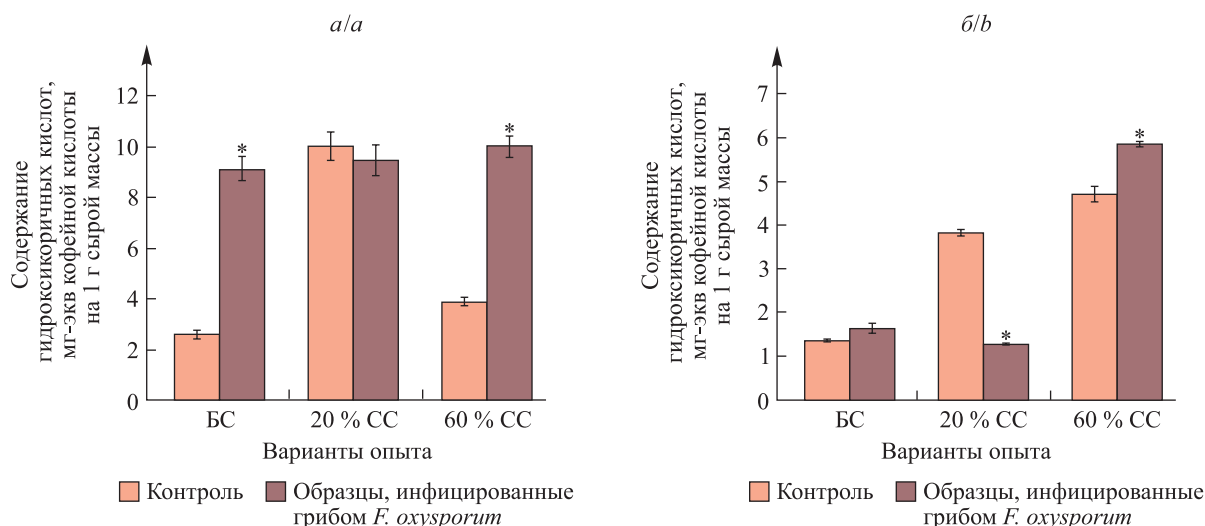


Рис. 5. Содержание гидроксикоричных кислот в листьях огурца, выращенных при длительном (а) и коротком (б) LED-освещении разного спектрального состава (БС, 20 % CC, 60 % CC), а затем инфицированных грибом *F. oxysporum*. Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю ($p \leq 0,05$)

Fig. 5. Content of hydroxycinnamic acids in cucumber leaves grown under long (a) and short (b) LED lighting of different spectral compositions (WL, 20 % BL, 60 % BL) and then infected with the fungus *F. oxysporum*. Sign * marked significant differences in relation to control ($p \leq 0.05$)

Иммунный ответ с участием гидроксикоричных кислот особенно четко выразился в здоровых растениях, формировавшихся длительное время при 20 % СС (10,0 мг-экв кофейной кислоты на 1 г сырой массы). После заражения растений в листьях оказалось вполне достаточное для проявления защитного эффекта количество вторичных метаболитов (94,5 % относительно контроля).

Влияние LED-освещения и последующего фузариозного инфицирования на активность ПОЛ в листьях огурца. Для характеристики развития окислительных процессов в растениях огурца, сформированных в условиях LED-освещения, определяли содержание МДА, количество которого характеризует интенсивность ПОЛ и выступает одним из важнейших показателей устойчивости растений. Вместе с тем продукты ПОЛ способны являться индикаторами и первичными медиаторами стресса как особого состояния клетки, которое может привести к увеличению ее резистентности [28]. Показано, что интенсивность ПОЛ в растениях огурца при длительном выращивании на БС была выше, чем при длительном выращивании в режимах 20 % СС и 60 % СС, на 27 и 20 % соответственно (рис. 6, а). Инфицирование растений огурца грибом *F. oxysporum* способствовало достоверному снижению количества конечных продуктов ПОЛ (на 15 %) в листьях по сравнению с уровнем в контрольных образцах, однако активность перекисления липидов практически не изменялась по сравнению с соответствующими показателями в контрольных образцах, сформированных при 20 % СС и 60 % СС. Иную картину наблюдали при регистрации свободно-радикальных процессов в листьях огурца, выращенных при коротком освещении. Изначально низкий уровень продуктов ПОЛ не различался во всех вариантах опыта (рис. 6, б). После 3-дневного патогенного влияния гриба *F. oxysporum* зарегистрировали значительное увеличение количества конечных продуктов ПОЛ: в 3,0; 2,0 и 3,5 раза для образцов, выращенных при БС, 20 % СС и 60 % СС соответственно.

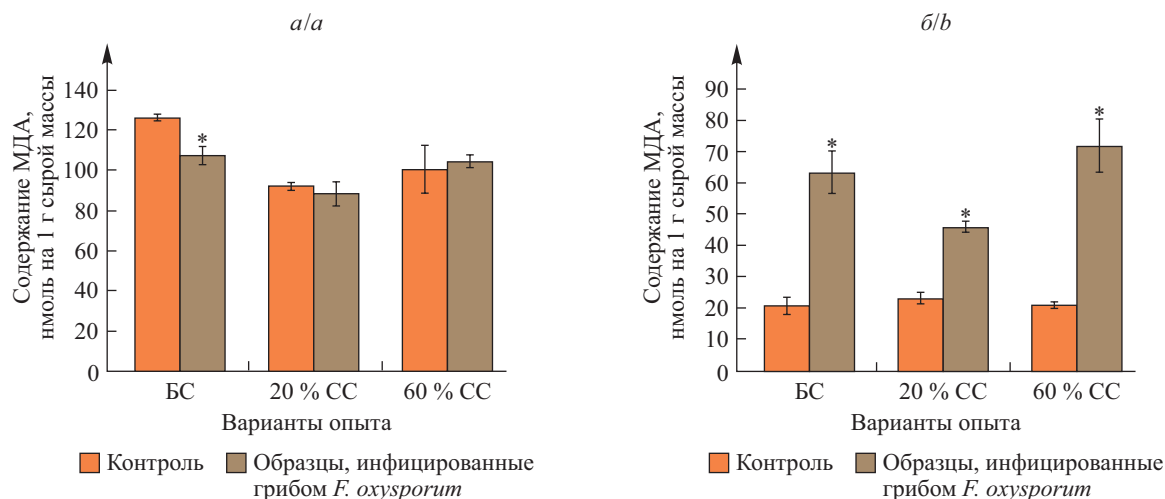


Рис. 6. Содержание МДА в листьях огурца, выращенных при длительном (а) и коротком (б) LED-освещении разного спектрального состава (БС, 20 % СС, 60 % СС), а затем инфицированных грибом *F. oxysporum*. Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю ($p \leq 0,05$)

Fig. 6. MDA content in cucumber leaves grown under long (a) and short (b) LED lighting of different spectral compositions (WL, 20 % BL, 60 % BL) and then infected with the fungus *F. oxysporum*. Sign * marked significant differences in relation to control ($p \leq 0.05$)

Полученные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности процессов ПОЛ, протекающих в листьях огурца, как к длительности применяемого LED-освещения и его составу, так и к инфицированию, связанному с развитием патогенного гриба *F. oxysporum* в растительных тканях. Вероятным объяснением обнаруженного возрастания активности ПОЛ при длительном освещении является светозависимое усиление генерации активных форм кислорода по реакциям Фентона и Габера – Вейса при транспорте электронов в хлоропластах и (или) при фотодыхании в пероксисомах [29]. Вместе с тем инфицирование растений огурца *F. oxysporum* в этих световых условиях не приводило к избыточному росту перекисной деградации липидов при любом спектральном соотношении, что свидетельствует о довольно сильной первичной активации иммунных процессов в растении в ответ на длительное световое воздействие. На фоне короткого освещения в условиях грибного заражения активность окислительных процессов в листьях огурца в большей мере зависела от спектрального состава применяемого LED-освещения, в частности от преобладания в нем доли СС. Небольшое увеличение доли квантов СС (20 %) при грибном инфицировании стабилизировало протекание окислительных процессов в биомембранах клеток огурца за счет индукции защитных механизмов, которые ограничивают вызванные биотическим стрессом повреждения, снижая содержание конечного продукта ПОЛ – МДА.

Заключение

При проведении исследования было установлено, что здоровые листья огурца, длительно выращиваемые в режимах БС и с разной долей СС в полноспектральных композициях LED-освещения, различаются по своему окислительному статусу. Использование длительного освещения с высокой долей СС (60 %) приводит к значительному увеличению антирадикальной активности в листьях огурца, инфицированных грибом *F. oxysporum*, и содержания вторичных метаболитов – фенольных соединений, включая гидроксикоричные кислоты. Вместе с тем интенсивность процессов ПОЛ усиливается только при коротком пребывании растений на LED-освещении с высокой долей СС (60 %). Ранее полученные нами результаты подавления функциональной активности как фотосистемы I хлоропластных мембран огурца, так и стрессочувствительной фотосистемы II [30] в совокупности с представленной информацией о синтезе вторичных метаболитов, которые сформировались при LED-освещении растений огурца, инфицированных патогеном *F. oxysporum*, указывают на необходимость добавления СС для улучшения роста и антиоксидантной защиты культуры огурца в контролируемой среде. Данные сведения могут быть использованы для разработки новых методов стимуляции иммунитета растений огурца на основе световой регуляции защитных реакций в фотосинтезирующих тканях высших растений.

Библиографические ссылки

1. Закурин АО, Щенникова АВ, Камионская АМ. Светокультура растениеводства защищенного грунта: фотосинтез, фотоморфогенез и перспективы применения светодиодов. *Физиология растений*. 2020;67(3):246–258. DOI: 10.31857/S0015330320030227.
2. Куделина ТН, Кривобок АС, Бибикина ТН, Молчан ВО. Особенности фотоморфогенеза *Arabidopsis thaliana* при использовании LED-освещения различного спектрального состава. *Весті Національної академії наук України. Серія біологічних наук*. 2021;66(1):42–52. DOI: 10.29235/1029-8940-2021-66-1-42-52.
3. Naznin MT, Lefsrud M, Gravel V, Azad MOK. Blue light added with red LEDs enhance growth characteristics, pigment content and antioxidant capacity in lettuce, spinach, kale, basil, and sweet pepper in a controlled environment. *Plants*. 2019;8(4):93–104. DOI: 10.3390/plants8040093.
4. Yan Z, He D, Niu G, Zhou Q, Qu Y. Growth, nutritional quality, and energy use efficiency in two lettuce cultivars as influenced by white plus red versus red plus blue LEDs. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*. 2020;13(2):33–40. DOI: 10.25165/j.ijabe.20201302.5135.
5. Fernandez-Milmanda GL, Crocco CD, Reichelt M, Mazza CA, Köllner TG, Zhang T, et al. A light-dependent molecular link between competition cues and defence responses in plants. *Nature Plants*. 2020;6(3):223–230. DOI: 10.1038/s41477-020-0604-8.
6. Lozano JC, Sequeira L. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. *Phytopathology*. 1970;60:833–838. DOI: 10.1094/Phyto-60-833.
7. Reimers PJ, Guo A, Jan E. Increased activity of a cationic peroxidase associated with an incompatible interaction between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice (*Oryza sativa*). *Leach Plant Physiology*. 1992;99(3):1044–1050. DOI: 10.1104/pp.99.3.1044.
8. Griebel T, Zeier J. Light regulation and daytime dependency of inducible plant defenses in *Arabidopsis*: phytochrome signaling controls systemic acquired resistance rather than local defense. *Plant Physiology*. 2008;147:790–801. DOI: 10.1104/pp.108.119503.
9. Kangasjärvi S, Neukermans J, Li S, Aro E-M, Noctor G. Photosynthesis, photorespiration, and light signaling in defense responses. *Journal of Experimental Botany*. 2012;63(4):1619–1636. DOI: 10.1093/jxb/err402.
10. Gollan PJ, Tikkanen M, Aro E-M. Photosynthetic light reactions: integral to chloroplast retrograde signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 2015;27:180–191. DOI: 10.1016/j.pbi.2015.07.006.
11. Запрометов МН. Фенольные соединения, распространение, метаболизм и функции в растениях. Москва: Наука; 1993. 272 с.
12. Bidel LP, Coumans M, Baissac Y, Patrick D, Jay-Allemand Ch. Biological activity of phenolics in plant cells. *Recent Advances in Polyphenol Research*. 2010;2:163–205. DOI: 10.1002/9781444323375.ch6.
13. Dixon RA, Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 1995;7(7):1085–1097. DOI: 10.1105/tpc.7.7.1085.
14. Kováčik J, Klejdus B. Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots. *Plant Cell Reports*. 2008;27(3):605–615. DOI: 10.1007/s00299-007-0490-9.
15. Lattanzio V, Kroon PA, Quideau S, Treutter D. Plant phenolics – secondary metabolites with diverse functions. *Recent Advances in Polyphenol*. 2008;1:1–35. DOI: 10.1002/9781444302400.CH1.
16. Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2013;72:1–20. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.05.009.
17. Загоскина НВ. Полифенолы высших растений: структура, биосинтез, экологическая роль. В: Васильев НВ, редактор. *Актуальные проблемы биологической и химической экологии. Сборник материалов V Международной научно-практической конференции; 21–23 ноября 2016 г.; Москва, Россия*. Москва: Московский государственный университет; 2016. с. 228–230. EDN: XRRALL.
18. Куркин ВА. Фенилпропаноиды как важнейшая группа биологически активных соединений лекарственных растений. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015;12:1338–1342.
19. Чмелёва СИ, Кучер ЕН, Соловей ЯН. Адаптогенное действие препарата «Циркон» на рост и развитие злаковых культур, районированных в республике. В: Кузнецов ВВ, редактор. *Фундаментальные и прикладные проблемы современной биологии растений. Сборник материалов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых, посвященной 125-летию Института физиологии растений имени К. А. Тимирязева*. Москва: Институт физиологии растений имени К. А. Тимирязева РАН; 2015. с. 718–722.

20. Малеванная НН, Пермитина ГВ. Регуляторы роста растений на природной основе с использованием последних достижений российской науки. *Гавриш*. 2005;1:19–22.
21. Николаева ТН, Лапшин ПВ, Загоскина НВ. Метод определения суммарного содержания фенольных соединений в растительных экстрактах с реактивом Фолина – Дениса и реактивом Фолина – Чокальтеу: модификация и сравнение. *Химия растительного сырья*. 2021;2:291–299. DOI: 10.14258/jcprm.2021028250.
22. Бубенчикова ВН, Левченко ВН. Разработка и валидация методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в траве хондриллы ситниковидной. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2015;16:168–173.
23. Тринеева ОВ. Методы определения антиоксидантной активности объектов растительного и синтетического происхождения в фармации (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;4:180–197.
24. Мерзляк МН. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки. Москва: ВИНТИ; 1989. 168 с. (Итоги науки и техники; том 6).
25. Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1968;125(1):189–198. DOI: 10.1016/0003-9861(68)90654-1.
26. Рокицкий ПФ. *Биологическая статистика*. 2-е издание. Минск: Высшая школа; 1973. 320 с.
27. Briggs WR, Christie JM. Phototropins 1 and 2 versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science*. 2002;7(5):204–210. DOI: 10.1016/s1360-1385(02)02245-8.
28. Курганова ЛН. Перекисное окисление липидов – одна из возможных компонент быстрой реакции на стресс. *Вестник Нижегородского университета имени Н. И. Лобачевского. Серия: Биология*. 2001;3:74–76.
29. Panchuk I, Pyrizhok R, Volkov R. Engineering of new plants cultivars with improved abiotic stress tolerance. *Annals of the Stefan cel Mare University of Suceava*. 2007;6:25–35.
30. Доманская ИН, Артемчук ЯН, Гордиенко СС. Активность фотосинтетических мембран в инфицированных *Fusarium oxysporum* растениях огурца (*Cucumis sativus* L.) при разной доле синего светодиодного освещения. *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. 2025;70(2):95–107. DOI: 10.29235/1029-8940-2025-70-2-95-107.

Получена 23.07.2025 / исправлена 08.09.2025 / принята 09.09.2025.
Received 23.07.2025 / revised 08.09.2025 / accepted 09.09.2025.

МЕХАНИЗМЫ ИНДУКЦИИ НАКОПЛЕНИЯ β -КАРОТИНА В КЛЕТКАХ МИКРОВОДОРОСЛИ *DUNALIELLA SALINA* ПРИ АЗОТНОМ ГОЛОДАНИИ

Т. В. САМОВИЧ¹⁾, А. Д. СВЕЧКО²⁾, Н. В. КОЗЕЛ^{3), 4)}

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

²⁾Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси,
пр. Независимости, 68-2, 220072, г. Минск, Беларусь

³⁾Биотехнологический научный центр,
пр. Пекинский, 18, Китайско-Белорусский индустриальный парк «Великий камень»,
222210, Смолевичский р-н, Минская обл., Беларусь

⁴⁾Крестьянское (фермерское) хозяйство «Серебряный ручей»,
222202, д. Сосновая, Озерицко-Слободской с/с,
Смолевичский р-н, Минская обл., Беларусь

Аннотация. Показано, что условия азотного голодания и действия света высокой интенсивности существенно влияют на пигментный состав клеток микроводоросли *Dunaliella salina* (штамм IBCE D-1) при ее культивировании. В частности, наблюдается снижение количества хлорофиллов и неоксантина в 7 раз, виолаксантина в 5 раз, лютеина в 4 раза на фоне повышения содержания β -каротина в клетках микроводоросли в 6 раз. Сочетанное действие азотного голодания и света высокой интенсивности является наиболее эффективным из исследованных в работе способов повышения продукции β -каротина клетками *D. salina*. Установлены снижение количества белка D1 реакционного центра фотосистемы II и частичная инактивация активности этой фотосистемы в клетках микроводоросли, культивируемых в условиях недостатка азота, что может быть ключевым фактором запуска повышенного синтеза β -каротина.

Ключевые слова: микроводоросль; *Dunaliella salina*; β -каротин; фотосинтетический аппарат; азотное голодание.

Образец цитирования:

Самович ТВ, Свечко АД, Козел НВ. Механизмы индукции накопления β -каротина в клетках микроводоросли *Dunaliella salina* при азотном голодании. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2025;3:26–37.
EDN: NUUFTG

For citation:

Samovich TV, Svehko AD, Kozel NV. Mechanisms of induction of β -carotene accumulation in microalgae *Dunaliella salina* cells with nitrogen starvation. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2025;3:26–37. Russian.
EDN: NUUFTG

Авторы:

Татьяна Викторовна Самович – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории роста и развития растений.

Алексей Дмитриевич Свечко – младший научный сотрудник центра «Лазерно-оптические технологии для медицины и биологии».

Николай Владимирович Козел – кандидат биологических наук, доцент; ведущий научный сотрудник³⁾, главный технолог⁴⁾.

Authors:

Tatsiana V. Samovich, PhD (biology); leading researcher at the laboratory of plant growth and development.

samovich77@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-3469-3752>

Alexei D. Svehko, junior researcher at the centre «Laser optical technologies for medicine and biology».

asvehko@mail.ru

<https://orcid.org/0009-0006-7096-0180>

Nikolay V. Kozel, PhD (biology), docent; leading researcher^c and chief technologist^d.

koz.el.mikalai@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-2958-7645>

MECHANISMS OF INDUCTION OF β -CAROTENE ACCUMULATION IN MICROALGAE *DUNALIELLA SALINA* CELLS WITH NITROGEN STARVATION

T. V. SAMOVICH^a, A. D. SVECHKO^b, N. V. KOZEL^{c, d}

^aV. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

^bB. I. Stepanov Institute of Physics, National Academy of Sciences of Belarus,
68-2 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220072, Belarus

^cBiotechnological Scientific Centre,
18 Piekinski Avenue, China-Belarus Industrial Park «Great Stone» 222210,
Smaliavichy District, Minsk Region, Belarus

^dPeasant (farm) economy «Serebryanyj ruchej», Sasnovaja 222202,
Aziarycka-Slabadski village council, Smaliavichy District, Minsk Region, Belarus

Corresponding author: N. V. Kozel (kozel.mikalai@gmail.com)

Abstract. It has been shown that conditions of nitrogen starvation and exposure to high intensity light significantly affect the pigment composition of cells of microalgae *Dunaliella salina* (strain IBCE D-1) during its cultivation. In particular, there is a decrease of the concentration of chlorophyll and neoxanthine by 7 times, violaxanthin by 5, lutein by 4 times against the background of an increase of the concentration of β -carotene in the cells of microalgae by 6 times. The combined effect of nitrogen starvation and high intensity light is the most effective of the methods studied in the work to increase the production of β -carotene by cells of *D. salina*. A decrease in the D1 protein amount of the reaction centre of photosystem II and a predominant activity suppression of this photosystem in the cells of microalgae cultivated in a nitrogen-deficient medium was found, which may be a key factor in increased synthesis of β -carotene.

Keywords: microalgae; *Dunaliella salina*; β -carotene; photosynthetic apparatus; nitrogen starvation.

Введение

Галофитная зеленая микроводоросль *Dunaliella salina*, относящаяся к семейству Dunaliellaceae, способна размножаться и расти при уровне солености от 0,5 до 5,0 моль/л NaCl [1]. Клетки микроводоросли имеют хлорофиллы *a* и *b*, содержание которых варьируется в диапазонах 50–59 и 19–25 % соответственно, а также каротиноиды (неоксантин, виолаксантин, лютеин и β -каротин), которые составляют 8–16 % всех пигментов клетки [2]. *D. salina* обладает способностью к накоплению значительного количества β -каротина при действии стрессоров разной природы. Благодаря этой особенности она является важнейшим источником натурального β -каротина и используется в качестве пищевой и кормовой добавки, косметологического средства и компонента препаратов для лечения и профилактики заболеваний. *D. salina* активно культивируется ввиду очень высокого итогового выхода данного пигмента: 2100,0 мг *транс*- β -каротина и 102,4 мг *цис*- β -каротина на 100 г микроводоросли против 5,8 мг *транс*- β -каротина и 2,8 мг *цис*- β -каротина на 100 г моркови [3]. В природе каротиноиды обычно встречаются в *транс*-форме. Однако при накоплении каротиноидов, индуцированном стрессорами различной природы, клетки *D. salina* могут синтезировать *цис*-изомеры с повышенным фармакологическим эффектом. В целом доля *цис*-изомеров в клетках растительных организмов является небольшой, но при этом в клетках *D. salina* доля 9-*цис*- β -каротина может составлять от трети до половины общего числа каротиноидов [3; 4]. *D. salina* обладает высокой метаболической и физиологической пластичностью, что позволяет ей жить в агрессивной высокосолевого среде, а также в больших количествах синтезировать биотехнологически значимые продукты, среди которых важное место занимает β -каротин. По результатам ряда исследований был сделан вывод о синтезе β -каротина как адаптивной реакции на изменение условий среды с благоприятных на экстремальные [5; 6]. Показатели содержания β -каротина, такие как степень его накопления и скорость синтеза, зависят от интенсивности и продолжительности действия стрессоров, в частности высокой интенсивности падающего света, высокой температуры окружающей среды и недостатка питательных веществ. Однако такие экстремальные условия могут повлиять на жизнеспособность *D. salina*, тем самым снижая количество клеток на единицу объема [3; 7; 8]. Исследования данной микроводоросли носят как фундаментальный, так и прикладной характер, и чаще всего главным интересом в них выступает организация эффективного производства β -каротина. В Беларуси имеется коллекция микроводорослей, в которой присутствует *D. salina* (штамм IBCE D-1) [9]. Этот штамм как продуцент β -каротина изучен недостаточно.

Цель данной работы – исследование влияния модификации состава питательной среды путем удаления из нее азота на продуцирование клетками *D. salina* (штамм IBCE D-1) β -каротина в условиях разной освещенности, а также раскрытие механизмов индукции его накопления.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали галофитную зеленую микроводоросль *D. salina* (штамм IBCE D-1) из альгологической коллекции Республиканского центра альгологии Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [9]. Ее культивировали в стеклянных колбах с рабочим объемом 50 мл на стандартной питательной среде Артари при светодиодном освещении (цветовая температура 4000 К) с интенсивностью 20 мкмоль квантов на 1 м² в секунду и фотопериодом 14 ч света и 10 ч темноты. Эксперименты проводили в строго контролируемых условиях окружающей среды: температура в световом периоде составляла (23 ± 1) °С, относительная влажность воздуха была равна 50 %.

Полная стандартная питательная среда Артари для *D. salina* имела такой состав: NaCl – 116,0 г/л; MgSO₄ · 7H₂O – 50,0 г/л; KNO₃ – 2,5 г/л; K₂HPO₄ – 0,2 г/л; FeSO₄ – 0,009 г/л; ЭДТА – 0,037 г/л; NaHCO₃ – 1,0 г/л; микроэлементы по Арнону – 2,0 мл на 1 л среды. Состав раствора микроэлементов был следующим: H₃BO₃ – 2,86 г/л; MnCl₂ · 4H₂O – 1,81 г/л; ZnSO₄ · 7H₂O – 0,222 г/л; MoO₃ – 176,4 мг на 10 л; NH₄VO₃ – 229,6 мг на 10 л. Для выяснения влияния модификации состава питательной среды, а именно удаления из нее биогенов, использовали дефицитную по азоту среду, которая не содержала KNO₃. Постановка эксперимента осуществлялась следующим образом. Суспензию микроводоросли *D. salina* известной оптической плотности центрифугировали 10 мин при 4000 g на центрифуге 3-18KS (*Sigma Laborzentrifugen GmbH*, Германия), супернатант удаляли, осадок промывали раствором NaCl (116 г/л) и затем снова центрифугировали 10 мин при 4000 g. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 30 мл питательной среды, после чего суспензию помещали в стеклянные колбы. Экспериментальные колбы с микроводорослью *D. salina* располагали под светом высокой интенсивности (*high intensity*, HI) (200 мкмоль квантов на 1 м² в секунду), а контрольные колбы – под светом низкой интенсивности (*low intensity*, LI) (20 мкмоль квантов на 1 м² в секунду). РАМ-флуориметрию и вестерн-блоттинг проводили после 2 сут инкубации суспензии *D. salina* на свету, анализ содержания фотосинтетических пигментов и подсчет клеток – после 14 сут инкубации. Для осуществления биохимических и молекулярно-биологических анализов (определения содержания фотосинтетических пигментов и белков фотосистем) отбирали по 12 мл суспензии из каждой колбы, центрифугировали 10 мин при 4000 g, супернатант удаляли, осадок промывали раствором NaCl (116 г/л) и снова центрифугировали 10 мин при 17 000 g на центрифуге Heraeus Pico 17 (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, США). Осадок замораживали и хранили до проведения анализа при температуре –24 °С.

Метод оценки продуктивности микроводоросли. Продуктивность микроводоросли *D. salina* оценивали по количеству клеток в единице объема суспензии. Подсчет осуществляли на 14-е сутки эксперимента с помощью камеры Горяева на микроскопе Nikon Eclipse TS100 (*Nikon*, Япония) [10].

Метод определения качественного и количественного состава фотосинтетических пигментов в клетках микроводоросли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Пигментный состав клеток *D. salina* определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), модифицированным в лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [11] согласно работам [12; 13]. В целях выполнения ВЭЖХ использовали 100 % ацетон для экстракции пигментов, раствор *A*, содержащий 90 % ацетонитрила, 9,9 % дистиллированной воды, 0,1 % триэтиламина, и раствор *B*, содержащий 100 % этилацетат. ВЭЖХ проводили с помощью хроматографа LC-20 Prominence (*Shimadzu*, Япония), используя хроматографическую колонку Nucleodur C18 Gravity (размер частиц 5 мкм, длина колонки 15 см) фирмы *Macherey-Nagel GmbH* (Германия). Разделение пигментов в хроматографической колонке осуществляли с использованием растворов *A* и *B* по программе, представленной в табл. 1, со скоростью потока 0,5 мл/мин. Объем инъекции составлял 30 мкл. Пигменты регистрировали детектором с диодной матрицей по спектрам поглощения в диапазоне 200–800 нм.

Таблица 1

Программа изменения концентрации растворителя

Table 1

Programme for changing the solvent concentration

Время, мин	Скорость потока, мл/мин	Раствор <i>A</i> , %	Раствор <i>B</i> , %	Режим
0,01	1,0	100	0	Линейный градиент
6,0	1,0	0	100	Изократический режим

Окончание табл. 1
Ending of the table 1

Время, мин	Скорость потока, мл/мин	Раствор А, %	Раствор В, %	Режим
9,0	1,0	0	100	Линейный градиент
9,50	1,0	100	0	Изократический режим
12,50	1,0	100	0	Остановка

Для визуализации профиля хроматограммы выделяли спектр поглощения при 440 нм. В целях количественного определения пигментов использовали площади пиков хроматограммы. Расчет содержания пигментов проводили по формуле

$$C_{\text{пигм}} = \frac{S_{440} F_{\text{пигм}} V}{V_{\text{аликв}} l},$$

где $C_{\text{пигм}}$ – содержание пигмента, мкг на 1 мл суспензии; S_{440} – площадь пика поглощения при 440 нм; $F_{\text{пигм}}$ – фактор (коэффициент) для расчета содержания пигмента; V – объем супернатанта; $V_{\text{аликв}}$ – объем инъекции (аликвота 30 мкл); l – объем исходной суспензии, мл. Для получения факторов (коэффициентов), отражающих зависимость площади под пиком хроматограммы от концентрации пигмента, использовали стандарты соответствующих пигментов.

Для проведения ВЭЖХ применялись следующие реагенты: ацетон марки «х. ч.» ($\geq 99,0\%$) (АО «Экос-1», Россия), ацетонитрил для ВЭЖХ ($\geq 99,9\%$) и этилацетат для ВЭЖХ ($\geq 99,7\%$) (Honeywell, Германия), триэтиламин ($\geq 99,5\%$) (AppliChem, Германия), стандарты фотосинтетических пигментов (Sigma-Aldrich, Германия).

Метод определения фотохимической активности фотосистем в клетках микроводоросли с помощью РАМ-флуориметрии. Фотосинтетическую активность фотосистем клеток водоросли определяли на 2-е сутки эксперимента. Параметры, характеризующие активность работы фотосистемы II (ФС II) и фотосистемы I (ФС I), рассчитывали с использованием метода индукции флуоресценции хлорофилла для нативной культуры *D. salina*, которую адаптировали к темноте в течение 15 мин.

Для определения показателей индукции флуоресценции хлорофилла использовали РАМ-флуориметр Dual-PAM-100 (Heinz Walz, Германия) с модулем регистрации флуоресценции ФС II и двухволновым (830 и 875 нм) модулем регистрации сигнала P700 (реакционного центра ФС I). Данный прибор позволяет возбуждать модулированным светом низкой интенсивности (0,048 мкмоль квантов на 1 м^2 в секунду, длина волны возбуждающего света 635 нм) фоновую флуоресценцию хлорофилла (F_0). При включении актиничного света с интенсивностью 150 мкмоль квантов на 1 м^2 в секунду интенсивность флуоресценции достигает максимального уровня (F_m), после чего за счет дезактивации по фотохимическому и диссипационному пути снижается. Применение вспышки насыщающего света (10 000 мкмоль квантов на 1 м^2 в секунду, 635 нм) на фоне действия актиничного света увеличивает интенсивность флуоресценции с уровня F до уровня F'_m . По полученным значениям показателей F_0 , F'_0 , F_m , F'_m и F рассчитывали величину вариабельной флуоресценции ($F_v = F_m - F_0$), потенциальный квантовый выход фотохимических реакций ФС II ($\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m}$), эффективный квантовый выход фотохимических реакций ФС II ($Y(\text{II}) = \frac{F_m - F}{F_m}$), а также величину фотохимического и нефотохимического тушения ($qP = \frac{F_m - F}{F_m - F_0}$, $qN = \frac{F_m - F'_m}{F_m - F_0}$, $\text{NPQ} = \frac{F_m}{F'_m - 1}$). Эффективность функционирования электрон-транспортной цепи, или скорость транспорта электронов, вычисляли по формуле

$$\text{ETR}(\text{II}) = Y(\text{II}) \cdot \text{PAR} \cdot c \cdot 0,5,$$

где PAR – интенсивность фотосинтетически активной радиации (в нашем случае 150 мкмоль квантов на 1 м^2 в секунду); c – часть поглощенного света (обычно 0,84, т. е. 84 %); 0,5 – часть фотосинтетически активной радиации, приходящейся на ФС II¹ [14; 15]. Кроме того, определяли показатели $Y(\text{I})$ и $\text{ETR}(\text{I})$, которые характеризуют состояние и активность ФС I и являются аналогичными таковым для ФС II². После световой адаптации клеток регистрировали световые кривые для показателей $\text{ETR}(\text{I})$ и $\text{ETR}(\text{II})$

¹Dual-PAM-100//WALZ Photosynthesis Instruments : website. URL: <http://www.walz.com/products/dual-pam-100/> (date of access: 28.08.2025).

²Ibid.

с применением вспышки насыщающего света (10 000 мкмоль квантов на 1 м^2 в секунду, 635 нм) на фоне действия актиничного света разной интенсивности (11; 18; 27; 58; 100; 131; 221; 344; 536 и 830 мкмоль квантов на 1 м^2 в секунду; 30 с при каждой интенсивности света).

Метод определения содержания белка D1 с помощью вестерн-блоттинга в клетках *D. salina*. Выделение белков из клеток *D. salina*, их электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинг выполняли так, как описано в работе [16]. Навеску осажденных при 17 000 g клеток водоросли массой 0,1 г растирали в ступке с жидким азотом до порошка, переносили в пробирку Эппендорфа и приливали 1 мл среды выделения, содержащей 56 ммоль/л дитиотреитола, 56 ммоль/л Na_2CO_3 , 12 % сахарозы, 2 ммоль/л этилендиаминтетраацетата, 2 % SDS-Na, и тщательно перемешивали 1 мин, используя вортекс Vortex-Genie-2 (*Scientific Industries*, США). После этого пробы инкубировали в течение 10 мин при температуре 80 °C в термошейкере TS-100 (*Biosan*, Латвия). Затем снова перемешивали и центрифугировали в течение 5 мин при 17 000 g на центрифуге Biofuge Pico (*Thermo Fisher Scientific Inc.*). В полученном экстракте определяли содержание белка по методу Брэдфорда [17] и при необходимости разбавляли пробы буфером для экстракции в целях выравнивания в них содержания белка.

Разделение белков осуществляли с помощью денатурирующего гель-электрофореза. В лунки вносили 15 мкл белкового экстракта с равным количеством белка. Электрофорез проводили на установке для вертикального гель-электрофореза Mini-Protean Tetra System (*Bio-Rad*, США), используя коммерческие препараты разделяющего и концентрирующего гелей в течение 1 ч при комнатной температуре и начальном напряжении 120 В (пока белки не вошли в разделяющий гель). Затем напряжение увеличивали до 180 В.

После разделения белков их переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C pure (*Cytiva*, Великобритания) с порами 0,45 мкм. Гель наносили на мембрану и помещали на поверхность Trans-Blot Turbo Transfer System (*Bio-Rad*) между семью слоями хроматографической бумаги размером $7,0 \times 8,5$ см, предварительно смочив их в анодном буфере, содержащем 25 ммоль/л Tris, 129 ммоль/л глицина и 20 % метанола. Перенос белков осуществляли в течение 7 мин (сила тока рассчитывалась автоматически). После окончания переноса нитроцеллюлозную мембрану окрашивали в течение 3 мин в растворе красителя пунцового красного для визуализации белкового профиля. Для иммунохимического окрашивания белков, иммобилизованных на нитроцеллюлозной мембране, использовали раствор TBS, содержащий 20 ммоль/л Tris-HCl (pH 7,5) и 150 ммоль/л NaCl, а также раствор TBST, в состав которого дополнительно входил 0,05 % Tween-20. Мембрану инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч в 50 мл TBST, содержащего 5 % сухого обезжиренного молока, перемешивая в шейкере Elpan-357 (*Elpan*, Польша). После блокировки мембрану инкубировали в течение 1 ч при постоянном перемешивании с поликлональными первичными антителами к белку D1 реакционного центра ФС II (*Agrisera*, Швеция), растворенными в TBS, содержащем 5 % сухого обезжиренного молока. Затем мембрану дважды промывали в течение 30 мин в TBST (без сухого молока), после чего инкубировали при постоянном перемешивании в течение 1 ч с кроличьими вторичными антителами (*Agrisera*), конъюгированными со щелочной фосфатазой. Мембрану снова промывали в течение 30 мин в TBST (без сухого молока), а затем инкубировали в течение 2 мин в щелочно-фосфатазном буфере, содержащем 100 ммоль/л Tris-HCl (pH 9,5), 100 ммоль/л NaCl и 5 ммоль/л MgCl_2 . Для визуализации белков мембрану инкубировали в темноте в 25 мл проявляющей смеси для щелочной фосфатазы, которая содержала 10 мг NBT, растворенного в 200 мкл дистиллированной воды, и 5 мг BCIP, растворенного в 400 мкл дистиллированной воды. После четкой визуализации полос мембрану тщательно промывали водой, подсушивали на воздухе. Количество белков рассчитывали в относительных единицах по площади и интенсивности окраски полос после их визуализации, используя программу *TotalLab* (версия 2.01).

Статистическая обработка экспериментальных данных. Для статистической обработки экспериментальных данных рассчитывали среднее значение и стандартную ошибку среднего. При определении достоверности различий полученных сведений между опытными образцами учитывались допустимый уровень значимости ($p \leq 0,05$) и заданное число степеней свободы. Представлены данные как минимум трех независимых экспериментов в двойной биологической повторности. В качестве средств статистической обработки экспериментальных данных были использованы программы *Excel 2019* (*Microsoft*) и *SigmaPlot* (версия 12.0) (*Systat Software Inc.*, США), а также статистические методы из области биологических исследований [18].

Результаты и их обсуждение

Оценка продуктивности *D. salina* при культивировании в условиях азотного голодания и разной интенсивности света. На первом этапе исследования проводили оценку влияния сочетанного действия дефицита азота и света высокой интенсивности на продуктивность *D. salina* непосредственно по измене-

нию количества клеток микроводоросли в суспензии после культивирования в течение 14 сут. На рис. 1 представлены данные опытов, проведенных в следующих условиях: в среде с нормальным содержанием азота при низкой интенсивности света (+N LI), в среде с дефицитом азота при низкой интенсивности света (-N LI), в среде с нормальным содержанием азота при высокой интенсивности света (+N HI), в среде с дефицитом азота при высокой интенсивности света (-N HI). В полной питательной среде количество клеток в течение 14 сут культивирования в среднем увеличилось в 2,5 (низкая интенсивность света) и 2,0 (высокая интенсивность света) раза по сравнению с исходным значением. В условиях азотного голодания количество клеток повысилось в среднем в 1,5 раза.

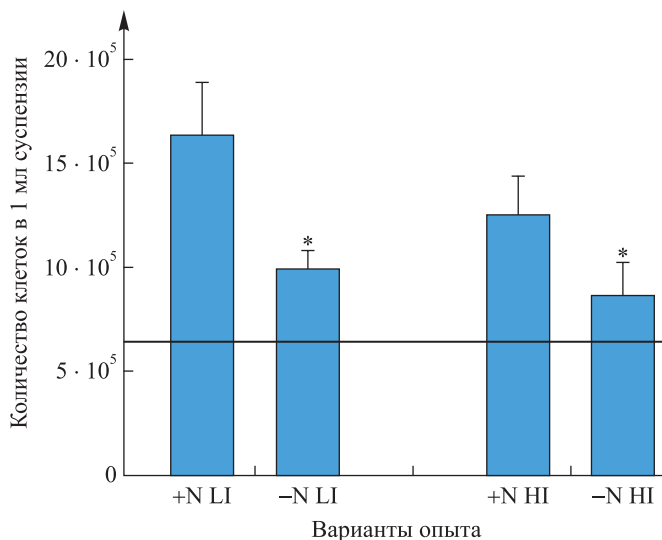


Рис. 1. Количество клеток *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в разных условиях (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI).

Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю (+N LI) ($p \leq 0,05$).

Референсной линией обозначено исходное количество клеток

Fig. 1. Number of *D. salina* cells grown for 14 days under different conditions (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI).

Sign * marked significant differences in relation to control (+N LI) ($p \leq 0.05$).

Reference line indicates the initial number of cells

Отметим, что еще до хроматографического разделения фотосинтетических пигментов наблюдались существенные различия в окраске суспензий микроводоросли для разных вариантов опыта. Так, если исходная культура и культура, инкубированная на свету низкой интенсивности, имели ярко-зеленый цвет, что указывает на нормальное соотношение в клетках хлорофиллов и каротиноидов, то при действии света высокой интенсивности и особенно сочетанном действии дефицита азота и света высокой интенсивности суспензия приобрела желтый цвет, что свидетельствует о повышенном накоплении каротиноидов (рис. 2).

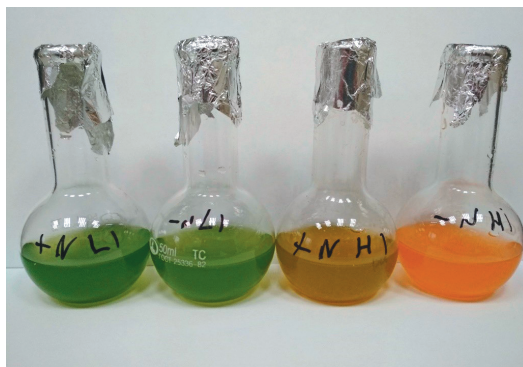


Рис. 2. Суспензии клеток *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в разных условиях (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI)

Fig. 2. Suspensions of *D. salina* cells grown for 14 days under different conditions (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI)

На рис. 3 представлены микрофотографии, которые демонстрируют изменение формы и окраски клеток *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в разных условиях. Наблюдается четкое влияние азотного голодания в сочетании с действием света высокой интенсивности на накопление каротиноидов непосредственно в клетках микроводоросли (рис. 3, з).

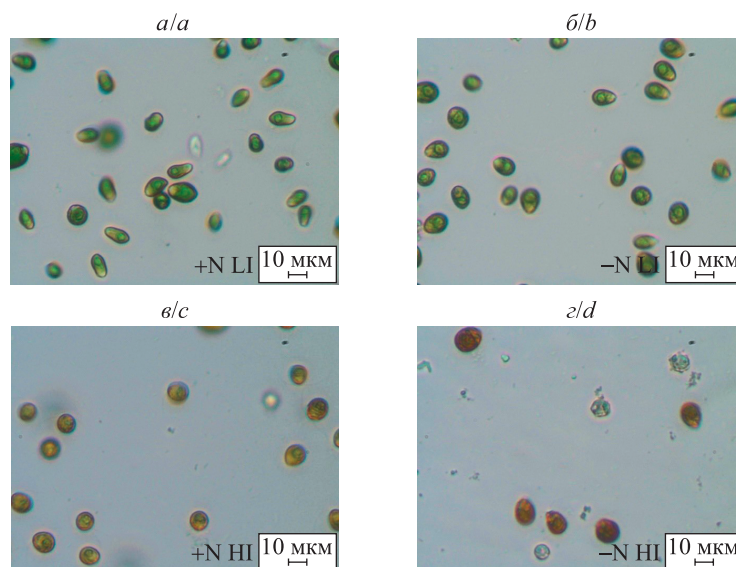


Рис. 3. Микрофотографии клеток *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в разных условиях (+N LI (а), -N LI (б), +N HI (в), -N HI (з)) (увеличение $\times 40$)
Fig. 3. Microphotographs of *D. salina* cells grown for 14 days under different conditions (+N LI (a), -N LI (b), +N HI (c), -N HI (d)) (magnification $\times 40$)

Влияние азотного голодания и света высокой интенсивности на накопление фотосинтетических пигментов в клетках *D. salina*. На втором этапе исследования проводили оценку качественного и количественного состава фотосинтетических пигментов в клетках *D. salina*. Были разделены и идентифицированы следующие пигменты: неоксантин, виолаксантин, лютеин, хлорофилл *b*, хлорофилл *a* и β -каротин. Хроматограмма ацетонового экстракта фотосинтетических пигментов из клеток *D. salina*, отраженная на рис. 4, содержит пики неоксантина (время удержания 2,06 мин), виолаксантина (2,36 мин), лютеина (3,08 мин), хлорофилла *b* (4,06 мин), хлорофилла *a* (4,39 мин) и β -каротина (5,31 мин).

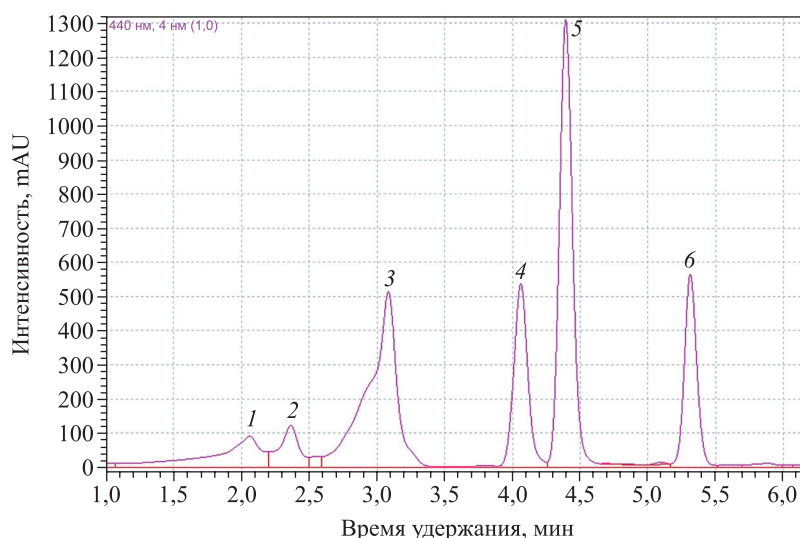


Рис. 4. Хроматограмма ацетонового экстракта фотосинтетических пигментов из клеток *D. salina*. Цифрами 1–6 обозначены пики неоксантина (1), виолаксантина (2), лютеина (3), хлорофилла *b* (4), хлорофилла *a* (5) и β -каротина (6)
Fig. 4. Chromatogramme of the acetone extract of photosynthetic pigments from *D. salina* cells. Numbers 1–6 indicate peaks of neoxanthin (1), violaxanthin (2), lutein (3), chlorophyll *b* (4), chlorophyll *a* (5) and β -carotene (6)

Для идентификации разделенных веществ использовали очищенные стандарты соответствующих соединений, а также спектры поглощения, зарегистрированные фотометрическим детектором [11]. На рис. 5 представлены данные проведенного методом ВЭЖХ анализа количества фотосинтетических пигментов в клетках *D. salina* при культивировании в разных условиях. Выявлено, что при выращивании клеток в среде с азотным голоданием, при свете высокой интенсивности, а также в условиях сочетанного действия этих факторов содержание β -каротина относительно контроля (+N LI) увеличивалось. Клетки, культивированные в дефицитной по азоту среде при свете высокой интенсивности, характеризовались максимальным количеством этого пигмента (превышает его количество в клетках контрольных образцов более чем в 6 раз). В клетках, сформировавшихся в данной среде, на фоне увеличения содержания β -каротина наблюдалось существенное уменьшение содержания хлорофилла и ксантофилловых каротиноидов (неоксантина, виолаксантина и лютеина) по сравнению с клетками контрольных образцов. Так, сочетанное действие азотного голодания и света высокой интенсивности снизило количество хлорофилла и неоксантина в среднем в 7 раз, виолаксантина в 5 раз, лютеина в 4 раза.

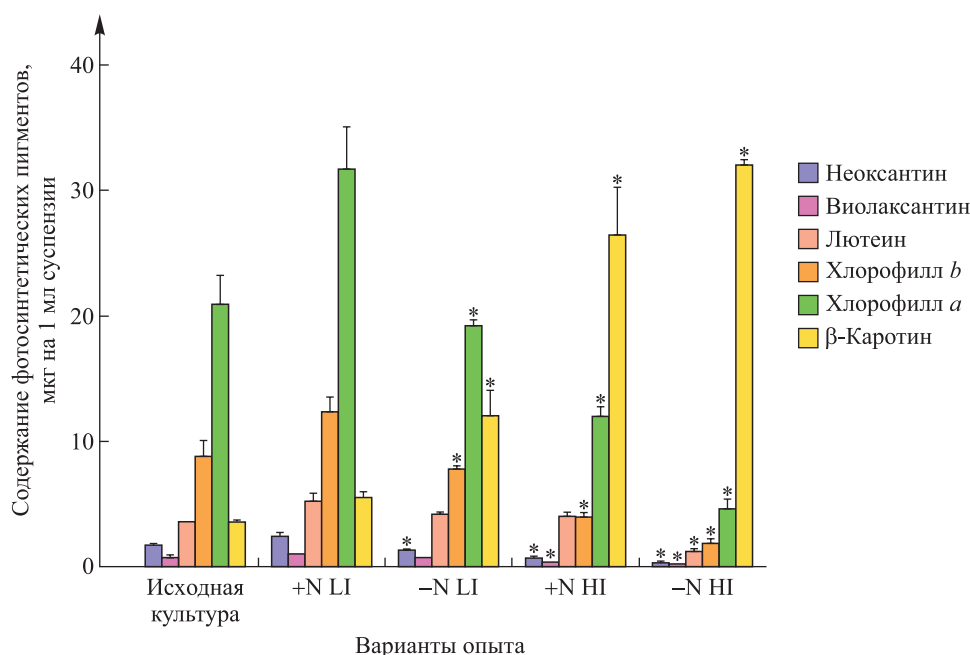


Рис. 5. Содержание фотосинтетических пигментов в клетках *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в разных условиях (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI). Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю (+N LI) ($p \leq 0,05$)

Fig. 5. Content of photosynthetic pigments in *D. salina* cells grown for 14 days under different conditions (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI). Sign * marked significant differences in relation to control (+N LI) ($p \leq 0.05$)

Влияние азотного голодания и света высокой интенсивности на фотохимическую активность фотосистем клеток *D. salina*. На третьем этапе работы проанализировали фотохимическую активность фотосистем клеток *D. salina* на начальной стадии стрессового воздействия, а именно через 2 сут после начала инкубации клеток в среде с дефицитом азота при действии света высокой интенсивности. На этой стадии стрессового воздействия еще отсутствуют детектируемые инструментальными методами изменения в пигментном составе клеток, однако уже наблюдаются отклонения от их контрольных флуоресцентных характеристик. РАМ-флуориметрия дает информацию об эффективности функционирования электрон-транспортной цепи в пределах ФС I и ФС II, а также о перераспределении энергии на фотохимические (фотосинтез) и нефотохимические процессы. Знание этих параметров работы системы фотосинтеза клеток *D. salina* позволит определить возможное участие фотосинтетического аппарата в регуляции накопления каротиноидов как адаптационного механизма.

При азотном голодании выявлено снижение показателей $\frac{F_v}{F_m}$, $Y(II)$ и $ETR(II)$ в пределах ФС II на 9; 9 и 10 % соответственно, при действии света высокой интенсивности – на 40; 51 и 52 % соответственно, при сочетанном действии стрессовых факторов – на 60; 67 и 67 % соответственно (табл. 2). Для всех вариантов опыта также было установлено снижение показателя qP в среднем на 15 %. В условиях дефицита азота и действия света высокой интенсивности достоверное снижение фотохимической активности ФС I (показатели $Y(I)$ и $ETR(I)$) не было обнаружено.

На рис. 6 представлены результаты анализа изменения хода световых кривых, отражающих зависимость эффективности функционирования электрон-транспортной цепи ФС II от интенсивности актиночного света. Зафиксировано существенное достоверное снижение показателя ETR(II) как при азотном голодании, так и при действии света высокой интенсивности. Различия значений показателя ETR(I), отражающего эффективность функционирования электрон-транспортной цепи ФС I, в условиях дефицита азота и света разной интенсивности были не такими явными (рис. 7). Более того, при использовании актиночного света с интенсивностью 344 мкмоль квантов на 1 м² в секунду показатель ETR(I) в клетках, выращенных при азотном голодании и свете высокой интенсивности, был выше, чем в клетках контрольных образцов, что указывает на отсутствие подавления активности ФС I при недостатке азота.

Таблица 2

Результаты РАМ-флуориметрии суспензии клеток *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в разных условиях (+N LI, –N LI, +N HI, –N HI)

Table 2

Results of RAM fluorimetry of suspension of *D. salina* cells grown for 14 days under different conditions (+N LI, –N LI, +N HI, –N HI)

Показатели	Варианты опыта			
	+N LI	–N LI	+N HI	–N HI
F_0	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,11 ± 0,02
F_m	0,52 ± 0,02	0,50 ± 0,02	0,26 ± 0,02*	0,15 ± 0,02*
$\frac{F_v}{F_m}$	0,63 ± 0,01	0,57 ± 0,02*	0,38 ± 0,03*	0,25 ± 0,02*
$Y(II)$	0,43 ± 0,01	0,35 ± 0,02*	0,21 ± 0,02*	0,14 ± 0,01*
ETR(II)	23,91 ± 0,45	19,02 ± 0,94*	11,36 ± 1,54*	7,83 ± 0,49*
NPQ	0,07 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,24 ± 0,16	0,03 ± 0,01
qN	0,09 ± 0,02	0,13 ± 0,04	0,16 ± 0,07	0,05 ± 0,02
qP	0,70 ± 0,01	0,63 ± 0,01*	0,54 ± 0,06*	0,62 ± 0,04*
$Y(I)$	0,62 ± 0,05	0,56 ± 0,05	0,50 ± 0,06	0,51 ± 0,06
ETR(I)	34,02 ± 2,49	31,0 ± 2,73	27,54 ± 3,11	27,90 ± 3,25

*Достоверные различия по отношению к контролю (+N LI) ($p \leq 0,05$).

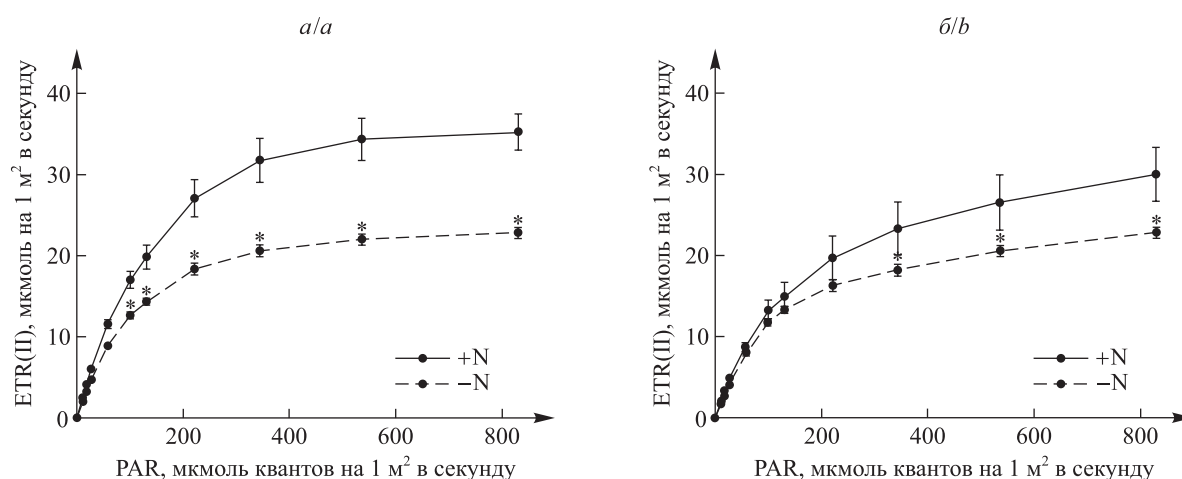


Рис. 6. Эффективность функционирования электрон-транспортной цепи ФС II в клетках *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в среде с нормальным содержанием азота и его дефицитом на свете низкой (а) и высокой (б) интенсивности. Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю (+N) ($p \leq 0,05$)

Fig. 6. Efficiency of the electron transport chain of photosystem II (PS II) in *D. salina* cells grown for 14 days in a medium with normal nitrogen content and nitrogen deficiency under low (a) and high (b) light intensity. Sign * marked significant differences in relation to control (+N) ($p \leq 0.05$)

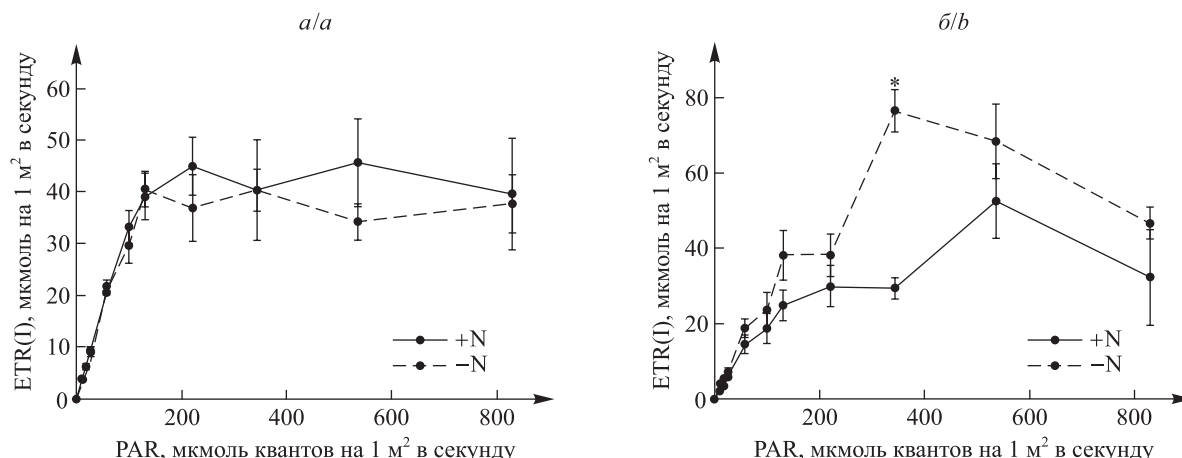


Рис. 7. Эффективность функционирования электрон-транспортной цепи ФС I в клетках *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в среде с нормальным содержанием азота и его дефицитом на свету низкой (а) и высокой (б) интенсивности. Знаком * отмечено достоверное различие по отношению к контролю (+N) ($p \leq 0,05$)

Fig. 7. Efficiency of the electron transport chain of photosystem I in *D. salina* cells grown for 14 days in a medium with normal nitrogen content and nitrogen deficiency under low (a) and high (b) light intensity. Sign * marked significant difference in relation to control (+N) ($p \leq 0.05$)

Влияние азотного голодания и света высокой интенсивности на накопление белка D1 реакционного центра ФС II в клетках *D. salina*. Вестерн-блоттинг позволил через 2 сут инкубации выявить уменьшение количества белка D1 реакционного центра ФС II в клетках, выращенных в условиях азотного голодания при низкой (уменьшение составило 27 %) и высокой (уменьшение составило 28 %) освещенности, по сравнению с количеством этого белка в клетках, культивированных в питательной среде с нормальным содержанием азота (рис. 8). Отметим, что хотя действие света высокой интенсивности во всех вариантах опыта приводило к достоверному снижению содержания белка D1 реакционного центра ФС II в клетках микроводоросли, однако влияние дефицита азота на его количество было более значительным. Результаты денситометрического анализа полученных изображений вестерн-блоттинга представлены на рис. 9.

Таким образом, установлено снижение количества белка D1 реакционного центра ФС II на фоне преимущественного подавления активности ФС II в клетках *D. salina*, культивированных в дефицитной по азоту среде, что может быть ключевым фактором запуска повышенного синтеза в клетках β -каротина как антиоксиданта, предотвращающего избыточное накопление в хлоропластах активных форм кислорода, в частности синглетного молекулярного кислорода [19]. Подавление фотохимической активности ФС II в условиях азотного голодания является следствием нарушения биосинтеза основных структурных белков фотосинтетического аппарата, в том числе белка D1 реакционного центра ФС II [20]. Максимальный выход β -каротина в условиях дефицита азота и света высокой интенсивности может быть обусловлен действием синглетного молекулярного кислорода, генерация которого увеличивается при повреждении компонентов или нарушении функционирования комплексов ФС II, особенно на свету высокой интенсивности [21; 22].

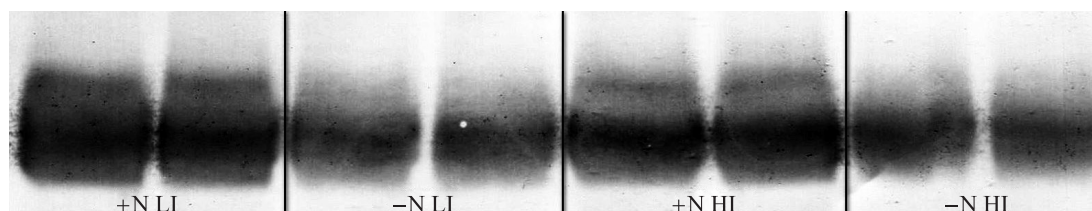


Рис. 8. Вестерн-блоттинг белка D1 реакционного центра ФС II в клетках *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в разных условиях (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI)

Fig. 8. Western blot analysis of D1 protein of the reaction centre PS II in *D. salina* cells grown for 14 days under different conditions (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI)

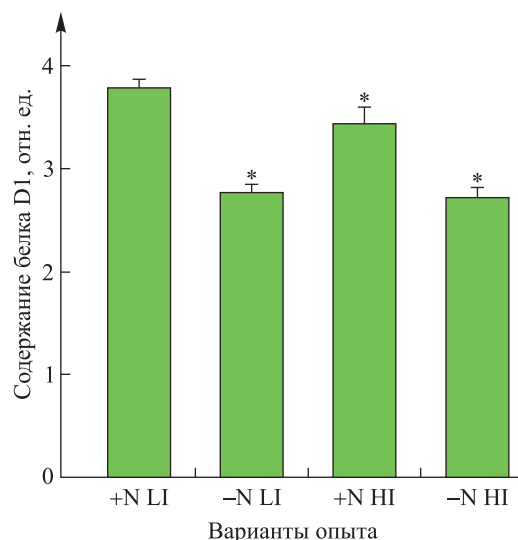


Рис. 9. Содержание белка D1 реакционного центра ФС II в клетках *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в разных условиях (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI). Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю (+N LI) ($p \leq 0,05$)

Fig. 9. Content of D1 protein of the reaction centre PS II in *D. salina* cells grown for 14 days under different conditions (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI). Sign * marked significant differences in relation to control (+N LI) ($p \leq 0.05$)

Закключение

Условия азотного голодания и действия света высокой интенсивности существенно влияют на пигментный состав клеток микроводоросли *D. salina* (штамм IBCE D-1) при ее культивировании. В частности, наблюдается снижение содержания хлорофиллов и неоксантина в 7 раз, виолаксантина в 5 раз, лютеина в 4 раза на фоне увеличения содержания β -каротина в клетках микроводоросли в 6 раз. Сочетанное действие дефицита азота и света высокой интенсивности является наиболее эффективным из исследованных в работе способов повышения продуцирования β -каротина клетками *D. salina*. Установлены снижение количества белка D1 реакционного центра ФС II и частичная инактивация активности ФС II в клетках микроводоросли, культивированных в условиях азотного голодания. Такое нарушение структурно-функционального состояния фотосинтетического аппарата клеток *D. salina* потенциально опасно развитием фотоокислительного стресса, оно приводит к активации биосинтеза каротиноидов и, как следствие, сверхпродуцированию β -каротина, являющегося специфическим тушителем синглетного молекулярного кислорода. Настоящее исследование дает представление о механизме регуляции синтеза β -каротина в клетках *D. salina*, а также показывает перспективность использования дефицитных по азоту сред при культивировании клеток данной микроводоросли в целях получения β -каротина в промышленных масштабах.

Библиографические ссылки

1. Raja R, Hemaiswarya S, Rengasamy R. Exploitation of *Dunaliella* for beta-carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007;74(3):517–523. DOI: 10.1007/s00253-006-0777-8.
2. Amini M, Amini Khoei Z, Erfanifar E. Nitrate (NO_3^-) and phosphate (PO_4^{3-}) removal from aqueous solutions by microalgae *Dunaliella salina*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019;19:5–8. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101097.
3. al-Muhteseb SI, Emeish S. Producing natural mixed carotenoids from *Dunaliella salina*. *Journal of Natural Sciences Research*. 2015;5(10):53–59.
4. Ben-Amotz A, Lers A, Avron M. Stereoisomers of β -carotene and phytoene in the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*. 1988;86(4):1286–1291.
5. Pisal DS, Lele SS. Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology*. 2005;4:476–483.
6. García-González M, Moreno J, Manzano JK, Florencio FJ, Guerrero MG. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-*cis*-beta-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*. 2005;115(1):81–90. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.07.010.
7. Ben-Amotz A, Shaish A, Avron M. The biotechnology of cultivating *Dunaliella* for production of β -carotene rich algae. *Biore-source Technology*. 1991;38:233–235. DOI: 10.1016/0960-8524(91)90160-L.
8. Божков А. Динамика функциональных эпигенотипов *Dunaliella viridis* Teodor. при накопительном и квазинепрерывном культивировании. *Альгология*. 2013;23(3):231–247.

9. Мельников СС, Мананкина ЕЕ, Будакова ЕА, Шалыго НВ, составители. *Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей*. Минск: Беларуская навука; 2011. 101 с.
10. Сиренко ЛА, Сакевич АИ, Осипов ЛФ, Лукина ЛФ, Кузьменко МИ, Козицкая ВН и др. *Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике*. Киев: Наукова думка; 1975. 248 с.
11. Каляга ТГ, Козел НВ. Влияние почвенной засухи на содержание фотосинтетических пигментов в растениях ячменя сорта Бровар. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;3:46–53. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-3-46-53.
12. Forni E, Ghezzi MN, Polesello A. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas. *Chromatographia*. 1988;26:120–124. DOI: 10.1007/BF02268135.
13. Milenković SV, Zvezdanović J, Anđelković T, Marković D. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Advanced Technologies*. 2012;1:16–24.
14. Govindjee G. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1995;22(2):131–160.
15. Корнеев ДЮ. *Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла*. Киев: Альтерпрес; 2002. 188 с.
16. Jansson S, Stefansson H, Nystrom U, Gustafsson P, Albertsson P-A. Antenna protein composition of PS I and PS II in thylakoid sub-domains. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1997;1320(3):297–309. EDN: AFSXIF.
17. 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;72:248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
18. Рокицкий Ф. *Биологическая статистика*. Минск: Вышэйшая школа; 1973. 320 с.
19. Красновский АА. Синглетный молекулярный кислород: механизмы образования и пути дезактивации в фотосинтетических системах. *Биофизика*. 1994;39(2):236–250.
20. Liu X, Yin C, Xiang L, Jiang W, Xu S, Mao Z. Transcription strategies related to photosynthesis and nitrogen metabolism of wheat in response to nitrogen deficiency. *BMC Plant Biology*. 2020;20(1):448. DOI: 10.1186/s12870-020-02662-3.
21. Dogra V, Kim C. Singlet oxygen metabolism: from genesis to signaling. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:1640. DOI: 10.3389/fpls.2019.01640.
22. Dmitrieva VA, Tyutereva EV, Voitsekhovskaja OV. Singlet oxygen in plants: generation, detection, and signaling roles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(9):3237. DOI: 10.3390/ijms21093237.

Получена 29.08.2025 / исправлена 22.09.2025 / принята 22.09.2025.
Received 29.08.2025 / revised 22.09.2025 / accepted 22.09.2025.

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК [616.155.33:577.175.14]:57.08

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СПОСОБОВ ДОСТАВКИ НУКЛЕАЗЫ Cas9 НА УРОВЕНЬ НОКАУТА В Т-ЛИМФОЦИТАХ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СИСТЕМЫ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR/Cas9 НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ Т-КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ Jurkat

Е. С. ПОКЛАДОК¹⁾, А. Н. МЕЛЕШКО¹⁾, М. С. КИСЕЛЬ²⁾

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

²⁾Институт биоорганической химии НАН Беларуси,
ул. Академика Купревича, 5, корп. 2, 220084, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Разработка аллогенных CAR-T-клеток представляет собой перспективное направление в иммунотерапии онкологических заболеваний, которое позволяет преодолеть ограничения, возникающие при использовании аутологичных Т-клеток. Одним из ключевых этапов создания таких клеток является эффективное введение в них компонентов системы геномного редактирования CRISPR/Cas9. В настоящей статье рассматриваются стратегии оптимизации параметров электропорации нуклеазы Cas9 (мРНК, белок, плазмидный вектор) для повышения эффективности редактирования генома. Оптимизированный протокол может способствовать стандартизации производства аллогенных CAR-T-продуктов, улучшая их терапевтическую эффективность и безопасность.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9; sgRNA; ген *TRAC*; ген *B2M*; нокаут; CAR.

Образец цитирования:

Покладок ЕС, Мелешко АН, Кисель МС. Исследование влияния способов доставки нуклеазы Cas9 на уровень нокаута в Т-лимфоцитах при использовании системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 на экспериментальной модели Т-клеточной линии Jurkat. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2025;3:38–47.
EDN: CDFFGG

For citation:

Pokladok KS, Meleshko AN, Kisel MS. Study of the impact of nuclease Cas9 delivery methods on knockout efficiency in T lymphocytes using the CRISPR/Cas9 genome editing system in the experimental T cell line model Jurkat. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2025;3:38–47. Russian.
EDN: CDFFGG

Сведения об авторах см. на с. 47.

Information about the authors see p. 47.

STUDY OF THE IMPACT OF NUCLEASE Cas9 DELIVERY METHODS ON KNOCKOUT EFFICIENCY IN T LYMPHOCYTES USING THE CRISPR/Cas9 GENOME EDITING SYSTEM IN THE EXPERIMENTAL T CELL LINE MODEL Jurkat

K. S. POKLADOK^a, A. N. MELESHKO^a, M. S. KISEL^b

^aRepublican Scientific and Practical Center for Children's Oncology, Hematology and Immunology,
43 Frunzienskaja Street, Barawliany 223053, Barawlianski sielsaviet, Minsk District, Belarus

^bInstitute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
5 Akademika Kuprevicha Street, 2 building, Minsk 220084, Belarus

Corresponding author: K. S. Pokladok (katena.pokladok@mail.ru)

Abstract. The development of allogeneic CAR-T cells represents a promising direction in cancer immunotherapy, overcoming the limitations of autologous approaches. One of the key steps in creating such cells is the efficient delivery of CRISPR/Cas9 genome editing components into them. This article explores strategies for optimising electroporation parameters for nuclease Cas9 (mRNA, plasmid vector, protein) to enhance genome editing efficiency. The optimised protocol may contribute to the standardisation of allogeneic CAR-T cell manufacturing, improving their therapeutic efficacy and safety.

Keywords: CRISPR/Cas9; sgRNA; gene *TRAC*; gene *B2M*; knockout; CAR.

Введение

Метод CAR-T-терапии онкологических заболеваний был разработан как терапия аутологичными Т-лимфоцитами, которые экспрессируют химерные антигенные рецепторы (*chimeric antigen receptor*, CAR), распознающие специфичные для опухолевых клеток мембранные антигены. Использование аутологичных клеток связано с рядом сложностей, таких как малое количество и сниженная функциональная активность Т-лимфоцитов у пациентов после химиотерапии. Аллогенные Т-клетки решают эти проблемы, но их прямое применение невозможно, во-первых, из-за развития реакции «трансплантат против хозяина» и, во-вторых, в связи с отторжением аллогенных Т-клеток иммунной системой реципиента [1].

В настоящем исследовании используем систему геномного редактирования CRISPR/Cas9 для нокаута генов субъединицы альфа Т-клеточного рецептора (*TRAC*) и бета-2-микроглобулина (*B2M*), одной из цепей MHC I, в целях их элиминации с поверхности мембраны. Система CRISPR/Cas9 состоит из ДНК-эндонуклеазы Cas9 и sgRNA (*single guide RNA* – одиночная гидовая РНК), искусственной молекулы, представляющей собой гибрид таких РНК-компонентов, как 20-нуклеотидная последовательность гид РНК, комплементарная редактируемому участку генома, и scRNA (*scaffold RNA* – каркасная РНК). Оба компонента, белок Cas9 и sgRNA могут быть доставлены в клетку разными способами: в виде рибонуклеопротеина, или двух генов, или белка Cas9 независимо от sgRNA [2–5]. В случае редактирования генома с использованием системы CRISPR/Cas9 эффективность процесса зависит не только от дизайна sgRNA [1], но и от формы доставки нуклеазы Cas9 (мРНК, белком Cas9 или плазмидным вектором).

Получение CAR-T-клеток требует стабильной генетической модификации (обычно путем ретровирусной трансдукции) для включения в геном экспрессионной кассеты CAR. Как правило, для редактирования генома с помощью системы CRISPR/Cas9 используют электропорацию мРНК белка Cas9, белком Cas9 и sgRNA. Такой способ обусловлен, во-первых, достаточной эффективностью доставки рибонуклеопротеиновых комплексов и, во-вторых, избеганием негативных эффектов конститутивной экспрессии белка Cas9, в частности *off-target*-эффекта редактирования.

Был разработан способ получения аллогенных CAR-T-клеток, при котором sgRNA доставляются в CAR-T-клетки в составе бицистронной конструкции лентивирусного вектора, который включает ген, кодирующий CAR, и двоянный ген двух sgRNA. Выбор оптимальных sgRNA и их промоторов был выполнен в исследовании [1]. Цель настоящей работы – оптимизация редактирования генов *TRAC* и *B2M* в лимфоцитах человека при получении CAR-T-продуктов путем выбора наилучшей формы доставки нуклеазы Cas9, а именно электропорации мРНК белка Cas9, белком Cas9 или плазмидной ДНК.

Материалы и методы исследования

Клеточные линии. В рамках данного исследования использовались модельные культуры Jurkat и НЕК293Т. Клетки линии НЕК293Т культивировали в полной среде DMEM (10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС)), клетки линии Jurkat – в полной среде RPMI 1640 (10 % ЭТС) с добавлением

гентамицина (10 мкг/мл). Клеточная культура Jurkat является модельной культурой Т-лимфобластного лейкоза с конститутивной экспрессией CD3, IL-2, Т-клеточного рецептора.

Первичные Т-лимфоциты получали из периферической крови донора. Кровь наслаивали на 0,5 объема градиента плотности 1,077 г/мл (гистопак), находившегося при комнатной температуре, и центрифугировали при 400 g при комнатной температуре в течение 30 мин. После центрифугирования мононуклеары крови локализовались в области кольца на границе раздела сыворотка – гистопак. Слой мононуклеаров крови переносили в стерильную пробирку, дважды отмывали в растворе DPBS (*Dulbecco's phosphate buffered saline* – фосфатно-солевой буфер Дульбекко) (центрифугировали при 250 g в течение 10 мин). Для изоляции Т-лимфоцитов использовали набор для иммуномагнитной селекции EasySep Human T-cell Isolation Kit (#17951; *Stemcell*, Канада). Культивирование проводили в полной среде RPMI с добавлением 10 % ЭТС, 100 МЕ/мл IL-2.

Используемые плазмиды и векторы. Для доставки белка Cas9 в составе плазмидного вектора использовали плазмиду lentiCas9-Blast (#52962; *Addgene*, США). Данный плазмидный вектор содержит в себе ген *Cas9* под эукариотическим промотором EF1a.

Получение вирусных частиц. За день до котрансфекции 3 млн клеток линии HEK293T засевали в чашку Петри (*Sarstedt Group*, Германия) для адгезивных культур, содержащую 10 мл полной ростовой среды DMEM, и инкубировали при температуре 37 °C во влажной атмосфере с 5 % CO₂ на протяжении суток. Котрансфекцию проводили с использованием линейного полиэтиленimina (ПЭИ) (25 кДа) в растворе с массовым соотношением ДНК : ПЭИ = 1 : 2. Трансфицирующая смесь включала 10,2 мкг трансферного вектора, 6 мкг плазмиды pCMV dR8.91, 3 мкг плазмиды pMD2.G и 38 мкг ПЭИ в 1,2 мл раствора DPBS. Котрансфекцию проводили в 11,0 мл бесывороточной среды DMEM в течение 6–16 ч с последующей сменой среды на полную. Через 48 ч собирали супернатант, фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0,45 мкм, концентрировали вирусные частицы центрифугированием при 3000 g в течение 16 ч при температуре 4 °C и хранили при температуре –80 °C.

Трансдукция. Полученный вирусный концентрат использовали для трансдукции клеточной культуры Jurkat. Трансдуцировали 50 тыс. клеток в присутствии 6 мкг/мл полибрена с множественностью инфекции MOI = 5 в условиях спинокуляции при 600 g в течение 90 мин. На следующие сутки сменили среду на полную среду RPMI 1640.

Селекция. Экспрессионная кассета, доставляемая в клеточную культуру Jurkat, имела в своем составе маркерный ген *EGFP*, а также ген устойчивости к пуромицину. После оценки уровня трансдукции в среду добавляли 1 мкг/мл пуромицина для получения культуры с высоким содержанием модифицированных Т-лимфоцитов.

Синтез мРНК белка Cas9. Синтез мРНК белка Cas9 производили набором HiScribe T7 ARCA mRNA Kit (with tailing) (#E2060S; *New England Biolabs*, США). Матрицей для гена *Cas9* служила плаزمида pET-20b(+)*Cas9*. Данный вектор получили путем молекулярного клонирования гена *Cas9* по сайтам рестрикции BamHI и NcoI в плазмидный вектор pET-20b(+) (#69739-3; *Addgene*). В полученном векторе ген *Cas9* находится под промотором T7.

Электропорация. Доставку нуклеазы Cas9 осуществляли посредством электропорации мРНК белка Cas9, синтетическим белком Cas9 (Институт биоорганической химии НАН Беларуси) и плазмидной ДНК (lentiCas9-Blast) на приборе Neon Transfection System (*Thermo Fisher Scientific*, США). Используемый режим электропорации – 1600 В, 10 мс, 3 удара. Электропорировали пробы по 100 тыс. клеток в объеме 10 мкл буфера R, после электропорации их сразу же рассаживали в лунки с 200 мкл среды RPMI (10 % ЭТС) без добавления антибиотика. Через 72 ч определяли количество клеток в каждой лунке и рассчитывали их жизнеспособность.

Проточная цитометрия. Уровень нокаута генов *TRAC* и *B2M* определяли на приборе DxFLEX (*Beckman Coulter*, США) с использованием антител anti-CD3-ECD (*BD Biosciences*, США) и anti-B2M-PE/Cy5.5 (*Abcam*, Великобритания). Уровень жизнеспособности выявляли с помощью флуоресцентного красителя DAPI.

Результаты и их обсуждение

Для доставки системы CRISPR/Cas9 использовалась следующая стратегия. Две последовательности sgRNA для генов *TRAC* и *B2M* были клонированы в один лентивирусный вектор с геном, кодирующим CAR, для одновременной доставки sgRNA и CAR в клетки Т-лимфоцитов путем трансдукции. Нуклеаза Cas9 доставлялась отдельно методом электропорации одним из трех вариантов: в виде мРНК, белка и плазмиды с геном *Cas9* (рис. 1).

Трансферный вектор был собран на основе лентивирусного вектора lentiCRISPR, содержащего ген устойчивости к пуромицину на 5'-конце экспрессионной кассеты. В вектор lentiCRISPR v2 (#52961; *Addgene*) по сайтам рестрикции EcoRI и KpnI были клонированы sgRNA к генам *TRAC* и *B2M* [1] под

промоторами hU6 и mU6 соответственно [2]. По сайтам рестрикции BshTI и BamHI из исходного вектора (lentiCRISPR v2) удалили ген *Cas9* и на его месте клонировали кассету, состоящую из маркерного гена *EGFP* и химерного антигенного рецептора anti-CD19 (anti-CD19-CAR) (рис. 2).

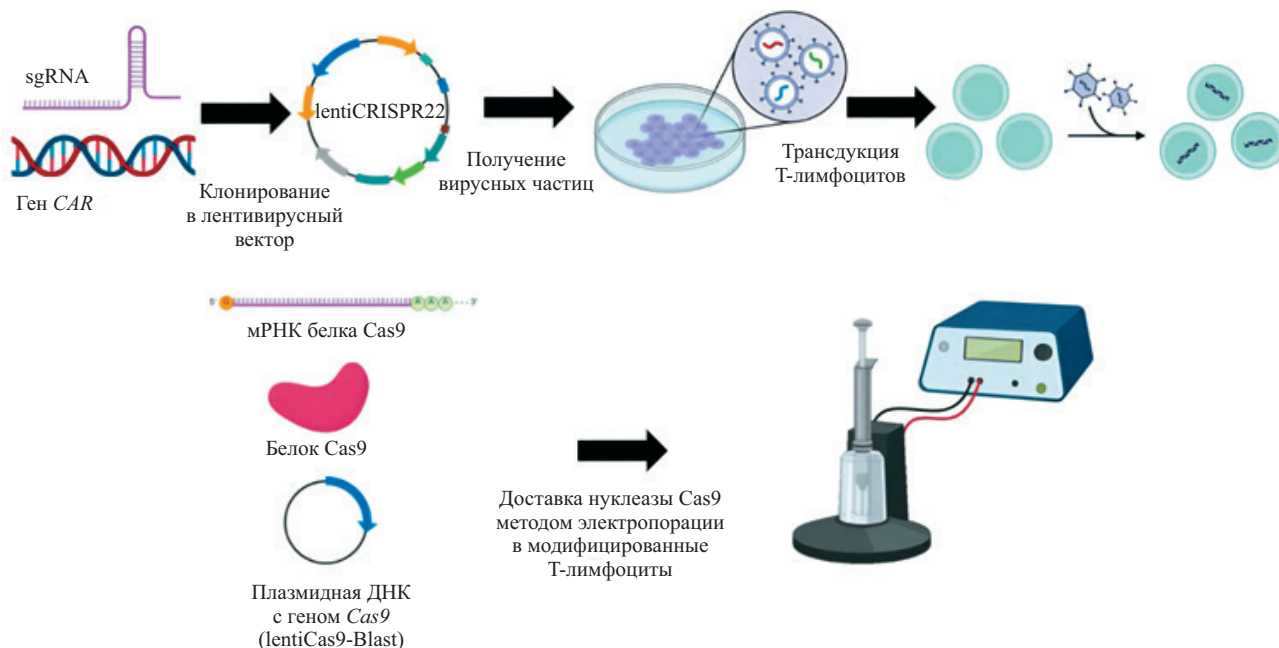


Рис. 1. Схема этапов доставки компонентов системы CRISPR/Cas9 и CAR в клеточную культуру Т-лимфоцитов

Fig. 1. Schematic representation of the delivery stages of the CRISPR/Cas9 system components and CAR into T lymphocyte cell culture

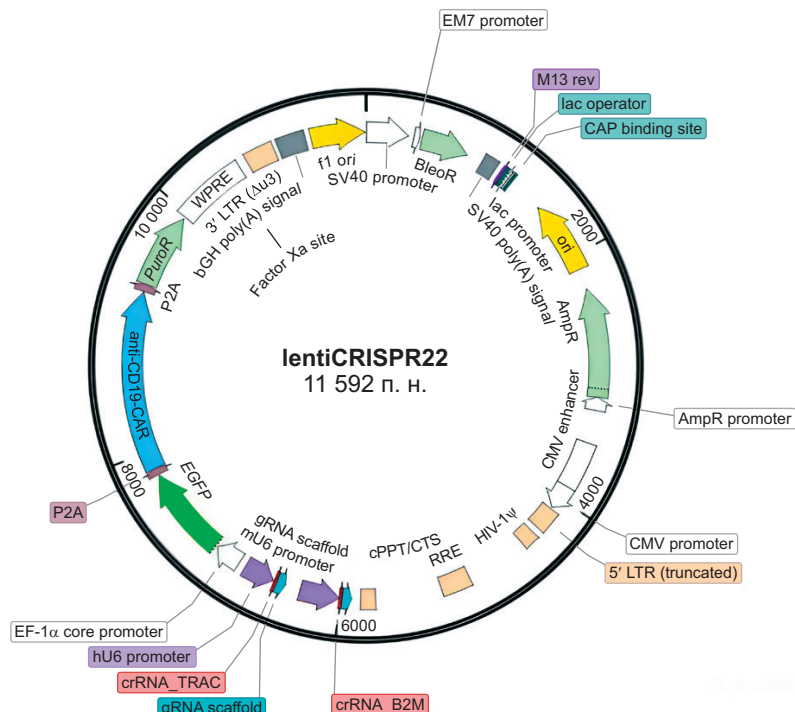


Рис. 2. lentiCRISPR22 – сконструированный вектор, содержащий экспрессионную кассету mhU6_PM – sgRNA – EGFP – anti-CD19-CAR – PuroR (ген устойчивости к пурамицину)

Fig. 2. lentiCRISPR22 is an designed vector containing the mhU6_PM – sgRNA – EGFP – anti-CD19-CAR – PuroR (puromycin resistance gene) expression cassette

Была проведена трансдукция Т-клеточной линии Jurkat лентивирусным вектором, содержащим экспрессионную кассету с CAR и sgRNA, как описано выше. Уровень трансдукции оценивался по флуоресценции репортерного гена *GFP*. Первоначальный уровень трансдукции составлял 75 %. Позже культура была обогащена трансдуцированными клетками путем селекции по гену устойчивости к пуромицину, после чего количество модифицированных клеток достигло 92 % (рис. 3).

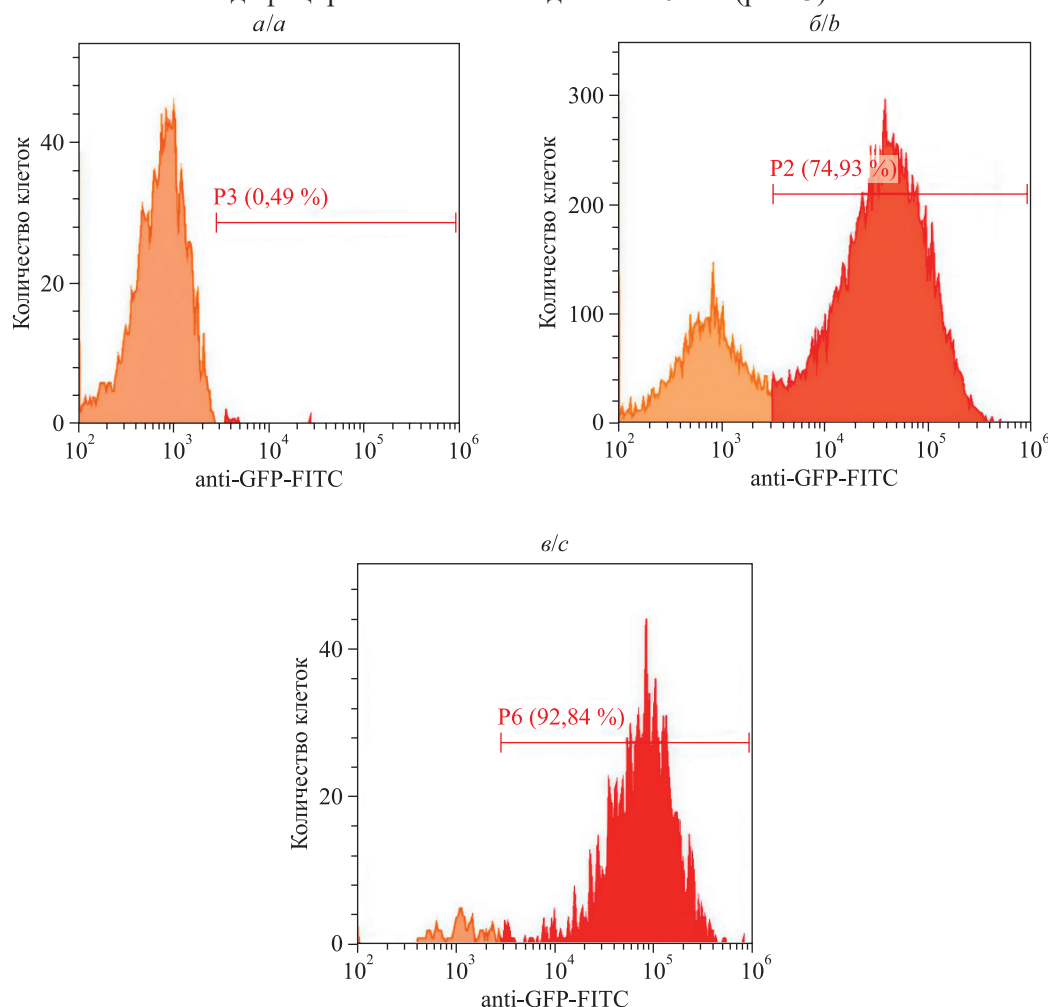


Рис. 3. Оценка эффективности трансдукции клеточной культуры Jurkat с последующей селекцией:
 а – состав клеточной культуры Jurkat, не проходившей процедуру трансдукции;
 б – состав клеточной культуры Jurkat на 3-и сутки после трансдукции (количество модифицированных клеток достигло 74 %);
 в – состав трансдуцированной клеточной культуры Jurkat на 2-е сутки после селекции (количество модифицированных клеток достигло 92 %).
 Окрашивание антителом anti-GFP-FITC

Fig. 3. Evaluation of transduction efficiency in Jurkat cell culture followed by selection:
 а – composition of Jurkat cell culture that did not undergo the transduction procedure;
 б – composition of Jurkat cell culture on the 3rd day after transduction (the number of modified cells reached 74 %);
 в – composition of Jurkat cell culture on the 2nd day after selection (the number of modified cells reached 92 %).

Antibody anti-GFP-FITC staining

После селекции была получена культура Т-лимфоцитов, содержащая 92 % клеток GFP+. Модифицированные клетки имели sgRNA к генам *TRAC* и *B2M*, а также CAR. Для активации системы редактирования CRISPR/Cas9 мы доставляли в клетки нуклеазу Cas9 методом электропорации мПНК, белком и плазмидой, кодирующей белок Cas9 (рис. 4). Режим электропорации подбирался нами ранее эмпирическим путем с целью сохранения баланса между жизнеспособностью клеточной культуры (более 85 % живых клеток) и уровнем доставки.

Оценку нокаута генов *TRAC* и *B2M* проводили методом проточной цитометрии по потере экспрессии CD3 (для гена *TRAC*) и B2M на 3-и, 7-е и 11-е сутки (рис. 5–7) для региона клеток GFP+. В качестве контроля использовали трансдуцированные клетки без электропорации.

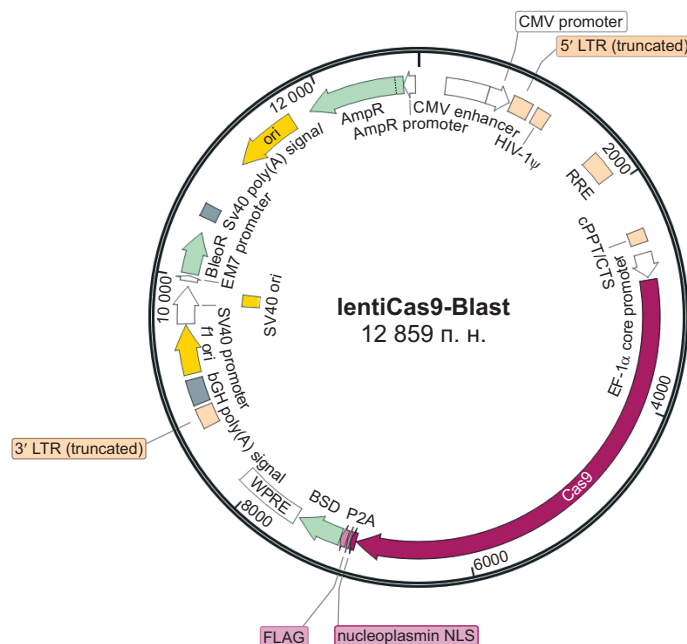


Рис. 4. lentiCas9-Blast – доставляемая электропорацией плазмиды, которая содержит ген *Cas9* под эукариотическим промотором EF-1α

Fig. 4. lentiCas9-Blast is the plasmid delivered by electroporation, containing the gene *Cas9* under the eukaryotic EF-1α promoter

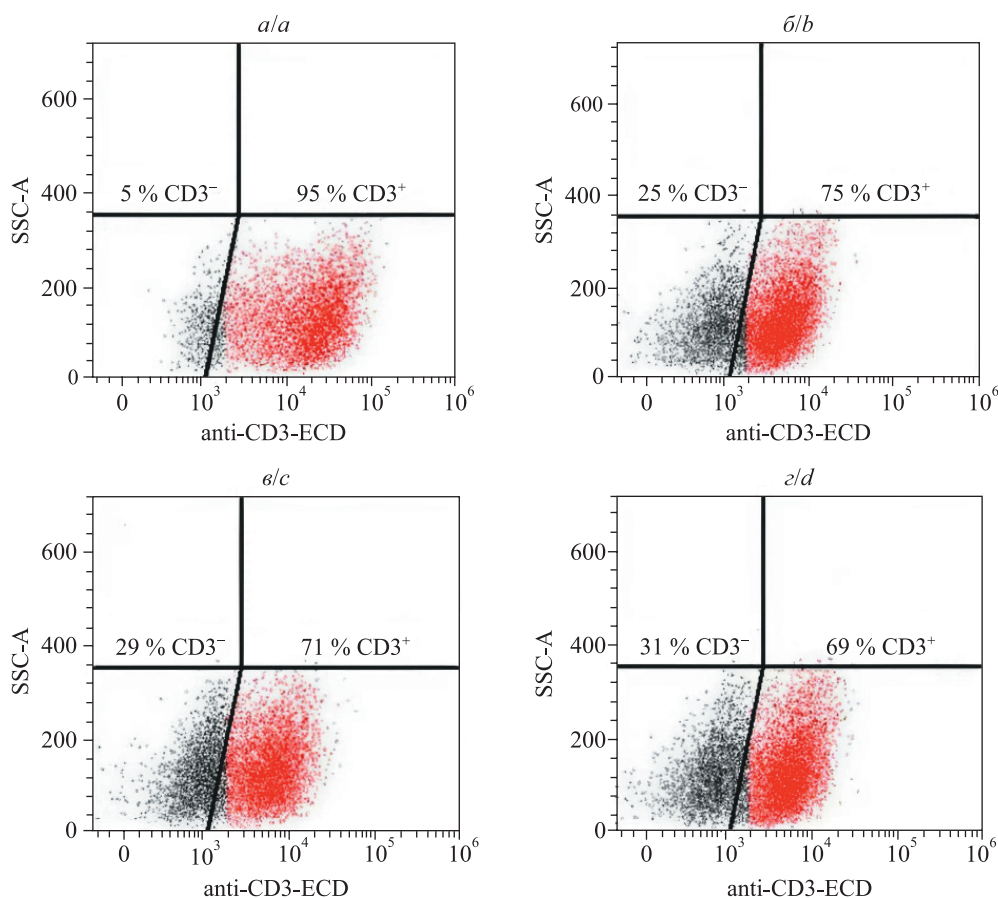


Рис. 5. Нокаут гена *TRAC* для клеточной культуры Jurkat на 11-е сутки после электропорации: а – контроль; б – электропорация мРНК белка *Cas9*; в – электропорация белком *Cas9*; г – электропорация плазмидным вектором *Cas9*. Окрашивание антителом anti-CD3-ECD

Fig. 5. Knockout of the gene *TRAC* in Jurkat cell culture on the 11th day after electroporation: а – control; б – electroporation with protein *Cas9* mRNA; в – electroporation with protein *Cas9*; г – electroporation with plasmid vector *Cas9*. Antibody anti-CD3-ECD staining

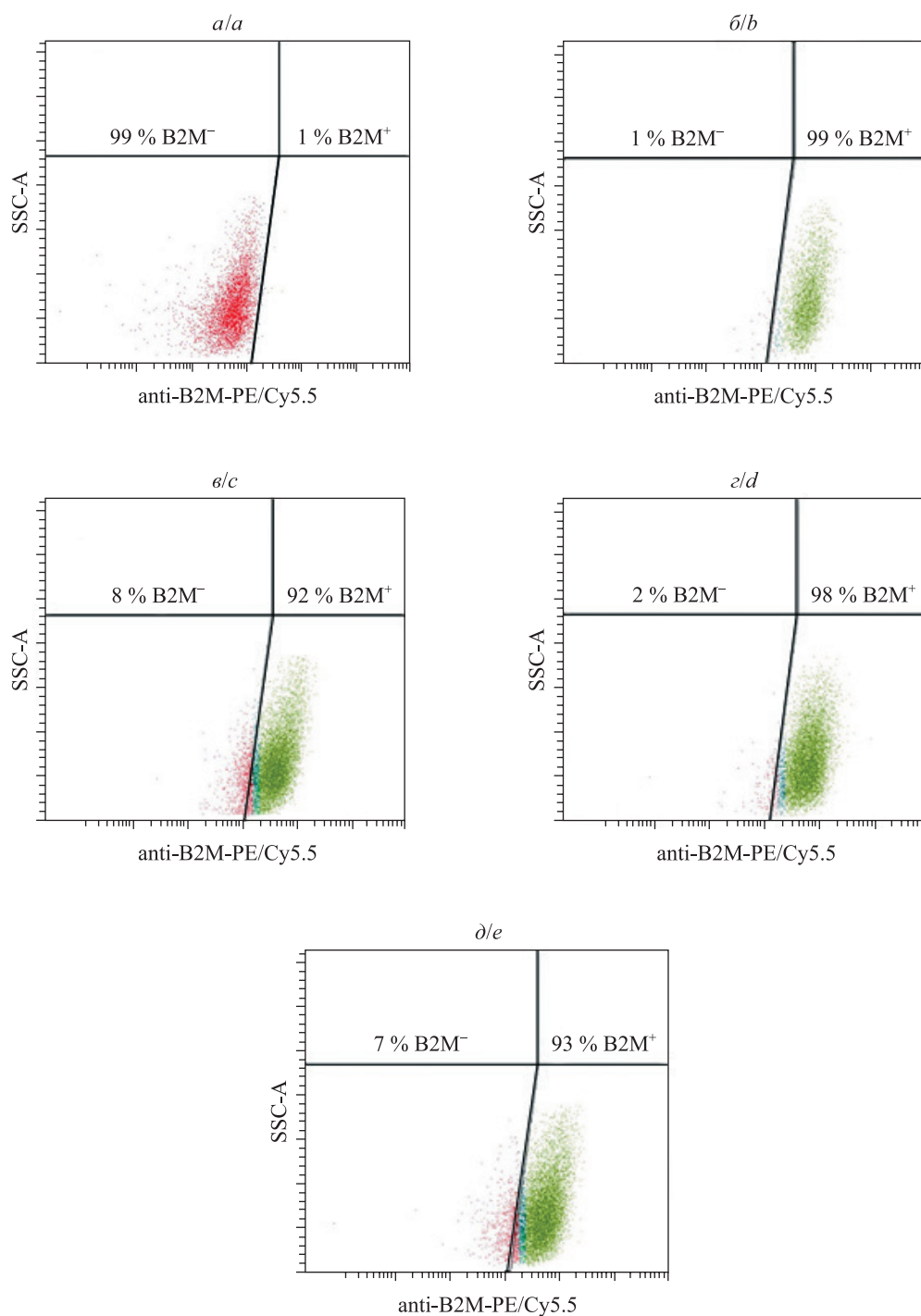


Рис. 6. Нокаут гена *B2M* для клеточной культуры Jurkat на 11-е сутки после электропорации:
a – не окрашенный антителом контроль; *б* – окрашенный антителом контроль;
в – электропорация мРНК белка Cas9; *г* – электропорация белком Cas9;
д – электропорация плазмидным вектором Cas9.
 Окрашивание антителом anti-B2M-PE/Cy5.5

Fig. 6. Knockout of the gene *B2M* in Jurkat cell culture on the 11th day after electroporation:
a – unstained antibody control; *b* – stained antibody control;
c – electroporation with protein Cas9 mRNA; *d* – electroporation with protein Cas9;
e – electroporation with plasmid vector Cas9.
 Antibody anti-B2M-PE/Cy5.5 staining

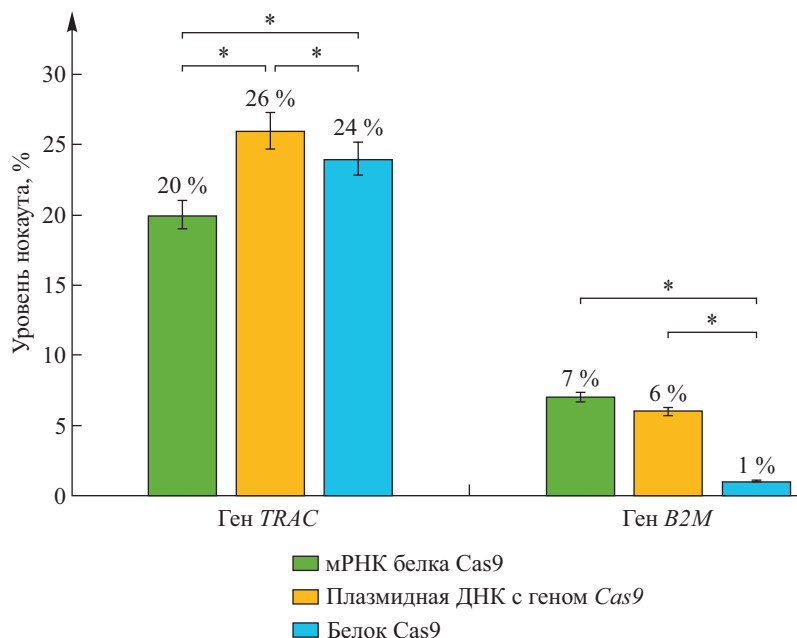


Рис. 7. Зависимость эффективности нокаута генов *TRAC* и *B2M* от способа доставки нуклеазы Cas9 в клеточную культуру Jurkat. Знаком * отмечены достоверные различия ($p < 0,05$).

Статистическая обработка данных производилась с использованием *U*-критерия Манна – Уитни

Fig. 7. Knockout efficiency dependence of the genes *TRAC* and *B2M* on the nuclease Cas9 delivery method to Jurkat cell culture.

Sign * marked significant differences ($p < 0.05$).

Data were analysed using the Mann – Whitney *U*-test

По мере увеличения времени культивирования полученных клеточных культур наблюдался прирост популяции, негативной по TCR и МНСI. Данный факт свидетельствует о сохранении их пролиферативной активности после всех проведенных процедур модификации.

Как видно из экспериментальных данных (см. рис. 7), нокаут гена *TRAC* достоверно выше при электропорации плазмидной ДНК с геном *Cas9* ($26 \pm x \%$), чем мРНК ($20 \pm xx \%$, $p = 0,02$) и белком *Cas9* ($24 \pm xx \%$, $p = 0,04$). Для нокаута гена *B2M* не было выявлено существенных различий в использовании мРНК и плазмиды с геном *Cas9*, однако применение белка *Cas9* характеризовалось наименьшим выходом целевых клеток (около 1 %). Нокаут гена *B2M* при доставке мРНК и плазмиды с геном *Cas9* (7 %, $p = 0,03$) был достоверно более эффективным, чем при использовании белка (1 %, $p = 0,03$). Нокаут гена *B2M* более низкий, чем нокаут гена *TRAC*, что было замечено в других исследованиях [4]. Предполагаемая причина – более сложная эпигенетическая упаковка гена *B2M*. Также влияние на общую жизнеспособность первичных Т-клеток может оказывать отсутствие МНСI. Рост популяции МНСI-негативных клеток при культивировании (3-и, 7-е и 11-е сутки) может объясняться адаптацией и выходом из состояния стресса, вызванного электропорацией. Нокаут гена *TRAC* более критичен, чем нокаут гена *B2M*, поскольку он определяет риск развития реакции «трансплантат против хозяина», тогда как сохранение белка B2M на части клеток приведет к снижению персистенции CAR-T-клеток, но не к появлению осложнений.

Редактирование генома с доставкой нуклеазы *Cas9* в виде плазмидной ДНК не является распространенным подходом. Выгода от применения этого способа состоит в значительно более низкой стоимости получения плазмидной ДНК по сравнению со стоимостью синтеза мРНК или белка. Однако согласно некоторым данным применение метода электропорации плазмидной ДНК не эффективно в отношении первичных Т-лимфоцитов человека в связи с сильным падением общей жизнеспособности клеток [6]. Мы получили аналогичные результаты (рис. 8).

Уровень редактирования около 25 % Т-клеток кажется невысоким. Преимущество лентивирусной доставки sgRNA при трансдукции вместе с CAR состоит в том, что нокаут выбранных генов будет происходить только в CAR-T-клетках, не затрагивая остальные клетки, а уровень трансдукции в условиях клинического производства CAR-T-клеток составляет 20–50 %. Таким образом, иммуномагнитной деплеции TCR-положительных клеток будет достаточно для приемлемого выхода отредактированных CAR-T-клеток.

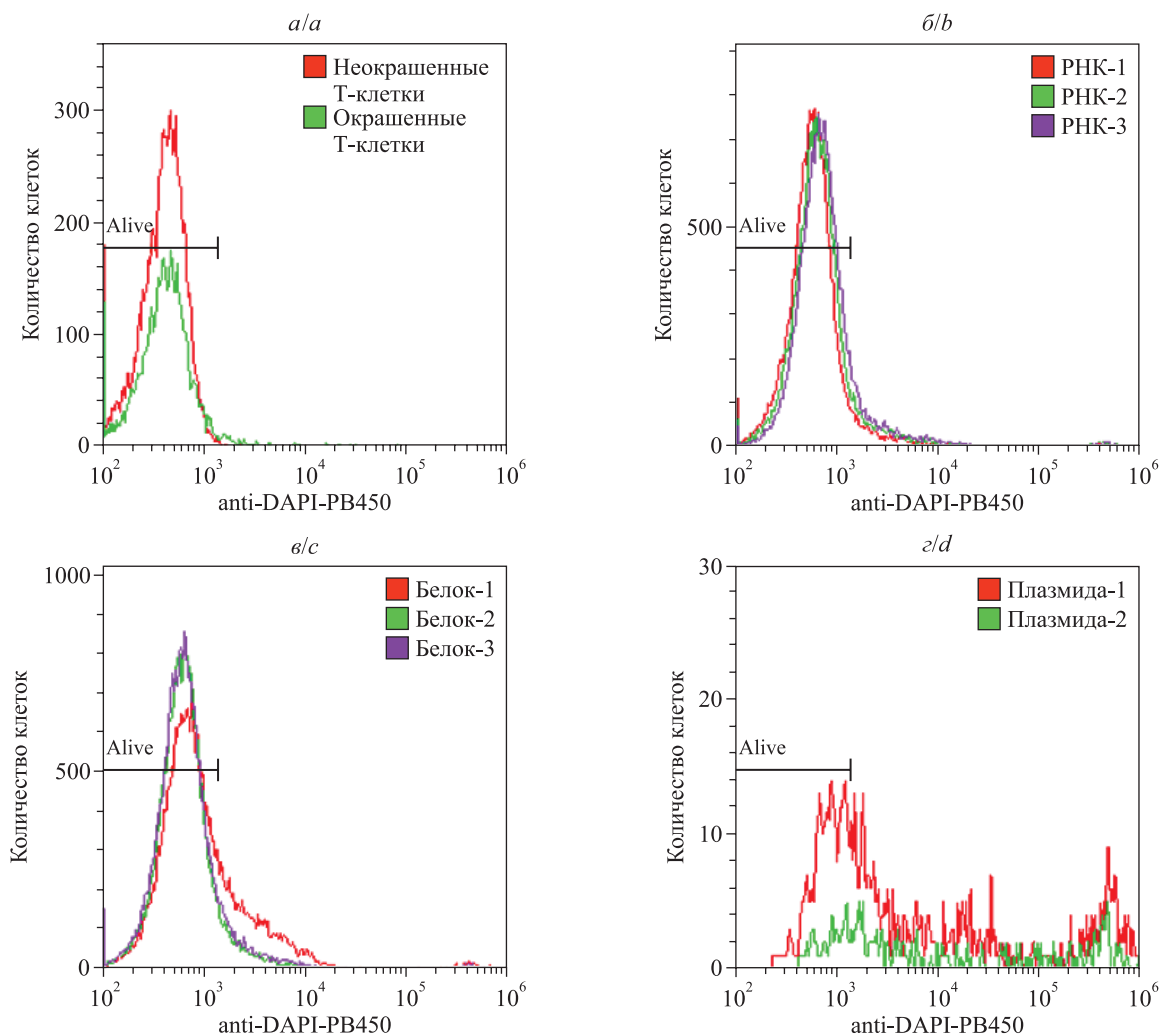


Рис. 8. Экспериментальные данные по влиянию способа доставки нуклеазы Cas9 методом электропорации на жизнеспособность первичных Т-лимфоцитов: *a* – контрольные трансдуцированные образцы, не проходившие электропорацию (средняя жизнеспособность составила 91 %); *б* – трансдуцированные и электропорированные мРНК Т-клетки (средняя жизнеспособность составила 84 %); *в* – трансдуцированные и электропорированные белком Т-клетки (средняя жизнеспособность составила 76 %); *г* – трансдуцированные и электропорированные плазмидным вектором Т-клетки (средняя жизнеспособность составила 27 %).
Окрашивание антителом anti-DAPI-PB450

Fig. 8. Experimental data on the impact of nuclease Cas9 delivery method by electroporation on the viability of primary T lymphocytes: *a* – control transduced samples not subjected to electroporation (average viability was 91 %); *b* – transduced and electroporated mRNA T cells (average viability was 84 %); *c* – transduced and electroporated protein T cells (average viability was 76 %); *d* – transduced and electroporated plasmid vector T cells (average viability was 27 %).
Antibody anti-DAPI-PB450 staining

Закключение

На экспериментальной модели Т-клеточной линии Jurkat мы отработали способ редактирования генов *TRAC* и *B2M*, сопряженный с введением гена, кодирующего CAR. С этой целью лучшие кандидаты sgRNA были включены в бицистронный лентивирусный вектор под промоторами U6, а нуклеаза Cas9 доставлялась в клетки методом электропорации мРНК, белком и плазмидной ДНК. Сравнительный анализ показал, что наилучшим способом редактирования оказалась доставка плазмидной ДНК с геном *Cas9*. Эффективность редактирования гена *B2M* достоверно ниже нокаута гена *TRAC*. При проведении эксперимента на первичных лимфоцитах в аналогичных условиях было подтверждено негативное влияние плазмидной ДНК на общую жизнеспособность культуры после электропорации. Метод нуждается в совершенствовании, направленном на увеличение выхода целевых клеток (негативных по экспрессии B2M и MHC I и экспрессирующих CAR) для получения аллогенных CAR-T-продуктов, однако он является пригодным для применения в экспериментальных целях.

Библиографические ссылки

1. Кушнерова ЕВ, Мигас АА, Клыч АВ, Ласюков ЕА, Мелешко АН. Нокаут генов Т-клеточного рецептора и HLA класса I в клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;2:19–26. DOI: 10.33581/2957-5060-2022-2-19-26.
2. Покладок ЕС, Мелешко АН, Кушнерова ЕВ. Оценка эффективности нокаута Т-клеточного рецептора и МНСI в клетках Т-лимфоцитов с использованием различных экспрессионных кассет. В: Мартинович Г, Волотовский ИД, Лукьяненко ЛМ, Слобожанина ЕИ, Кабашникова ЛФ, Вересов ВГ и др., редакторы. *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Тезисы докладов 16-й Международной научной конференции; 25–27 июня 2024 г.; Минск, Беларусь*. Минск: БГУ; 2024. с. 263–264.
3. Kagoya Y, Guo T, Yeung B, Saso K, Anczurowski M, Wang C-H, et al. Genetic ablation of HLA class I, class II, and the T cell receptor enables allogeneic T cells to be used for adoptive T cell therapy. *Cancer Immunology Research*. 2020;8(7):926–936. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0508.
4. Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(9):2255–2266. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1300.
5. Stenger D, Stief TA, Kaeuferle T, Willier S, Rataj F, Schober K, et al. Endogenous TCR promotes *in vivo* persistence of CD19-CAR-T cells compared to a CRISPR/Cas9-mediated TCR knockout CAR. *Blood*. 2020;136(12):1407–1418. DOI: 10.1182/blood.2020005185.
6. Nakazawa Y, Huye LE, Dotti G, Foster AE, Vera JF, Manuri PR, et al. Optimization of the *PiggyBac* transposon system for the sustained genetic modification of human T lymphocytes. *Journal of Immunotherapy*. 2009;32(8):826–836. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181ad762b.

Получена 03.07.2025 / исправлена 25.08.2025 / принята 25.08.2025.
Received 03.07.2025 / revised 25.08.2025 / accepted 25.08.2025.

Авторы:

Екатерина Сергеевна Покладок – младший научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий.
Александр Николаевич Мелешко – ведущий научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий.
Мария Сергеевна Кисель – научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологий.

Authors:

Kathrine S. Pokladok, junior researcher at the laboratory of genetic biotechnologies.
katena.pokladok@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0009-1444-4714>
Alexander N. Meleshko, leading researcher at the laboratory of genetic biotechnologies.
meleshko@tut.by
<https://orcid.org/0000-0001-6964-3635>
Maryia S. Kisel, researcher at the laboratory of molecular diagnostics and biotechnology.
marusen.kee@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-3432-0064>

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *slyA* У ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *ERWINIA AMYLOVORA*

К. Ю. ПЕСОЦКАЯ¹⁾, Д. В. СОРОКИН¹⁾, А. Л. ЛАГОНЕНКО²⁾, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ¹⁾

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

²⁾Альгимед Техно, Логойский тракт, 22/1, 220090, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Исследовано влияние соединений различной химической природы на активность промотора транскрипционного регулятора SlyA. В результате установлено, что перекись водорода и полимиксин В индуцируют экспрессию гена *slyA*. Также отмечено, что под действием белка SlyA активируется транскрипция генов *slyA*, *yhcN* и *ohrA*. Сделан вывод о том, что протестированные растительные фенольные соединения (салициловая, хлорогеновая, ванилиновая, кофейная, коричневая, парагидроксibenзойная и феруловая кислоты) в физиологических концентрациях не регулируют экспрессию гена *slyA*.

Ключевые слова: *Erwinia amylovora*; регулятор SlyA; растительные фенольные соединения; полимиксин В; перекись водорода; экспрессия генов.

THE REGULATION OF *slyA* GENE EXPRESSION IN PHYTOPATHOGENIC BACTERIA *ERWINIA AMYLOVORA*

K. Yu. PESOTSKAYA^a, D. V. SOROKIN^a, A. L. LAGONENKO^b, A. N. EVTUSHENKOV^a

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

^bAlgimed Techno, 22/1 Lagojski Tract, Minsk 220090, Belarus

Corresponding author: K. Yu. Pesotskaya (karina345678@mail.ru)

Abstract. The work investigated the effect of compounds of different chemical nature on the activity of the promoter of the transcriptional regulator SlyA. As a result, it was found that hydrogen peroxide and polymyxin B induce *slyA* gene expression. It was also noted that the SlyA protein activates the transcription of the *slyA*, *yhcN*

Образец цитирования:

Песоцкая КЮ, Сорокин ДВ, Лагоненко АЛ, Евтушенков АН. Регуляция экспрессии гена *slyA* у фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora*. Экспериментальная биология и биотехнология. 2025;3:48–61.
EDN: AACPJN

For citation:

Pesotskaya KYu, Sorokin DV, Lagonenko AL, Evtushenkov AN. The regulation of *slyA* gene expression in phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora*. Experimental Biology and Biotechnology. 2025;3:48–61. Russian.
EDN: AACPJN

Авторы:

Карина Юрьевна Песоцкая – старший преподаватель кафедры молекулярной биологии биологического факультета.
Дмитрий Владимирович Сорокин – студент биологического факультета. Научный руководитель – К. Ю. Песоцкая.
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, senior lecturer at the department of molecular biology, faculty of biology.
karina345678@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0004-6475-0115>
Dmitry V. Sorokin, student at the faculty of biology.
px.dima03@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0008-7045-6376>
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>

and *ohrA* genes. It was concluded that the tested plant phenolic compounds (salicylic, chlorogenic, vanillic, caffeic, cinnamic, *p*-hydroxybenzoic and ferulic acids) in physiological concentrations do not regulate *slyA* gene expression.

Keywords: *Erwinia amylovora*; SlyA regulator; plant phenolic compounds; polymyxin B; hydrogen peroxide; gene expression.

Введение

Регуляция экспрессии генов прокариот главным образом осуществляется на уровне инициации транскрипции, что достигается с помощью регуляторных белков, которые связываются со специфическими последовательностями ДНК, в результате чего происходит репрессия или активация транскрипции. Важным вариантом контроля транскрипции является аутогенный контроль (саморегуляция), который может быть как негативным, так и позитивным. Регуляция собственной экспрессии (путем связывания с ДНК или РНК) обнаружена у некоторых ферментов (треонил-тРНК-синтетазы, пролиндегидрогеназы, биотин-протеин-лигазы и др.). Для многих транскрипционных регуляторов (белка cI фага λ , аргининового репрессора (ArgR), метионинового репрессора (MetJ), триптофанового репрессора (TrpR), активатора транскрипции EutR *Escherichia coli* и др.) также характерен такой тип регуляции экспрессии собственных генов [1].

Одним из семейств транскрипционных регуляторов является семейство белков MarR (*multiple antibiotic resistance regulator*). Как правило, у прокариот белки этого семейства регулируют активность генов, отвечающих за вирулентность, стрессовые реакции, формирование биопленок и выведение из бактериальной клетки широкого спектра токсичных веществ – антибиотиков, фенольных соединений, активных форм кислорода, а также бытовых моющих и дезинфицирующих средств [2; 3]. Некоторые белки, принадлежащие к семейству MarR, активируют транскрипцию генов (например, ExpG у *Sinorhizobium meliloti*, PrhN у *Ralstonia solanacearum*), однако большинство представителей этого семейства подавляют экспрессию генов (например, PecS у *Dickeya dadantii*) [4; 5]. Известно, что регулятор SlyA принимает участие в контроле вирулентности у *Enterococcus faecalis*, *Dickeya zeae*, *D. dadantii*, *Salmonella enterica*, синтеза экзополисахаридов и подвижности бактериальных клеток у *D. dadantii*, а также устойчивости клеток к окислительному стрессу у *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium [6–9]. Для бактерий *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium показана регуляция активности белка SlyA фенольными соединениями растительного происхождения (в частности, салицилатом) [10].

Бактериальный ожог плодовых культур – некротическое заболевание, поражающее различные виды растений, принадлежащие к семейству Rosaceae, включая яблоню (*Malus domestica* (Suckow) Borkh.) и грушу (*Pyrus communis* L.), которые являются основными хозяевами возбудителя болезни. С момента первого описания в конце XVIII в. бактериальный ожог распространился по всему миру и в настоящее время обнаруживается в странах Европы, Азии, Ближнего Востока, Северной Африки, а также в Новой Зеландии. Возбудителем данного заболевания является бактерия *Erwinia amylovora*, внесенная в список A2 перечня вредителей Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (*European and Mediterranean Plant Protection Organisation*, EPPO) [11].

При воздействии на растение различных стрессовых факторов окружающей среды в его клетках накапливаются фенольные соединения. Световой стресс активирует синтез флавоноидов и фенольных кислот, температурный стресс – синтез флавоноидов, танинов и фенольных кислот, засоление – синтез полифенолов, флавоноидов, антоцианов, фенольных кислот и терпеноидов [12]. Заражение патогенами приводит к накоплению в растительных клетках фенольных соединений, подавляющих жизнедеятельность микроорганизмов, а также вызывающих развитие системной приобретенной устойчивости [12]. В различных растениях обнаруживаются разные фенольные соединения, например в яблоках содержится мирицетин, в бананах – галловая кислота (гидроксibenзойная кислота), в гранатах содержатся кверцетин и цианидин, в апельсинах – паракумаровая кислота и нарингенин, в клубнике – ванилиновая кислота и ресвератрол, в манго – феруловая кислота и апигенин, в арбузе и ананасе присутствует лютеолин [12]. В растениях семейства Rosaceae синтезируются следующие фенольные кислоты: салициловая, хлорогеновая, ванилиновая, кофейная, коричная, феруловая, галловая, синапиновая, сиреневая, гентизиновая, эллаговая и др. [13].

Роль белка – регулятора транскрипции SlyA, обнаруженного у бактерий *E. amylovora*, остается невыясненной. Именно по этой причине целью данной работы стало изучение экспрессии гена *slyA*, кодирующего регулятор семейства MarR у бактерий *E. amylovora*, а также анализ его реакции на различные потенциальные лиганды растительного происхождения.

Материалы и методы исследования

Использованные в работе штаммы бактерий, плазмиды и праймеры приведены в табл. 1 и 2. Бактерии выращивались при температуре 28 °С (*E. amylovora*) и 37 °С (*E. coli*) в полноценной питательной среде LB и синтетической минимальной среде М9 с добавлением глицерина (2 мл/л) в качестве источника углерода. Состав среды LB: пептон – 10,0 г/л; дрожжевой экстракт – 5,0 г/л; NaCl – 8,5 г/л. Состав среды М9: Na₂HPO₄ · 7H₂O – 12,8 г/л; KH₂PO₄ – 3,0 г/л; NH₄Cl – 1,0 г/л; NaCl – 0,5 г/л; MgSO₄ · 7H₂O – 0,246 г/л; CaCl₂ – 0,011 г/л [14]. Использованные в рамках исследования полноценные питательные среды стерилизовались автоклавированием при 1 атм в течение 40 мин. Синтетическая минимальная среда М9 стерилизовалась кипячением на протяжении 30 мин.

Таблица 1

Использованные в работе штаммы бактерий и плазмиды

Table 1

Bacterial strains and plasmids used in this study

Штамм или плазида	Характеристика	Источник
<i>Штаммы бактерий</i>		
<i>E. amylovora</i> E2	Штамм дикого типа, выделенный из <i>Malus</i> sp. в Беларуси в 2007 г. (код доступа в базе данных GenBank NZ_CP024970.1)	[15]
<i>E. amylovora</i> E2 Δ <i>slyA</i>	Δ <i>slyA</i> -мутант; Km ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
<i>E. amylovora</i> E2-pUA66	Штамм <i>E. amylovora</i> дикого типа, трансформированный плазмидой pUA66	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2-Ps	Штамм <i>E. amylovora</i> дикого типа, трансформированный плазмидой pUA66-P <i>slyA</i> ; Km ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2 Δ <i>slyA</i> -Ps	Δ <i>slyA</i> -мутант штамма дикого типа <i>E. amylovora</i> E2, трансформированный плазмидой pUA66-P <i>slyA</i> ; Km ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2-PsCs	Штамм <i>E. amylovora</i> дикого типа, трансформированный плазмидами pUA66-P <i>slyA</i> и pFLAG-CTC- <i>slyA</i> ; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2 Δ <i>slyA</i> -PsCs	Δ <i>slyA</i> -мутант штамма дикого типа <i>E. amylovora</i> E2, трансформированный плазмидами pUA66-P <i>slyA</i> и pFLAG-CTC- <i>slyA</i> ; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2-PsC	Штамм <i>E. amylovora</i> дикого типа, трансформированный плазмидами pUA66-P <i>slyA</i> и pFLAG-CTC; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2 Δ <i>slyA</i> -PsC	Δ <i>slyA</i> -мутант штамма дикого типа <i>E. amylovora</i> E2, трансформированный плазмидами pUA66-P <i>slyA</i> и pFLAG-CTC; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2-PyCs	Штамм <i>E. amylovora</i> дикого типа, трансформированный плазмидами pUA66-P <i>yhcn</i> и pFLAG-CTC- <i>slyA</i> ; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2 Δ <i>slyA</i> -PyCs	Δ <i>slyA</i> -мутант штамма дикого типа <i>E. amylovora</i> E2, трансформированный плазмидами pUA66-P <i>yhcn</i> и pFLAG-CTC- <i>slyA</i> ; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2-PyC	Штамм <i>E. amylovora</i> дикого типа, трансформированный плазмидами pUA66-P <i>yhcn</i> и pFLAG-CTC; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ

Окончание табл. 1
Ending of the table 1

Штамм или плаزمида	Характеристика	Источник
E2 $\Delta slyA$ -PyC	$\Delta slyA$ -мутант штамма дикого типа <i>E. amylovora</i> E2, трансформированный плазмидами pUA66-Pyhcn и pFLAG-CTC; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2-PaCs	Штамм <i>E. amylovora</i> дикого типа, трансформированный плазмидами pUA66-PohrA и pFLAG-CTC-slyA; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2 $\Delta slyA$ -PaCs	$\Delta slyA$ -мутант штамма дикого типа <i>E. amylovora</i> E2, трансформированный плазмидами pUA66-PohrA и pFLAG-CTC-slyA; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2-PaC	Штамм <i>E. amylovora</i> дикого типа, трансформированный плазмидами pUA66-PohrA и pFLAG-CTC; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2 $\Delta slyA$ -PaC	$\Delta slyA$ -мутант штамма дикого типа <i>E. amylovora</i> E2, трансформированный плазмидами pUA66-PohrA и pFLAG-CTC; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K m _K ⁺), <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> deoR, <i>gyrA96</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
Плазмиды		
pUA66	Экспрессионный репортерный вектор; pSC101 ori, <i>gfpmut2</i> под контролем исследуемого промотора; Km ^R	[16]
pFLAG-CTC	<i>tac</i> -Промотор, fl ori, oriV _{ColE1} , <i>lacZα</i> , <i>lacI</i> , <i>bla</i> ; Ap ^R	[17]
pUA66-PslyA	Предполагаемая промоторная область гена <i>slyA</i> штамма <i>E. amylovora</i> E2 (координаты в геноме 1 802 264–1 802 661 п. н.) встроена по сайтам XhoI/BamHI в pUA66; Km ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
pUA66-Pyhcn	Предполагаемая промоторная область гена <i>yhcn</i> штамма <i>E. amylovora</i> E2 (координаты в геноме 3 419 974–3 420 505 п. н.) встроена по сайтам XhoI/BamHI в pUA66; Km ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
pUA66-PohrA	Предполагаемая промоторная область гена <i>ohrA</i> штамма <i>E. amylovora</i> E2 (координаты в геноме 3 717 724–3 717 919 п. н.) встроена по сайтам XhoI/BamHI в pUA66; Km ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
pFLAG-CTC-slyA	Открытая рамка считывания гена <i>slyA</i> штамма <i>E. amylovora</i> E2 (AD997_RS08560) встроена по сайтам HindIII/SalI в pFLAG-CTC; Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ

Примечание. Принятые обозначения и сокращения: Km^R и Ap^R – устойчивость к канамицину и ампициллину соответственно; п. н. – пара нуклеотидов.

Таблица 2

Использованные в работе праймеры

Table 2

Primers used in this study

Праймер	Последовательность нуклеотидов (5'–3')	Назначение
SlyPRF	CCGCTCGAGTTTCTCCCTGAAATGTCATTAATG	Клонирование промотора гена <i>slyA</i>
SlyPRR	CGCGGATCCTGTCAACTCCTTATAATTAGCCTGC	
yhcnF	GAACCTCGAGACCTTCCGCTCCTCTGTCGCCCCGCC	Клонирование промотора гена <i>yhcn</i>
yhcnR	AGTGGATCCGCAGGCCAAAGGCCGCGATAGTGGT	

Окончание табл. 2
Ending of the table 2

Праймер	Последовательность нуклеотидов (5'–3')	Назначение
ohrAPf	GCTCGAGCGCTGAAAAGCGAGCTTGAA	Клонирование промотора гена <i>ohrA</i>
ohrAPr	ATCGGATCCACCGGTGGCTTTTGCTTTTG	
SF1cl	AGATAAGCTTTGGCTTGATAGTAAGCAGGC	Клонирование открытой рамки считывания гена <i>slyA</i>
SF2cl	AGGCGTCGACTTATGCATCCCTTCCATGC	

Геномная ДНК бактерий *E. amylovora* E2 выделялась с использованием набора Bacteria DNA Preparation – Solution Kit (*Jena Bioscience*, Германия) согласно инструкции производителя. Плазмиды выделялись из клеток бактерий с помощью метода щелочного лизиса [14].

Последовательность промотора гена *slyA* была амплифицирована посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием соответствующих праймеров с введенным на 5'-конец сайтом узнавания для рестриктазы XhoI или BamHI (см. табл. 2). Параметры амплификации: 1 цикл 94 °C, 5 мин; 30 циклов 94 °C, 30 с, 60 °C, 30 с и 72 °C, 25 с; 1 цикл 72 °C, 5 мин. В работе был использован амплификатор SureCycler-8800 (*Agilent Technologies*, США). После амплификации полученные ПЦР-продукты подвергались электрофоретическому разделению в 1 % агарозном геле. Последовательность открытой рамки считывания гена *slyA* была амплифицирована методом ПЦР с использованием соответствующих праймеров с введенным на 5'-конец сайтом узнавания для рестриктазы HindIII или SalI (см. табл. 2). Параметры амплификации: 1 цикл 94 °C, 5 мин; 30 циклов 94 °C, 30 с, 58 °C, 30 с и 72 °C, 30 с; 1 цикл 72 °C, 5 мин. После амплификации полученные ПЦР-продукты подвергались электрофоретическому разделению в 1 % агарозном геле. Последовательность промотора гена *yhcN* была амплифицирована методом ПЦР с использованием соответствующих праймеров с введенным на 5'-конец сайтом узнавания для рестриктазы XhoI или BamHI (см. табл. 2). Параметры амплификации: 1 цикл 94 °C, 5 мин; 30 циклов 94 °C, 30 с, 67 °C, 30 с и 72 °C, 35 с; 1 цикл 72 °C, 5 мин. После амплификации полученные ПЦР-продукты подвергались электрофоретическому разделению в 1 % агарозном геле. Последовательность промотора гена *ohrA* была амплифицирована методом ПЦР с использованием соответствующих праймеров с введенным на 5'-конец сайтом узнавания для рестриктазы XhoI или BamHI (см. табл. 2). Параметры амплификации: 1 цикл 94 °C, 5 мин; 30 циклов 94 °C, 30 с, 60 °C, 30 с и 72 °C, 30 с; 1 цикл 72 °C, 5 мин. После амплификации полученные ПЦР-продукты подвергались электрофоретическому разделению в 1 % агарозном геле.

Далее полученные последовательности подвергались одновременной обработке рестриктазами по методикам, рекомендованным фирмой-производителем (*Thermo Fisher Scientific*, США). Для рестрикции плазмиды pUA66 и последовательностей промоторов генов *slyA*, *yhcN* и *ohrA* применяли ферменты XhoI и BamHI. Плазмида pFLAG-CTC и последовательность открытой рамки считывания гена *slyA* рестрицировались с использованием ферментов HindIII и SalI.

Легирование последовательностей промоторов генов *slyA*, *yhcN* и *ohrA* и вектора pUA66, открытой рамки считывания гена *slyA* и вектора pFLAG-CTC проводилось с применением ДНК-лигазы бактериофага T4 (*Thermo Fisher Scientific*) согласно стандартным методикам, предложенным фирмой-производителем.

Компетентные клетки штамма *E. coli* DH5α трансформировались полученной лигазной смесью методом кальциевой трансформации, после чего высевались на агаризованную среду LB с канамицином (50 мкг/мл) или ампициллином (100 мкг/мл). Скрининг (анализ) трансформантов осуществлялся посредством ПЦР с использованием необходимых праймеров (см. табл. 2). Результаты анализа визуализировались с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле.

Компетентные клетки штаммов *E. amylovora* E2, E2 Δ*slyA*, E2-Ps, E2 Δ*slyA*-Ps трансформировались полученными рекомбинантными плазмидами методом электропорации на приборе компании *BioRad* (США), после чего высевались на агаризованную среду LB с канамицином (50 мкг/мл) или ампициллином (100 мкг/мл). Скрининг трансформантов осуществлялся методом ПЦР с использованием необходимых праймеров (см. табл. 2). Результаты анализа визуализировались с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле.

Для изучения влияния растительных фенольных соединений на активность промотора гена *slyA* были выбраны фенольные кислоты, которые согласно литературным данным синтезируются в клетках растений семейства Rosaceae, а именно салициловая, хлорогеновая, ванилиновая, кофейная, коричная, парагидроксibenзойная и феруловая кислоты. Изучение влияния различных веществ на активность промотора гена *slyA* проводилось путем измерения уровня экспрессии репортерного гена *gfp*, содержащегося в плазмиде.

миде pUA66. Уровень экспрессии белка GFP определялся по флуоресценции клеток различных штаммов *E. amylovora* на приборе CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия), так как накопление белка GFP в клетках бактерий служит репортером скорости инициации транскрипции с исследуемой промоторной области [16]. Бактериальные культуры штаммов *E. amylovora* выращивались в минимальной среде M9 в присутствии антибиотика канамицина (50 мкг/мл), после чего суспензии клеток объемом 200 мкл вносились в лунки 96-луночного планшета (Sarstedt, Австрия). Далее к бактериальной культуре добавлялся раствор необходимого соединения в соответствующей концентрации. Уровень флуоресценции, выраженный в относительных флуоресцентных единицах (*relative fluorescence units*, RFU), рассчитывался по нижеприведенным формулам.

$$NF = \frac{RF}{Ab}, \quad (1)$$

где NF – нормализованное значение флуоресценции (*normalised fluorescence*); RF – значение флуоресценции, полученное в эксперименте (*raw fluorescence*); Ab – оптическая плотность культуры клеток при длине волны 600 нм в момент изучения флуоресценции (*absorbance*).

$$CF = NF_{\text{оп. обр}} - NF_{\text{контр. обр}}, \quad (2)$$

где CF – уровень флуоресценции (*corrected fluorescence*); $NF_{\text{оп. обр}}$ – нормализованное значение флуоресценции, полученное для исследуемого штамма *E. amylovora* (опытный образец); $NF_{\text{контр. обр}}$ – нормализованное значение флуоресценции, полученное для штамма *E. amylovora*, содержащего плазмиду pUA66 (контрольный образец) [18].

Изучение регуляции транскрипции генов *slyA*, *yhcN* и *ohrA* проводилось путем измерения уровня экспрессии репортерного гена *gfp*. Уровень экспрессии белка GFP определялся по флуоресценции клеток различных штаммов *E. amylovora* на приборе CLARIOstar Plus. Бактериальные культуры штаммов *E. amylovora* выращивались в минимальной среде M9 в присутствии 0,01 ммоль/л изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозиды и соответствующих антибиотиков до оптической плотности 0,2–0,3 при длине волны 600 нм, после чего суспензии клеток объемом 200 мкл вносились в лунки 96-луночного планшета (Sarstedt). Уровень флуоресценции, выраженный в относительных флуоресцентных единицах (RFU), рассчитывался по формулам (1) и (2).

Статистическая обработка результатов проводилась в программе *GraphPad Prism* (версия 8). Для проверки отклонения от нормального распределения применялся обладающий наибольшей мощностью тест Шапиро – Уилка. При выявлении нормального распределения для оценки достоверности различий при сравнении значений двух выборок использовался *t*-критерий Стьюдента для независимых выборок в модификации Уэлча (сравнение средних величин без какого-либо предположения о равенстве дисперсий), а для оценки достоверности различий при сравнении значений трех и более выборок применялись критерии Брауна – Форсайта и Уэлча. При выявлении распределения, отличного от нормального, для оценки достоверности различий при сравнении значений двух выборок использовался *U*-критерий Манна – Уитни. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Каждый эксперимент проводился в восьми биологических повторах.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования авторы попытались изучить влияние уровня экспрессии гена *slyA* на активность собственного промотора. С этой целью была проанализирована активность промотора гена *slyA* в штаммах *E. amylovora* дикого типа и мутантных штаммах при наличии и отсутствии в клетках плазмиды, комплементирующей мутацию гена *slyA*. Для постановки данного эксперимента использовались следующие производные штамма *E. amylovora* E2: E2-PsC (штамм дикого типа с плазмидами pUA66-Ps*slyA* и pFLAG-CTC), E2-PsCs (штамм дикого типа с плазмидой pUA66-Ps*slyA* и плазмидой pFLAG-CTC-*slyA*, комплементирующей мутацию гена *slyA*), Δ*slyA*-PsC (делеционный мутант по гену *slyA* с плазмидами pUA66-Ps*slyA* и pFLAG-CTC) и Δ*slyA*-PsCs (делеционный мутант по гену *slyA* с плазмидой pUA66-Ps*slyA* и плазмидой pFLAG-CTC-*slyA*, комплементирующей мутацию гена *slyA*).

Как видно из рис. 1, спустя 24 ч инкубации уровень экспрессии промотора гена *slyA* у клеток делеционного мутанта Δ*slyA*-PsC был в 1,8 раза ниже, чем у клеток штамма E2-PsC. Замена «пустой» векторной плазмиды pFLAG-CTC штамма E2-PsC на рекомбинантную плазмиду с копией гена *slyA* (pFLAG-CTC-*slyA*; штамм E2-PsCs) повысила исследуемую промоторную активность в 1,4 раза. Эти данные свидетельствуют об активаторной роли белка SlyA в отношении промотора собственного гена.

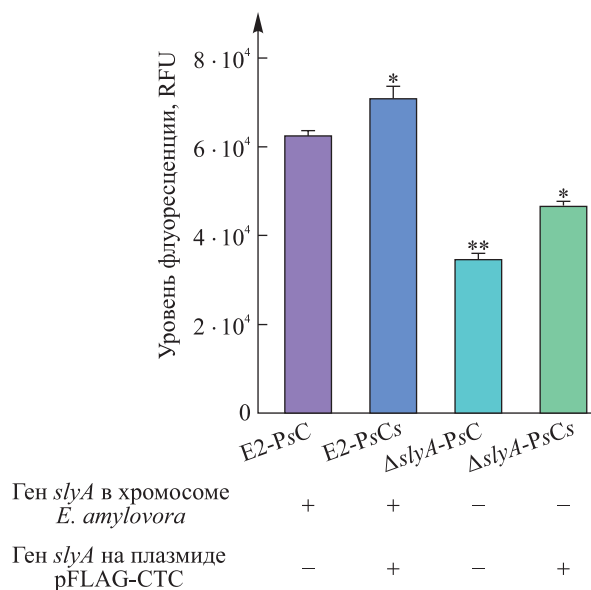


Рис. 1. Влияние уровня экспрессии гена *slyA* на активность собственного промотора у разных штаммов бактерий *E. amylovora*. Знаком * отмечены достоверные различия в уровне флуоресценции при $p \leq 0,01$, знаком ** – при $p \leq 0,0001$ (критерии Брауна – Форсайта и Уэлча). Различия в уровне флуоресценции были выявлены путем сравнения среднего значения каждой выборки со средним значением контрольной выборки (штамм E2-PsC). Планки погрешностей отражают величину стандартной ошибки

Fig. 1. The effect of *slyA* gene expression on *slyA* gene promoter activity in different strains of *E. amylovora*.

Sign * indicates significant differences in relative fluorescence units at $p \leq 0.01$, sign ** indicates significant differences at $p \leq 0.0001$ (Brown – Forsythe and Welch ANOVA tests). Differences in relative fluorescence units were identified by comparing the mean value of each sample with the mean value of the control sample (strain E2-PsC). Error bars represent the standard error of mean

Известно, что белки семейства MarR могут связывать различные лиганды, чаще всего это приводит к ослаблению взаимодействия регулятора с ДНК и дерепрессии (или деактивации) транскрипции. В отсутствие лиганда белок-регулятор связывается с ДНК, тем самым подавляя либо активируя экспрессию генов [3]. Установлено, что к числу таких лигандов принадлежат фенольные соединения (например, салицилат), ионы металлов, активные формы кислорода и др. [10]. Белок SlyA, так же как и другие белки семейства MarR, подвержен аллостерическому ингибированию ароматическими молекулами, которые имеют небольшой размер [19]. В работе [20] было показано, что молекулы салицилата способны ингибировать связывание регулятора SlyA с ДНК *in vitro* у бактерий *S. enterica*. С учетом этого факта представляется интересным изучить влияние салициловой кислоты, а также других растительных фенольных соединений на транскрипционную регуляцию экспрессии гена *slyA* у бактерий *E. amylovora*. Для постановки данного эксперимента клетки штамма *E. amylovora* E2 были трансформированы векторной конструкцией pUA66-P*slyA*. В результате удалось установить, что салициловая кислота в концентрации 2,5 ммоль/л вызывает увеличение активности промотора гена *slyA* в 1,3 раза, а в концентрации 5,0 ммоль/л – в 1,4 раза по сравнению с контролем (рис. 2, а). В то же время другие протестированные фенольные кислоты обуславливают снижение изучаемой промоторной активности. Так, при культивировании клеток с ванилиновой кислотой (2,5 ммоль/л) активность промотора гена *slyA* снизилась в 1,2 раза по сравнению с контролем (рис. 2, б), при культивировании с парагидроксибензойной кислотой (2,5 ммоль/л) и феруловой кислотой (2,5 ммоль/л) она уменьшилась в 1,4 раза (рис. 2, в и г), а при культивировании с хлорогеновой кислотой (2,5 ммоль/л) – в 1,2 раза (рис. 2, д). Кофейная кислота в концентрации 2,5 ммоль/л не вызывает изменений в активности промотора гена *slyA*, однако при увеличении концентрации до 5,0 ммоль/л обуславливает снижение экспрессии репортера в 1,2 раза по сравнению с контрольными значениями (рис. 2, е). Добавление к среде культивирования коричной кислоты в концентрации 2,5 ммоль/л не приводит к достоверным различиям между контрольными и опытными значениями (рис. 2, ж).

Физиологическая роль рассмотренных фенольных соединений вызывает сомнение, так как оказываемый ими эффект проявляется при высоких внутриклеточных концентрациях. По этой причине на следующем этапе исследования изучался уровень активности промотора гена *slyA* при культивировании клеток с растительными фенольными соединениями в концентрации 0,6 ммоль/л. В итоге было обнаружено, что ни одна используемая кислота достоверно не изменила уровень активности исследуемого промотора (рис. 3).

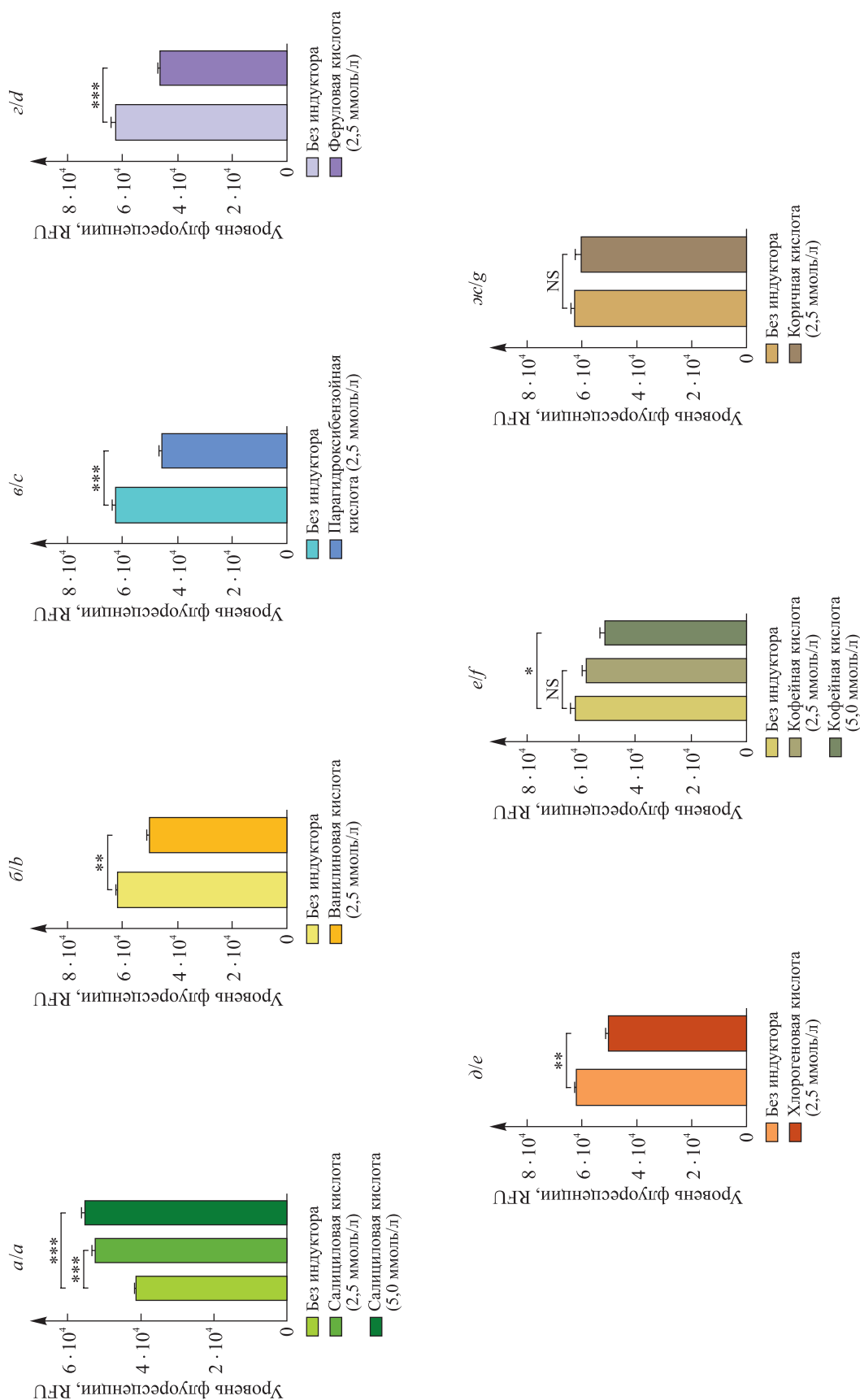


Рис. 2. Влияние растительных фенольных соединений (салициловой (а), ванилиновой (б), парагидроксibenзойной (в), феруловой (г), хлорогеновой (д), кофейной (е) и коричной (ж) кислот) в концентрации 2,5 и 5,0 ммоль/л (для салициловой и кофейной кислот) на активность промотора гена *shyA*. Знаком * отмечены достоверные различия в уровне флуоресценции при $p \leq 0,01$, знаком ** – при $p \leq 0,001$, знаком *** – при $p \leq 0,0001$. Обозначение «NS» указывает на отсутствие достоверных различий (*t*-критерий Стьюдента в модификации Уэлча). Планки погрешностей отражают величину стандартной ошибки

chlorogenic (e), caffeic (f) and cinnamic (g) acids) at a concentration of 2.5 and 5.0 mmol/L (for salicylic and caffeic acids) on the activity of the *shyA* gene promoter. Sign * indicates significant differences in relative fluorescence units at $p \leq 0.01$, sign ** indicates significant differences at $p \leq 0.001$, sign *** indicates significant differences at $p \leq 0.0001$. The notation «NS» indicates the absence of significant differences (unpaired *t*-test with Welch's correction). Error bars represent the standard error of mean

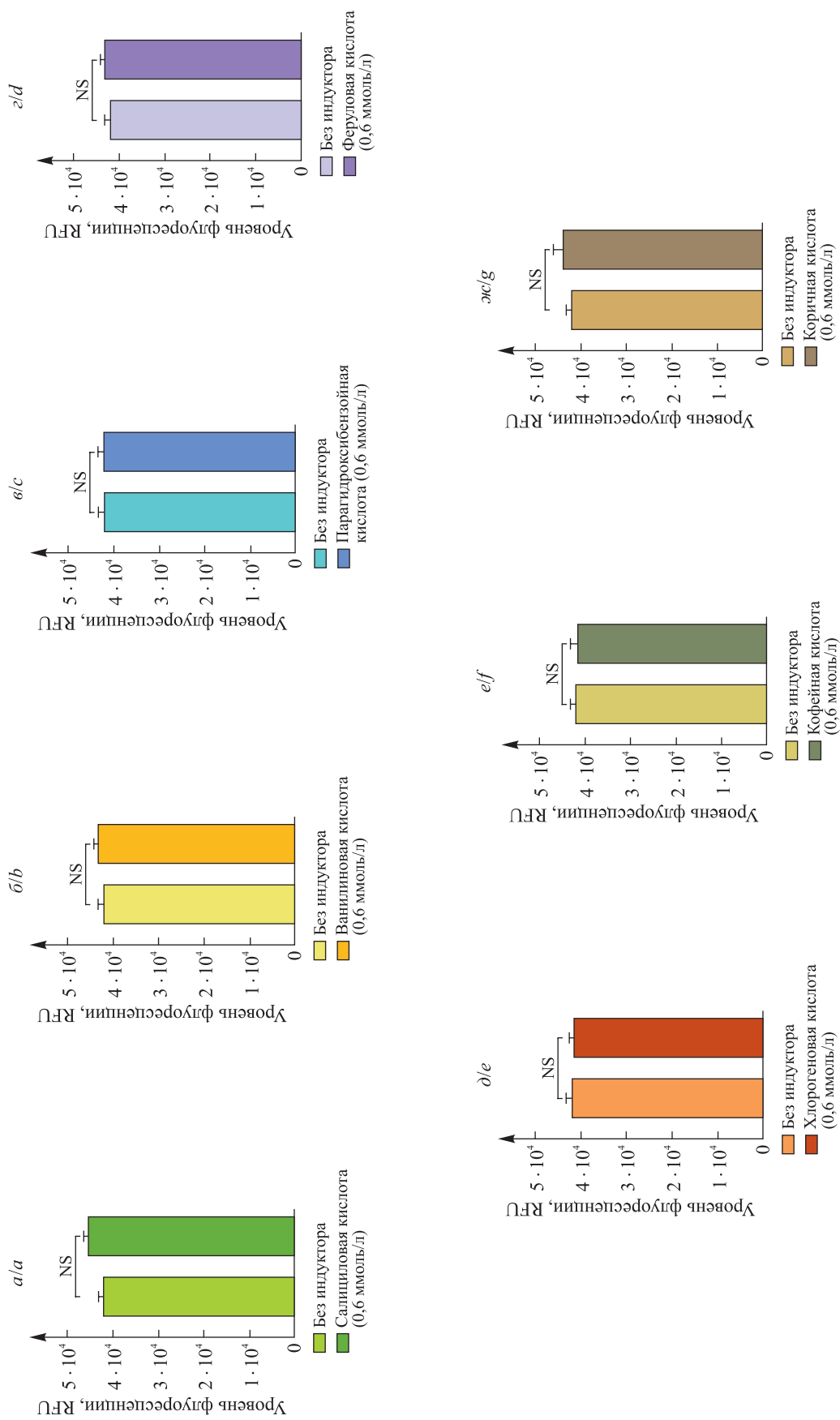


Рис. 3. Влияние растительных фенольных соединений (салициловой (а), ванилиновой (б), парагидроксibenзойной (в), феруловой (г), хлорогеновой (д), кофейной (е) и коричной (ж) кислот) в концентрации 0,6 ммоль/л на активность промотора гена *syA*. Обозначение «NS» указывает на отсутствие достоверных различий (*t*-критерий Стьюдента в модификации Уэлча).

Плнки погрешностей отражают величину стандартной ошибки

Fig. 3. The effect of plant phenolic compounds (salicylic (a), vanillic (b), *p*-hydroxybenzoic (c), ferulic (d), chlorogenic (e), caffeic (f) and cinnamic (g) acids) at a concentration of 0.6 mmol/L on the activity of the *syA* gene promoter. The notation «NS» indicates the absence of significant differences (unpaired *t*-test with Welch's correction). Error bars represent the standard error of mean

На основании полученных результатов можно допустить, что ни одно из рассмотренных в рамках настоящей работы растительных фенольных соединений не является природным лигандом для белка SlyA, однако для подтверждения данного предположения необходимо проведение дальнейших исследований.

Известно, что бактерии (например, *S. enterica*, *D. dadantii*), имеющие делецию гена *slyA*, характеризуются повышенной чувствительностью к антибиотику полимиксину В [7; 9]. Ранее нами было показано, что выживаемость клеток штамма *E. amylovora*, мутантного по гену *slyA*, в присутствии полимиксина В в концентрации 5 мкг/мл снижается в 3 раза по сравнению с выживаемостью клеток штамма дикого типа [21]. Именно по этой причине на следующем этапе исследования в качестве вещества, потенциально вовлеченного в регуляцию транскрипции гена *slyA*, был выбран полимиксин В. Полученные результаты свидетельствуют, что данный антибиотик в концентрации 1 мкг/мл вызывает увеличение промоторной активности гена *slyA* в 1,2 раза (рис. 4).

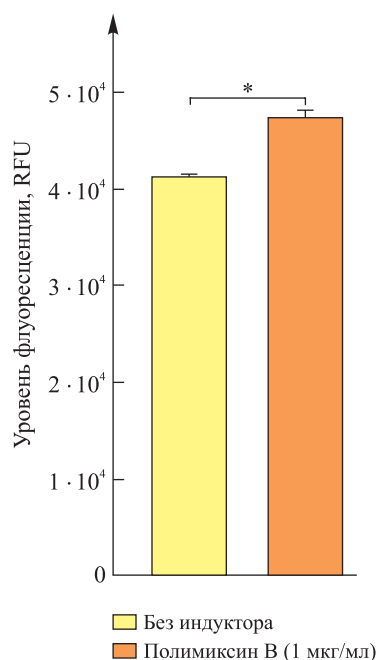


Рис. 4. Влияние полимиксина В на активность промотора гена *slyA*.
Знаком * отмечены достоверные различия в уровне флуоресценции при $p \leq 0,001$ (*U*-критерий Манна – Уитни).

Плankи погрешностей отражают величину стандартной ошибки

Fig. 4. The effect of polymyxin B on the activity of the *slyA* gene promoter.

Sign * indicates significant differences in relative fluorescence units at $p \leq 0.001$ (Mann – Whitney *U*-test).

Error bars represent the standard error of mean

В качестве соединения, предположительно также вовлеченного в регуляцию экспрессии гена *slyA*, была протестирована перекись водорода в концентрации 1; 2 и 5 ммоль/л. Известно, что белок SlyA принимает участие в регуляции экспрессии генов, отвечающих за устойчивость к окислительному стрессу у бактерий *S. enterica* [22] и *D. dadantii* [7]. В ходе изучения выживаемости клеток бактерий *E. amylovora* при добавлении к среде культивирования перекиси водорода было выявлено, что перекись водорода в концентрации 25 ммоль/л вызывает снижение выживаемости клеток делеционного мутанта в 2 раза по сравнению с выживаемостью клеток штамма дикого типа, а в концентрациях 50 и 100 ммоль/л обуславливает прекращение роста клеток мутантного штамма [21]. Согласно результатам настоящего исследования активность промотора гена *slyA* в присутствии перекиси водорода в концентрации 1; 2 и 5 ммоль/л увеличивается в 1,2; 1,4 и 1,7 раза соответственно (рис. 5), что позволяет предположить участие перекиси водорода в регуляции транскрипции гена *slyA* у бактерий *E. amylovora*.

С учетом вышеизложенных данных, а также данных о сниженной выживаемости клеток мутантного штамма E2 $\Delta slyA$ в присутствии перекиси водорода и сниженной продукции каталазы клетками

данного штамма нами изучено влияние белка SlyA на активность промоторов генов, кодирующих пероксидазу YhcN и органическую гидропероксидредуктазу OhrA, которая отвечает за снижение содержания в бактериальных клетках гидроперекисей жирных кислот (образуются в результате перекисного окисления липидов) и пероксинитрита, являющихся сильными окислителями и играющих важную роль в системе взаимодействия патоген – хозяин [21; 23]. Наличие предполагаемых сайтов связывания регулятора SlyA перед последовательностями генов *yhcN* и *ohrA* выявлено с использованием программы *SigmoID* [24]. Результаты проведенного эксперимента показали, что активность промотора гена гидропероксидредуктазы OhrA в клетках делеционного мутанта по гену *slyA* с «пустой» векторной плазмидой pFLAG-CTC (штамм $\Delta slyA$ -PaC) была в 49 раз ниже его активности в клетках делеционного мутанта с рекомбинантной плазмидой с копией гена *slyA* (pFLAG-CTC-*slyA*; штамм $\Delta slyA$ -PaCs). Наличие в клетках штамма $\Delta slyA$ -PaCs указанного рекомбинантного вектора способствовало восстановлению активности изучаемого промотора до первоначального уровня (относительно экспрессии промотора гена *ohrA* в клетках штамма E2-PaC) (рис. 6). Самая низкая промоторная активность гена пероксидазы YhcN была зарегистрирована в клетках делеционного мутанта по гену *slyA* с векторной плазмидой pFLAG-CTC (штамм $\Delta slyA$ -PyC). Замена данной плазмиды на рекомбинантную плазмиду с копией гена *slyA* (pFLAG-CTC-*slyA*) увеличила активность исследуемого промотора в клетках делеционного мутанта (штамм $\Delta slyA$ -PyCs) в 4,2 раза, что привело к частичному восстановлению экспрессии промотора гена *yhcN* до первоначальных значений (относительно экспрессии промотора данного гена в клетках штамма E2-PyC) (рис. 7).

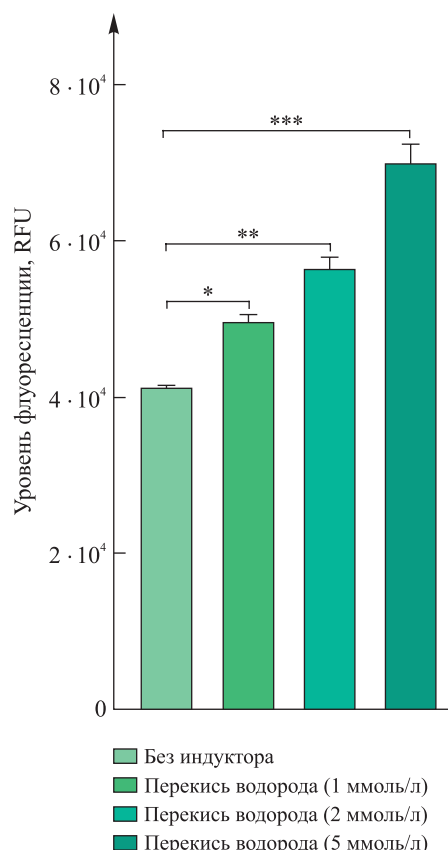


Рис. 5. Влияние перекиси водорода в концентрации 1; 2 и 5 ммоль/л на активность промотора гена *slyA*. Знаком * отмечены достоверные различия в уровне флуоресценции при $p \leq 0,01$, знаком ** – при $p \leq 0,001$, знаком *** – при $p \leq 0,0001$ (t -критерий Стьюдента в модификации Уэлча).

Плankи погрешностей отражают величину стандартной ошибки

Fig. 5. The effect of hydrogen peroxide at a concentrations of 1; 2 and 5 mmol/L on the activity of the *slyA* gene promoter. Sign * indicates significant differences in relative fluorescence units at $p \leq 0.01$, sign ** indicates significant differences at $p \leq 0.001$, sign *** indicates significant differences at $p \leq 0.0001$ (unpaired t -test with Welch's correction). Error bars represent the standard error of mean

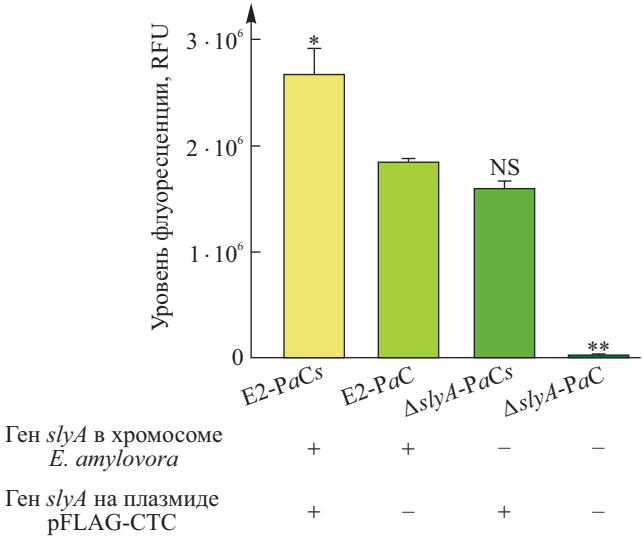


Рис. 6. Влияние экспрессии гена *slyA* на активность промотора гена *ohrA* у разных штаммов бактерий *E. amylovora*. Знаком * отмечены достоверные различия в уровне флуоресценции при $p \leq 0,01$, знаком ** – при $p \leq 0,0001$. Обозначение «NS» указывает на отсутствие достоверных различий (критерии Брауна – Форсайта и Уэлча). Различия в уровне флуоресценции были выявлены путем сравнения среднего значения каждой выборки со средним значением контрольной выборки (штамм E2-PaC).

Планки погрешностей отражают величину стандартной ошибки

Fig. 6. The effect of *slyA* gene expression on *ohrA* gene promoter activity in different strains of *E. amylovora*. Sign * indicates significant differences in relative fluorescence units at $p \leq 0.01$, sign ** indicates significant differences at $p \leq 0.0001$. The notation «NS» indicates the absence of significant differences (Brown – Forsythe and Welch ANOVA tests). Differences in relative fluorescence units were identified by comparing the mean value of each sample with the mean value of the control sample (strain E2-PaC).

Error bars represent the standard error of mean

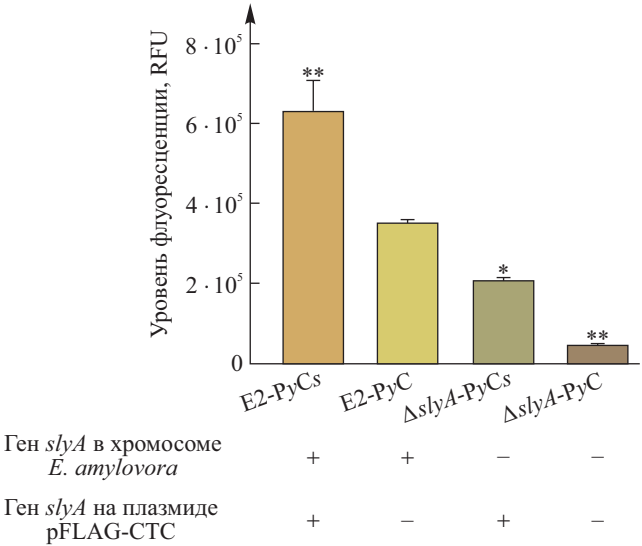


Рис. 7. Влияние экспрессии гена *slyA* на активность промотора гена *yhcN* у разных штаммов бактерий *E. amylovora*. Знаком * отмечены достоверные различия в уровне флуоресценции при $p \leq 0,01$, знаком ** – при $p \leq 0,001$ (критерий Брауна – Форсайта и Уэлча). Различия в уровне флуоресценции были выявлены путем сравнения среднего значения каждой выборки со средним значением контрольной выборки (штамм E2-PyC).

Планки погрешностей отражают величину стандартной ошибки

Fig. 7. The effect of *slyA* gene expression on *yhcN* gene promoter activity in different strains of *E. amylovora*. Sign * indicates significant differences in relative fluorescence units at $p \leq 0.01$, sign ** indicates significant differences at $p \leq 0.001$ (Brown – Forsythe and Welch ANOVA tests). Differences in relative fluorescence units were identified by comparing the mean value of each sample with the mean value of the control sample (strain E2-PyC).

Error bars represent the standard error of mean

Таким образом, описанные выше результаты свидетельствуют в пользу предположения о том, что белок SlyA положительно регулирует экспрессию генов *yhcN* и *ohrA*, продукты которых, по-видимому, вовлечены в устойчивость клеток бактерий *E. amylovora* к окислительному стрессу.

Заключение

В настоящем исследовании установлено, что растительные фенольные соединения оказывают влияние на активность промотора гена *slyA* только в высоких концентрациях, т. е. указанный результат не подтверждает предположение о функционировании данных веществ в качестве лигандов для белка SlyA. В то же время полимиксин В и перекись водорода значимо увеличивают активность исследуемого промотора. Кроме того, отмечено, что белок SlyA активирует экспрессию промоторов генов *yhcN* и *ohrA*, продукты которых обеспечивают устойчивость клеток бактерий *E. amylovora* к окислительному стрессу, причем степень этой активации возрастает в присутствии полимиксина В и перекиси водорода. В совокупности полученные результаты с высокой вероятностью позволяют предполагать, что транскрипционный регулятор SlyA фитопатогенной бактерии *E. amylovora* участвует в ее адаптации к активным формам кислорода и антимикробным пептидам, продуцируемым растением-хозяином для защиты от патогена.

Библиографические ссылки

1. Maloy S, Stewart V. Autogenous regulation of gene expression. *Journal of Bacteriology*. 1993;175(2):307–316. DOI: 10.1128/jb.175.2.307-316.1993.
2. Deochand DK, Grove A. MarR family transcription factors: dynamic variations on a common scaffold. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2017;52(6):595–613. DOI: 10.1080/10409238.2017.1344612.
3. Ellison DW, Miller VL. Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family. *Current Opinion in Microbiology*. 2006;9(2):153–159. DOI: 10.1016/j.mib.2006.02.003.
4. Mhedbi-Hajri N, Malfatti P, Pédrón J, Gaubert S, Reverchon S, Van Gijsegem F. PecS is an important player in the regulatory network governing the coordinated expression of virulence genes during the interaction between *Dickeya dadantii* 3937 and plants. *Environmental Microbiology*. 2011;13(11):2901–2914. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02566.x.
5. Wilkinson SP, Grove A. Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Current Issues in Molecular Biology*. 2006;8(1):51–62.
6. Zhou J-N, Zhang H-B, Lv M-F, Chen Y-F, Liao L-S, Cheng Y-Y, et al. SlyA regulates phytotoxin production and virulence in *Dickeya zeae* EC1. *Molecular Plant Pathology*. 2016;17(9):1398–1408. DOI: 10.1111/mpp.12376.
7. Haque MM, Kabir MS, Aini LQ, Hirata H, Tsuyumu S. SlyA, a MarR family transcriptional regulator, is essential for virulence in *Dickeya dadantii* 3937. *Journal of Bacteriology*. 2009;191(17):5409–5418. DOI: 10.1128/jb.00240-09.
8. Michaux C, Sanguinetti M, Reffuveille F, Auffray Y, Posteraro B, Gilmore MS, et al. SlyA is a transcriptional regulator involved in the virulence of *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*. 2011;79(7):2638–2645. DOI: 10.1128/IAI.01132-10.
9. Navarre WW, Halsey TA, Walther D, Frye J, McClelland M, Potter JL, et al. Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Molecular Microbiology*. 2005;56(2):492–508. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04553.x.
10. Will WR, Brzovic P, Le Trong I, Stenkamp RE, Lawrenz MB, Karlinsey JE, et al. The evolution of SlyA/RovA transcription factors from repressors to countersilencers in Enterobacteriaceae. *mBio*. 2019;10(2):e00009-19. DOI: 10.1128/mBio.00009-19.
11. Pedroncelli A, Puopolo G. This tree is on fire: a review on the ecology of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight disease. *Journal of Plant Pathology*. 2024;106(3):823–837. DOI: 10.1007/s42161-023-01397-y.
12. Badria FA, editor. *Phenolic compounds – chemistry, synthesis, diversity, non-conventional industrial, pharmaceutical and therapeutic applications*. London: IntechOpen; 2022. XX, 433 p. (Blumenberg M, editor. IntechOpen series. Biochemistry; volume 26). DOI: 10.5772/intechopen.94825.
13. Ogah O, Watkins CS, Ubi BE, Oraguzie NC. Phenolic compounds in Rosaceae fruit and nut crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014;62(39):9369–9386. DOI: 10.1021/jf501574q.
14. Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 3 volumes.
15. Lagonenko AL, Komardina VS, Nikolaichik YA, Evtushenkov AN. First report of *Erwinia amylovora* fire blight in Belarus. *Journal of Phytopathology*. 2008;156(10):638–640. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2008.01420.x.
16. Zaslaver A, Bren A, Ronen M, Itzkovitz S, Kikoin I, Shavit S, et al. A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nature Methods*. 2006;3(8):623–628. DOI: 10.1038/nmeth895.
17. Hopp TP, Prickett KS, Price VL, Libby RT, March CJ, Cerretti DP, et al. A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Nature Bio/Technology*. 1988;6(10):1204–1210. DOI: 10.1038/nbt1088-1204.
18. Martinez-Vaz BM, Makarevitch I, Stensland S. Studying gene expression: database searches and promoter fusions to investigate transcriptional regulation in bacteria. *Journal of Microbiology & Biology Education*. 2010;11(1):42–49. DOI: 10.1128/jmbe.v11.i1.101.
19. Dolan KT, Duguid EM, He C. Crystal structures of SlyA protein, a master virulence regulator of *Salmonella*, in free and DNA-bound states. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(25):22178–22185. DOI: 10.1074/jbc.M111.245258.
20. Hao Z, Lou H, Zhu R, Zhu J, Zhang D, Zhao BS, et al. The multiple antibiotic resistance regulator MarR is a copper sensor in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology*. 2014;10(1):21–28. DOI: 10.1038/nchembio.1380.

21. Песоцкая КЮ, Лагоненко АЛ, Евтушенков АН. Транскрипционный фактор SlyA регулирует продукцию факторов вирулентности и устойчивость к окислительному стрессу у фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora*. *Молекулярная и прикладная генетика*. 2025;38:111–122. EDN: EJNXJI.
22. Cabezas CE, Briones AC, Aguirre C, Pardo-Esté C, Castro-Severyn J, Salinas CR, et al. The transcription factor SlyA from *Salmonella* Typhimurium regulates genes in response to hydrogen peroxide and sodium hypochlorite. *Research in Microbiology*. 2018;169(6):263–278. DOI: 10.1016/j.resmic.2018.04.003.
23. Meireles DA, da Silva Neto JF, Domingos RM, Alegria TGP, Santos LCM, Netto LES. Ohr – OhrR, a neglected and highly efficient antioxidant system: structure, catalysis, phylogeny, regulation, and physiological roles. *Free Radical Biology and Medicine*. 2022;185:6–24. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.04.001.
24. Nikolaichik Y, Damienikan AU. Sigmoid: a user-friendly tool for improving bacterial genome annotation through analysis of transcription control signals. *PeerJ*. 2016;4:e2056. DOI: 10.7717/peerj.2056.

Получена 13.01.2025 / исправлена 19.06.2025 / принята 07.07.2025.
Received 13.01.2025 / revised 19.06.2025 / accepted 07.07.2025.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ В ЛИСТЯХ И КЛУБНЯХ РАСТЕНИЙ *SOLANUM TUBEROSUM* ПРИ ЗАРАЖЕНИИ БАКТЕРИЯМИ *PECTOBACTERIUM VERSATILE*

А. В. КОЛУБАКО¹⁾, Н. А. ГРИГОРЬЕВА¹⁾,
Е. В. ШРУБ¹⁾, Е. А. НИКОЛАЙЧИК¹⁾

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

Аннотация. Проанализированы паттерны экспрессии генов основных компонентов гормональной регуляции в листьях и клубнях растений картофеля при внедрении бактерий *Pectobacterium versatile* в целях выявления зависимых от гормонального статуса механизмов иммунной защиты. На основе данных об экспрессии генов биосинтеза абсцизовой кислоты высказано предположение о том, что количество активной формы этой кислоты снижается. Отмечено подавление экспрессии жасмонатзависимых генов. Показано, что этилензависимые транскрипционные факторы экспрессируются разнонаправленно в листьях и клубнях растений картофеля.

Ключевые слова: молекулярная фитопатология; *Solanum tuberosum*; *Pectobacterium versatile*; гормональная регуляция иммунитета растений.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б24М-035) и Министерства образования Республики Беларусь (№ гос. регистрации 20241129).

Образец цитирования:

Колубако АВ, Григорьева НА, Шруб ЕВ, Николайчик ЕА. Особенности иммунных реакций в листьях и клубнях растений *Solanum tuberosum* при заражении бактериями *Pectobacterium versatile*. Экспериментальная биология и биотехнология. 2025;3:62–73.
EDN: GBJKYN

For citation:

Kalubaka NV, Hryhoryeva NA, Shrub KV, Nikolaichik YA. Features of immune reactions in leaves and tubers of *Solanum tuberosum* plants during infection by *Pectobacterium versatile* bacteria. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2025;3:62–73. Russian.
EDN: GBJKYN

Авторы:

Анастасия Вячеславовна Колубако – заведующий научно-исследовательской лабораторией трансгенных растений кафедры молекулярной биологии биологического факультета.
Надежда Александровна Григорьева – студентка биологического факультета. Научный руководитель – А. В. Колубако.
Екатерина Викторовна Шруб – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории трансгенных растений кафедры молекулярной биологии биологического факультета.
Евгений Артурович Николайчик – кандидат биологических наук, доцент; заведующий кафедрой молекулярной биологии биологического факультета.

Authors:

Nastassia V. Kalubaka, head of the laboratory of transgene plants, department of molecular biology, faculty of biology.
kolubakoav@yandex.by
Nadzeya A. Hryhoryeva, student at the faculty of biology.
grigorieva887@gmail.com
Katerina V. Shrub, junior researcher at the laboratory of transgene plants, department of molecular biology, faculty of biology.
shrubkaterina@gmail.com
Yevgeny A. Nikolaichik, PhD (biology), docent; head of the department of molecular biology, faculty of biology.
yevgenynikolaichik@gmail.com

FEATURES OF IMMUNE REACTIONS IN LEAVES AND TUBERS OF *SOLANUM TUBEROSUM* PLANTS DURING INFECTION BY *PECTOBACTERIUM VERSATILE* BACTERIA

N. V. KALUBAKA^a, N. A. HRYHORYEVA^a, K. V. SHRUB^a, Y. A. NIKOLAICHUK^a

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

Corresponding author: N. V. Kalubaka (kolubakoav@yandex.by)

Abstract. We analysed the expression patterns of genes of the main components of hormonal regulation in leaves and tubers of potato plants infected with *Pectobacterium versatile* bacteria to identify hormonal status-dependent immune defense mechanisms. Based on gene expression data for abscisic acid biosynthesis, it is suggested that the amount of the active form of this acid decreases. Suppression of jasmonate-dependent gene expression was observed. Ethylene-dependent transcription factors were shown to be expressed in different directions in potato leaves and tubers.

Keywords: molecular phytopathology; *Solanum tuberosum*; *Pectobacterium versatile*; hormonal regulation of plant immunity.

Acknowledgements. This work was carried out with financial support from the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. B24M-035) and the Ministry of Education of the Republic of Belarus (state registration No. 20241129).

Введение

Бактериозы являются актуальной проблемой, существенно ограничивающей продуктивность растений картофеля. Самые распространенные бактериальные патогены этой культуры – представители рода *Pectobacterium*. Для Беларуси наиболее актуален вид *P. versatile*, способный инфицировать как надземные, так и подземные части растения, вызывая развитие черной ножки стеблей и мягкой гнили клубней. Изолированный в Беларуси из клубней растений картофеля штамм 3-2, сейчас классифицируемый как *P. versatile*, первоначально был описан как *Erwinia atroseptica*, а в последующих публикациях в соответствии с изменениями классификации пектобактерий упоминался как *E. carotovora* subsp. *atroseptica* и *P. carotovorum*.

Вид *P. versatile*, будучи преимущественно некротрофом, активно продуцирует и секретирует ферменты для лизиса клеточной стенки растений (полигалактуроназы, пектацеллюлазы и целлюлазы [1]), а также вводит эффекторный белок DspE прямо в клетки растения-хозяина [2]. Белок DspE в клетках связывается с рецепторподобными киназами RLK2 и RLK5 [3] и меняет иммунный ответ растений, в результате чего происходят снижение экспрессии этих RLK, запуск киназного сигнального каскада [4], снижение экспрессии защитного белка PR1 [3; 5], обладающего антибактериальной активностью, а также запуск гибели клеток, что выгодно некротрофному патогену.

Иммунные реакции растений в значительной степени контролируются гормонами. Гормоны регулируют все жизненные процессы растений – от прорастания семян и вегетативного развития до генеративной стадии и периода покоя. Помимо процессов развития и поддержания гомеостаза, они отвечают за регуляцию ответов растения на абиотические и биотические стрессовые факторы среды. Соответственно, количество гормонов и их относительный состав в разные периоды роста, в различных органах растений и при разных условиях среды отличаются.

Абсцизовая кислота (АБК), помимо регуляции стрессовых реакций, играет важную роль в поддержании периода покоя клубней картофеля *Solanum tuberosum* [6; 7]. Максимальное ее количество наблюдается после сбора урожая, затем, ближе к высадке, уровень АБК постепенно снижается, что позволяет клубню прорасти. Концентрация АБК находится в обратной зависимости от температуры окружающей среды [6]. Замечена прямая зависимость между содержанием этилена и количеством АБК в период покоя: уровень этилена в начале периода покоя клубней также довольно высок, однако затем быстро снижается [8]. Кроме того, известно, что на протяжении периода покоя в клубнях повышен уровень жасмонатов [9]. Ауксин и цитокинин регулируют процессы прорастания клубней, и их концентрация в этот период повышается [10; 11], затем активируются гиббереллины, которые регулируют рост проростков [12]. Сигнальные пути всех перечисленных гормонов напрямую или косвенно участвуют в иммунном ответе растений.

Поскольку иммунный ответ растений находится под гормональным контролем, а гормональный статус клубней и надземных частей растения различается, оценка тканеспецифичных аспектов иммунных реакций необходима как для понимания работы иммунной системы растений картофеля, так и для сравнения результатов экспериментов, проведенных разными исследовательскими группами в отличающихся условиях. В рамках настоящей работы был выполнен анализ различий в иммунном ответе надземной (листья) и подземной (клубни) частей растений картофеля на внедрение бактерий *P. versatilis*.

Материалы и методы исследования

Растения *S. tuberosum* сорта Рогнеда выращивали в климатической камере при температуре 22 °C и 16-часовом световом дне. Клубни картофеля хранили при температуре 4 °C. Бактерии *P. versatilis* JN42 (штамм дикого типа) и *P. versatilis* VKE (штамм, мутантный по эффектору системы секреции III типа DspE) культивировали при температуре 28 °C.

Клубни картофеля сорта Рогнеда категории «суперсуперэлита» заражали весной по окончании периода покоя. Для эксперимента использовали посадочный материал одинакового калибра (6+, или 60 мм). С помощью автоматической пипетки в клубни вводили по 10 мкл суспензий клеток штамма *P. versatilis* JN42 или *P. versatilis* VKE в 0,85 % NaCl плотностью $3 \cdot 10^7$ клеток на 1 мл. В каждый клубень делали два укола со стороны столона под углом 45° к продольной оси клубня. Эксперимент проводили в 11 биологических повторках.

Для исследования надземных частей растений *S. tuberosum* клубни высаживали в начале мая. Через 45 дней после посадки с использованием шприца без иглы проводили инфильтрацию листьев суспензиями клеток штаммов *P. versatilis* JN42 и *P. versatilis* VKE в 0,85 % NaCl плотностью $5 \cdot 10^8$ клеток на 1 мл. Площадь инфильтрации составляла примерно 1/10 часть конечной доли прерывисто-непарноперисто-рассеченного листа. Эксперимент проводили в 13 биологических повторках.

Плотность суспензий штаммов для инокуляции листьев и клубней растений картофеля различалась, так как для индукции реакции гиперчувствительности в листьях требуется значительно более высокая доза клеток патогена, чем для заражения клубней. Проявление симптомов в листьях происходит быстрее, чем в клубнях, поэтому учет результатов проводили в разное время: через 24 ч в листьях и через 48 ч в клубнях.

Измерение уровня экспрессии генов осуществляли методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Подбор референсных генов выполняли с помощью алгоритма *geNorm* (версия 3.5), расчет экспрессии по нескольким референсным генам и статистический анализ – с помощью программного обеспечения *REST 2009* (версия 2.0.13), округляя значения *p*-критерия до тысячных долей. В качестве референсных генов в листьях и клубнях растений картофеля были выбраны гены *CAC*, *SAND* и *EF1α*. Для измерения уровня экспрессии генов использованы олигонуклеотиды, перечисленные в табл. 1 (указаны идентификаторы генов сборки DM6.1 референсного генома дигиплоидной линии *S. tuberosum* DM1-3 516 R44 или идентификатор Национального центра биотехнологической информации (*National Centre for Biotechnology Information*, NCBI) в случае с геном *ERF13*, не аннотированным в сборке DM6.1).

Таблица 1

Список использованных олигонуклеотидов

Table 1

List of primers

Ген	Идентификатор	Продукт	Последовательность олигонуклеотидов (5'–3')
<i>CAC</i>	Soltu.DM.02G019690	Компонент клатрин-адаптерного комплекса	CCTCCGTTGTGATGTAACCTGG ATTGGTGGAAAGTAACATCATCG
<i>SAND</i>	Soltu.DM.01G025490	Белок с неизвестной функцией	TTGCTTGGAGGAACAGACG GCAAAACAGGACCCCTGAATC
<i>EF1α</i>	Soltu.DM.11G022490	Субъединица 1-альфа фактора элонгации	TTGATGCTCTTGACCAGATTAACG ACGGGCACAGTTCCAATACC

Окончание табл. 1
Ending of the table 1

Ген	Идентификатор	Продукт	Последовательность олигонуклеотидов (5'–3')
<i>AAO3</i>	Soltu.DM.11G024460	Оксидаза абсцизового альдегида	CTGATTCGCCAGGCACAAACA CACTGACAGCAGCGCCAAAG
<i>NCED3</i>	Soltu.DM.07G022620	9- <i>цис</i> -Эпоксикаротиноид- диоксигеназа	TGCTGAACCATGGCCAAAAGT ACCATCGTCTTCCTCCTTGCT
<i>CYP707a1</i>	Soltu.DM.08G003250	Гидроксилаза АБК	GGCAATGGGGTTCATCATGTC GCCACCATAGACCACCTGTA
<i>PR1b</i>	Soltu.DM.09G007030	Связанный с патогенезом белок 1b	GGGAGAAGCCAAACTACAATATG TTGCATGAAATGAACCACCATCC
<i>PR2</i>	Soltu.DM.01G019850	Эндо-1,3-β-глюкозидаза, изоформа 2	CTAATGCGGTGGTACAAGATGG TGACACAACAATTCCTACAGATCC
<i>PR5</i>	Soltu.DM.08G027300	Осмотин	ATTTGAGGTCCATAACAACGTGCC GCAATTAGTACGACCCCAATACG
<i>PR10a</i>	Soltu.DM.09G027690	Связанный с патогенезом белок семейства Bet v1	TATGAGTCAACAACCACAATTTCCC TGGACCACCTTCAACAAAGTTC
<i>HIN1</i>	Soltu.DM.10G025370	NDR1/HIN1-подобный белок	GCAACTGCATTTTCCAAATCATC CACGTAGAAATTGACCTTGTTAGG
<i>JAZ1</i>	Soltu.DM.07G012950	Негативный регулятор жасмонатзависимых генов	ATCGGAACCGGAAAAGGCAC AAGGTACTTTTGCAGTCAGCCT
<i>AP2.1</i>	Soltu.DM.01G020840	Белок с доменом AP2/ERF	GAAGGGTGTCCGTGTTTGGC TAGCAGGTGGTGATGGGACG
<i>ERF13</i>	XM_006347891	Этилензависимый транскрипционный фактор, подобный ERF13	AGTCAACAACACCTTTGGAGCA CCTTTTCTCTCGGGGTCCCT
<i>WRKY71</i>	Soltu.DM.12G028900	Транскрипционный фактор WRKY	TGTCCAGCAACTCTTAGGGGA GCCCGCAGAAGTAATGAGGAG

Для идентификации сайтов связывания исследуемых транскрипционных факторов с помощью алгоритма *BLAST* в базе данных CIS-BP [13] выполняли поиск наиболее близких гомологов с известными мотивами сайтов связывания. При наличии нескольких вариантов мотивов выбирали лучший по комбинации двух критериев – степени сходства транскрипционных факторов и информационного содержания мотива. Характеристики использованных мотивов приведены в табл. 2. Поиск сайтов связывания в промоторных областях выполняли с помощью алгоритма *MAST* [14] (версия 5.5.7) с параметрами по умолчанию.

Таблица 2

Мотивы сайтов связывания транскрипционных факторов

Table 2

Motif of transcription factor binding sites

Транскрипционный фактор	Гомолог	Идентификатор в базе данных CIS-BP	Информационное содержание, бит
AP2.1	A0A1D6I4Y7 (<i>Zea mays</i>)	M08630_3.00	15,2
ERF13	Q8L9K1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	M01697_3.00	14,6
WRKY71	Q93WV4 (<i>A. thaliana</i>)	M07779_3.00	15,1
MYC2	PK18474.1 (<i>Cannabis sativa</i>)	M01209_3.00	13,1

Результаты и их обсуждение

Реакция гиперчувствительности в листьях и мягкая гниль клубней растений *S. tuberosum*, вызываемые бактериями *P. versatile*. Инфильтрация листьев растений *S. tuberosum* суспензиями штаммов *P. versatile* JN42 (штамм дикого типа) и *P. versatile* VKE (*dspE*-мутант) индуцирует реакцию гиперчувствительности по всей зоне инфильтрации (рис. 1, а и в–д). Введение суспензий штаммов в клубни приводит к развитию мягкой гнили спустя 2 сут после заражения (рис. 1, б). Реакция растений картофеля на введение суспензий обоих штаммов (JN42 и VKE) четко отличается от их реакции на инфильтрацию 0,85 % NaCl (контроль), тогда как существенных фенотипических отличий в реакции растений на два использованных штамма в этой серии экспериментов не выявлено.

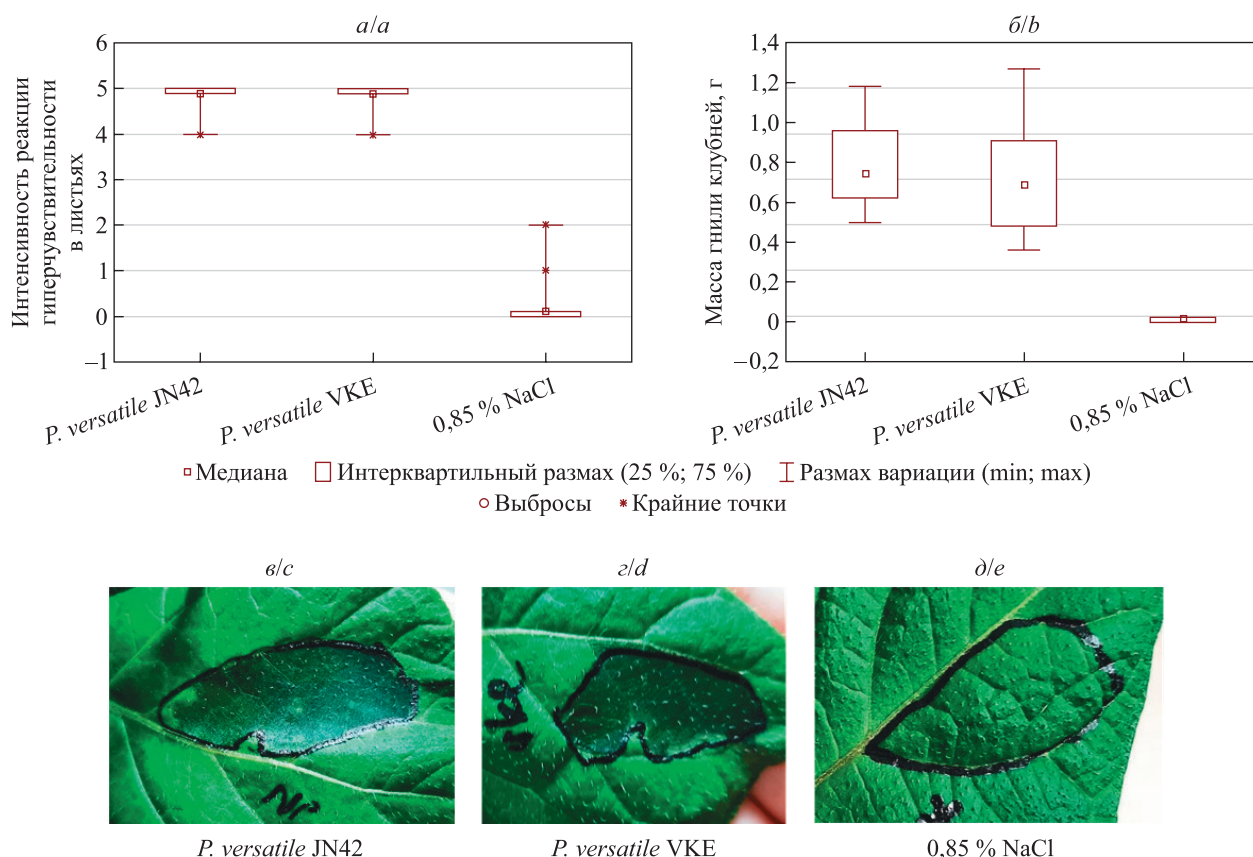


Рис. 1. Интенсивность реакции гиперчувствительности в листьях (а) и масса гнили клубней (б) растений *S. tuberosum* при внедрении бактерий *P. versatile* JN42 (штамм дикого типа) и *P. versatile* VKE (*dspE*-мутант). Фотографии типичной реакции в листьях растений картофеля на заражение патогеном (в–д). Различия по сравнению с контролем (0,85 % NaCl) в листьях достоверны при $p = 0,000\ 005$ для штамма дикого типа и $p = 0,000\ 012$ для *dspE*-мутанта, в клубнях – при $p = 0,000\ 003$ для штамма дикого типа и $p = 0,000\ 132$ для *dspE*-мутанта

Fig. 1. Intensity of the hypersensitivity reaction in leaves (a) and tuber rot weight (b) of *S. tuberosum* plants inoculated with *P. versatile* JN42 (wild-type strain) and *P. versatile* VKE (*dspE* mutant) bacteria.

Photographs of a typical reaction in potato plant leaves to pathogen infection (c–e).

Differences compared to the control (0.85 % NaCl) in leaves are significant at $p = 0.000\ 005$ for the wild-type strain and $p = 0.000\ 012$ for the *dspE* mutant, in tubers – at $p = 0.000\ 003$ for the wild-type strain and $p = 0.000\ 132$ for the *dspE* mutant

Разница в изменении экспрессии PR-генов при заражении бактериями *P. versatile* в листьях и клубнях растений *S. tuberosum*. В целом в листьях растений картофеля в ответ на внедрение патогена экспрессия PR-генов возрастает (рис. 2, а). Экспрессия гена *PR1b* конечного звена салицилатной сигнализации при заражении штаммом дикого типа повышается в 3,5 раза ($p = 0,000$), а при заражении *dspE*-мутантом возрастает десятикратно ($p = 0,000$) по сравнению с экспрессией данного гена в контрольных растениях. Экспрессия гена *PR2* β-глюкозидазы при заражении бактериями *P. versatile* JN42 и *P. versatile* VKE увеличивается в 15 раз ($p = 0,000$) и 39 раз ($p = 0,000$), экспрессия гена *PR5* осмотина – в 4 раза ($p = 0,000$) и 7 раз ($p = 0,000$), а экспрессия гена *PR10a* – в 2 раза ($p = 0,000$) и 7 раз ($p = 0,000$) соответственно.

В клубнях растений картофеля наблюдается иная картина (рис. 2, б). В ответ на заражение бактериями *P. versatile* ген защитного белка PR1b снижает свою экспрессию в среднем в 250 раз ($p = 0,001$) при использовании штамма дикого типа и только в 6 раз ($p = 0,001$) при использовании мутантного штамма. Экспрессия гена PR2 при внедрении бактерий *P. versatile* JN42 и *P. versatile* VKE индуцируется в 37 раз ($p = 0,009$) и 23 раза ($p = 0,011$), а экспрессия гена PR5 – в 16 раз ($p = 0,008$) и 9 раз ($p = 0,009$) соответственно. Ген защитного белка PR10a при заражении бактериями *P. versatile* снижает свою экспрессию в диапазоне от 5 раз ($p = 0,001$) до 8 раз ($p = 0,003$).

Экспрессия гена харпининдуцируемого белка HIN1 (часто рассматриваемого как еще один PR-ген) сильно индуцируется при заражении клубней (в диапазоне от 53 раз ($p = 0,004$) при внедрении мутантного штамма до 84 раз ($p = 0,011$) при внедрении штамма дикого типа), однако в листьях такой сильной индукции не наблюдается: достоверная разница (в 1,8 раза ($p = 0,000$)) выявлена лишь при заражении бактериями *P. versatile* JN42.

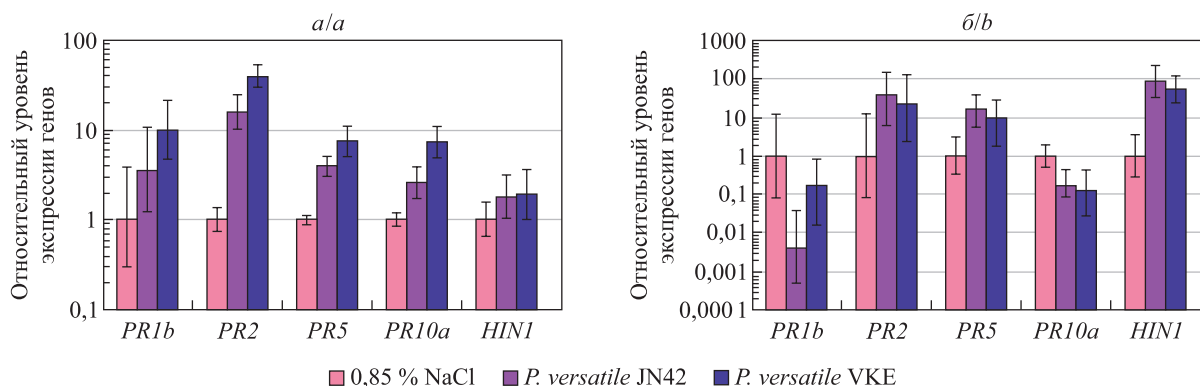


Рис. 2. Изменение уровня экспрессии PR-генов в листьях (а) и клубнях (б) растений *S. tuberosum* в ответ на внедрение бактерий *P. versatile* JN42 (штамм дикого типа) и *P. versatile* VKE (*dspE*-мутант) по сравнению с уровнем их экспрессии в контрольных растениях (0,85 % NaCl).

Указаны средние значения с 95 % доверительным интервалом

Fig. 2. Changes in PR gene expression level in leaves (a) and tubers (b) of *S. tuberosum* plants in response to the introduction of *P. versatile* JN42 (wild-type strain) and *P. versatile* VKE (*dspE* mutant) bacteria compared to their expression level in control plants (0.85 % NaCl).

Mean values with 95 % confidence intervals are shown

Можно предположить, что экспрессия исследуемых PR-генов зависит от сигнальных путей, контролируемых разными гормонами. Однако результаты опубликованных исследований неоднозначны и противоречивы, что может быть связано как с особенностями конкретных патосистем, так и с описанием под одним названием разных (неортологических) изоформ PR-генов. В ходе анализа доступных данных для наиболее вероятных ортологов (идентифицированных методом взаимного лучшего попадания) рассматриваемых в настоящей работе генов установлены следующие закономерности.

Белок PR1b был выявлен как один из мажорных внеклеточных белков листьев растений картофеля, зараженных патогеном *Phytophthora infestans* [15]. Экспрессия гена PR1b достигала максимума через 36 ч после заражения *P. infestans* и через 48 ч после заражения *P. syringae*, салицилат и жасмонат не влияли на уровень экспрессии, тогда как раны и этилен вызывали накопление мРНК гена PR1b через 72 ч [15]. Ортолог данного PR-гена у томата (называемый также у этого растения P6 и P14a) ингибирует сигнальную цепочку активации программируемой гибели клеток [16; 17].

Экспрессия гена PR10a в листьях растений томата индуцируется при заражении бактериями *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, причем инактивация гена основного эффектора данного патогена (XopN) усиливает эту индукцию, как и в зафиксированном нами случае с эффектором *P. versatile* [18]. Обработка растений томата салициловой кислотой индуцирует экспрессию гена PR10a (*TSI-1*) [19].

Ген HIN1, охарактеризованный у растений *S. tuberosum* как ген *StPOTHR1* устойчивости к патогену *P. infestans* и индуцирующийся при заражении этим патогеном [20; 21], в проведенном нами эксперименте имеет паттерн экспрессии, аналогичный таковому генов PR2 и PR5, но согласно данным опубликованного транскриптомного исследования (NCBI BioProject PRJNA851775) сильно индуцируется при раневом ответе, что характерно для жасмонатзависимых генов.

В патосистеме *S. lycopersicum* – *Ralstonia solanacearum* происходит рост экспрессии генов PR1b, PR2 и PR5 при увеличении в растении концентрации салициловой кислоты [17]. В растениях картофеля при заражении некротрофным патогеном *Rhizoctonia solani* повышение уровня экспрессии гена PR2 связано с жасмонат- и этилензависимым сигнальным путем [20].

Для ортолога гена *PR2* в суспензионной культуре клеток *Nicotiana tabacum* показана репрессия транскрипции при добавлении АБК [22]. В растениях *A. thaliana* не только продемонстрирована АБК-зависимая транскрипционная регуляция данной изоформы гена *PR2*, но и подтверждена роль ферментативной β -1,3-глюканазной активности продукта этого гена в деградации каллозы, являющейся протекторным β -глюканом, откладываемым растениями вокруг очага первичной инфекции [23].

Поскольку характер экспрессии *PR*-генов существенно отличался в двух исследованных органах, а данные литературы содержали противоречивую информацию о регуляции этих генов, была проведена оценка уровня экспрессии маркерных генов основных гормональных путей.

Дифференциальная экспрессия генов метаболизма АБК, указывающая на снижение концентрации активной формы гормона при заражении бактериями *P. versatile* и в листьях, и в клубнях растений *S. tuberosum*. В листьях растений картофеля в ответ на заражение штаммом *P. versatile* JN42 в 3,4 раза ($p = 0,000$) уменьшается экспрессия гена *NCED3* 9-цис-эпоксикаротиноиддиоксигеназы – фермента, отвечающего за биосинтез АБК (рис. 3, а). При внедрении штамма *P. versatile* VKE достоверного снижения уровня экспрессии этого гена не наблюдается. Экспрессия гена *AAO3* оксидазы абсцизового альдегида уменьшается незначительно. В 3 раза ($p = 0,000$) возрастает экспрессия гена *CYP707a1* гидроксилазы АБК, переводящей АБК в неактивную форму, при инфицировании бактериями дикого типа. Большие доверительные интервалы не позволяют говорить о достоверном изменении уровня экспрессии данного гена в случае заражения мутантным штаммом.

В клубнях растений картофеля вызываемый патогеном эффект более выражен (рис. 3, б). Так, уровень экспрессии гена *NCED3* снижается в 9 раз ($p = 0,002$) при заражении штаммом дикого типа и в 4 раза ($p = 0,000$) при заражении *dspE*-мутантом. Экспрессия гена *AAO3* уменьшается примерно в 50 раз ($p = 0,000$) и 43 раза ($p = 0,001$), а экспрессия гена *CYP707a1* возрастает в 33 раза ($p = 0,001$) и 22 раза ($p = 0,000$) при инфицировании штаммами *P. versatile* JN42 и *P. versatile* VKE соответственно.

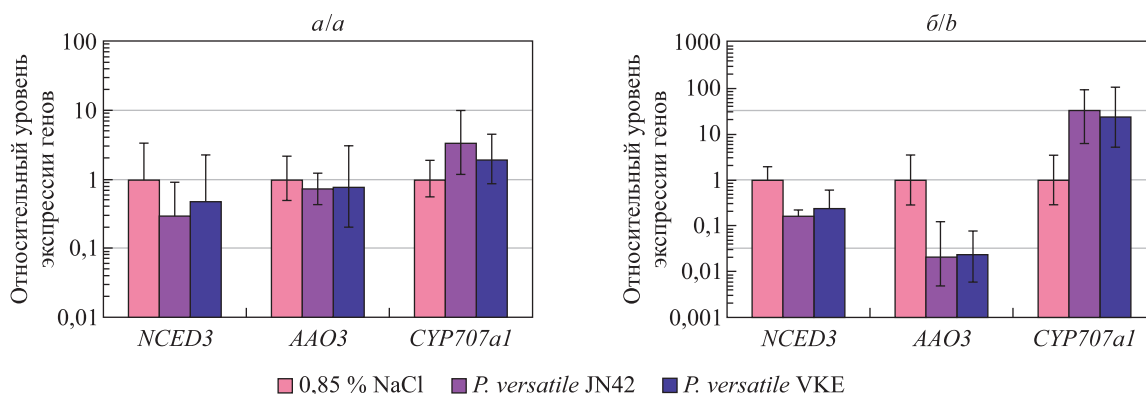


Рис. 3. Изменение уровня экспрессии генов метаболизма АБК в листьях (а) и клубнях (б) растений *S. tuberosum* в ответ на внедрение бактерий *P. versatile* JN42 (штамм дикого типа) и *P. versatile* VKE (*dspE*-мутант) по сравнению с уровнем их экспрессии в контрольных растениях (0,85 % NaCl).

Указаны средние значения с 95 % доверительным интервалом

Fig. 3. Changes in the expression level of abscisic acid metabolism genes in leaves (a) and tubers (b) of *S. tuberosum* plants in response to the introduction of *P. versatile* JN42 (wild-type strain) and *P. versatile* VKE (*dspE* mutant) bacteria compared to their expression level in control plants (0.85 % NaCl). Mean values with 95 % confidence intervals are shown

Таким образом, зафиксировано более выраженное изменение уровня экспрессии генов метаболизма АБК в клубнях растений картофеля, однако направленность их экспрессии в обоих органах сходная. Можно предположить, что и в клубнях, и в листьях количество активной формы АБК уменьшается при заражении патогеном, а значит, сигнальный путь АБК подавляется. Это обстоятельство может приводить к снижению иммунитета, еще более сильной активации гниения клубней и индукции реакции гиперчувствительности в листьях, что только способствует развитию некротрофного бактериального патогена [24]. Примечательно, что в патосистеме с участием биотрофного фитопатогена *R. solanacearum* в корнях чувствительного варианта растений дикого вида картофеля *S. commersonii* отмечалось подавление экспрессии гена *CYP707a1* гидроксилазы АБК [25]. Увеличение количества АБК также негативно сказывалось на устойчивости растения табака к этому же патогену [26]. Все вышеперечисленное указывает на неоднозначную роль АБК в устойчивости растений к различным бактериальным фитопатогенам.

Подавление жасмонатной сигнализации при заражении бактериями *P. versatile* надземных и подземных тканей растений картофеля. В листьях растений картофеля при внедрении бактерий *P. versatile* JN42 и *P. versatile* VKE экспрессия гена негативного регулятора жасмонатзависимых генов *JAZ1* возрастает

ет в 3,0 раза ($p = 0,000$) и 6,7 раза ($p = 0,000$) соответственно (рис. 4, а). В инфицированных клубнях растений картофеля уровень экспрессии гена *JAZ1* повышается в 13 раз ($p = 0,004$) и 7 раз ($p = 0,026$) (рис. 4, б).

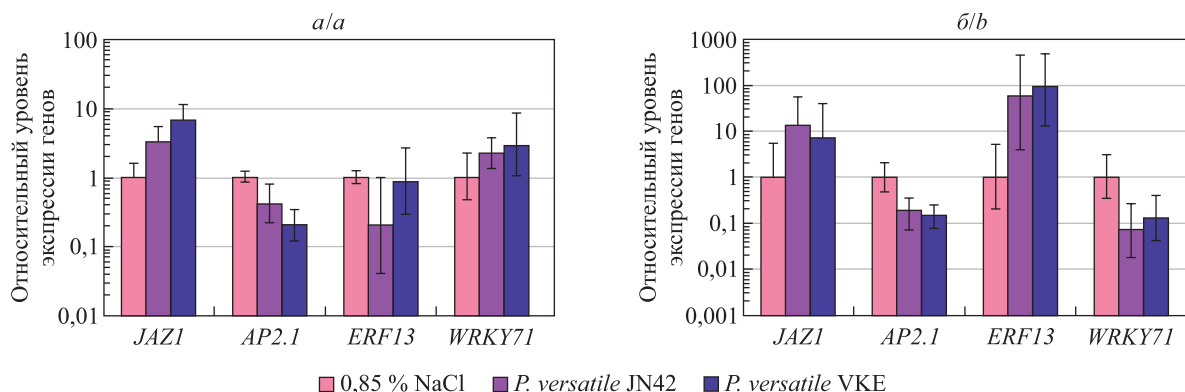


Рис. 4. Изменение уровня экспрессии генов транскрипционных факторов в листьях (а) и клубнях (б) растений *S. tuberosum* в ответ на внедрение бактерий *P. versatile* JN42 (штамм дикого типа) и *P. versatile* VKE (*dspE*-мутант) по сравнению с уровнем их экспрессии в контрольных растениях (0,85 % NaCl). Указаны средние значения с 95 % доверительным интервалом

Fig. 4. Changes in the expression level of transcription factor genes in leaves (a) and tubers (б) of *S. tuberosum* plants in response to the introduction of *P. versatile* JN42 (wild-type strain) and *P. versatile* VKE (*dspE* mutant) bacteria compared to their expression level in control plants (0.85 % NaCl). Mean values with 95 % confidence intervals are shown

Индукция гена *JAZ1* была зафиксирована в патосистеме *S. tuberosum* – *Dickeya solani* на ранних этапах заражения (через 1 ч), что может свидетельствовать о схожей реакции растений на внедрение некротрофных фитопатогенов [27].

Разница в регуляции транскрипционных факторов этиленовой сигнализации в листьях и клубнях растений *S. tuberosum* при заражении бактериями *P. versatile*. В листьях растений картофеля при инфицировании бактериями *P. versatile* JN42 и *P. versatile* VKE происходит снижение экспрессии гена транскрипционного фактора этиленовой сигнализации *AP2.1* примерно в 2,4 раза ($p = 0,000$) и 5,0 раза ($p = 0,000$) соответственно (см. рис. 4, а). Экспрессия гена другого транскрипционного фактора этого семейства – *ERF13* – при заражении штаммом дикого типа уменьшается в 5 раз ($p = 0,000$), а при заражении *dspE*-мутантом не снижается.

В клубнях растений картофеля экспрессия гена *AP2.1* при внедрении патогена меняется схожим образом: снижается примерно в 5 раз ($p = 0,005$) и 6 раз ($p = 0,003$) при инфицировании штаммами *P. versatile* JN42 и *P. versatile* VKE соответственно (см. рис. 4, б). Однако экспрессия гена *ERF13*, в отличие от реакции в тканях листьев, в тканях клубней, наоборот, возрастает в 59 раз ($p = 0,018$) при заражении штаммом дикого типа и в 94 раза ($p = 0,005$) при заражении *dspE*-мутантом.

Ген транскрипционного фактора *WRKY71* в листьях индуцируется примерно в 2 раза ($p = 0,000$) при внедрении патогена *P. versatile* JN42 (см. рис. 4, а), в то время как в клубнях его экспрессия, наоборот, снижается приблизительно в 14 раз ($p = 0,001$) при инфицировании штаммом дикого типа и в 8 раз ($p = 0,002$) при инфицировании мутантным штаммом бактерий (см. рис. 4, б).

Участие данных генов или их ортологов в растительном иммунитете слабо изучено. Транскрипционный фактор *SlWRKY71* активирует фермент *SIDCD1*, который стимулирует эндогенную продукцию H_2S , тем самым повышая устойчивость листьев к *P. syringae* pv. DC3000 [28].

Анализ сайтов связывания транскрипционных факторов, предполагающий перекрестную сигнализацию между гормонзависимыми сигнальными путями. Для оценки участия четырех исследуемых транскрипционных факторов выполнен анализ их потенциальных сайтов связывания в пределах 1000 пар нуклеотидов перед кодирующей последовательностью. Поскольку транскрипционные факторы семейства JAZ не связываются непосредственно с ДНК, а действуют, формируя комплекс с ДНК-связывающими транскрипционными факторами семейства MYC2 [29], для оценки жасмонатзависимой транскрипционной регуляции использован представитель последнего семейства (идентификатор M1BHA0 в базе данных UniProt), взаимодействующий с белком *JAZ1* по данным веб-ресурса KEGG.

Сайты связывания хотя бы одного транскрипционного фактора выявлены в промоторных областях всех исследуемых генов, за исключением генов *PR10a* и *ERF13* (табл. 3). Несмотря на не самые надежные

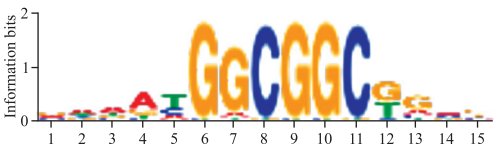
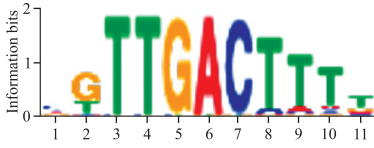
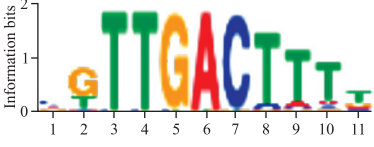
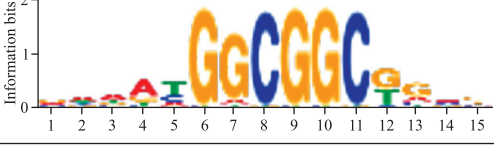
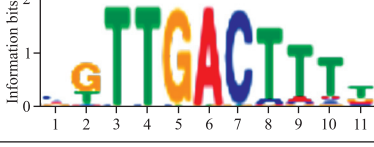
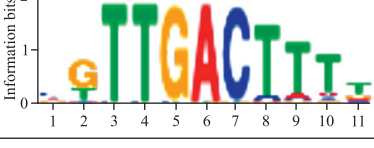
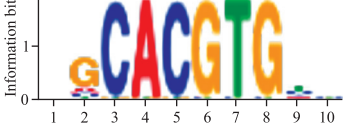
значения *p*-критерия, заслуживают внимания и дальнейшего экспериментального исследования следующие наблюдения. Идентификация сайтов связывания транскрипционного фактора WRKY71 перед своим собственным геном и транскрипционного фактора MYC2 перед геном *JAZ1* соответствует известным данным об их авторегуляции и подчеркивает корректность использованного метода анализа [25; 26]. Транскрипционный фактор ERF13 имеет сайт связывания в промоторной области гена *PR1b*, а паттерны экспрессии генов *ERF13* и *PR1b* совпадают и зависят от белка DspE. Для генов метаболизма АБК актуальна этилензависимая сигнализация с помощью транскрипционных факторов семейства AP2: прямая сигнализация через транскрипционный фактор AP2.1 для гена *AAO3* или сигнализация посредством потенциального транскрипционного каскада ERF13 → MYC2 для генов *NCED3* и *CYP707a1*. Сигнализация через транскрипционный фактор WRKY71 может быть связана с индукцией при контакте с пектобактериями генов *PR2*, *PR5* и *HIN1*. Наконец, расположение сайтов связывания свидетельствует о взаимосвязях между этилензависимой и салицилатзависимой, а также между этилензависимой и жасмонатзависимой сигнализацией.

Таблица 3

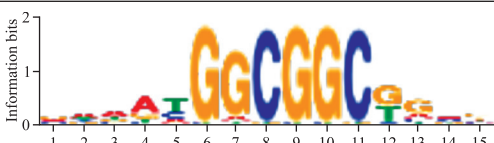
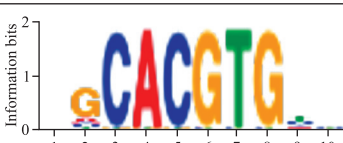
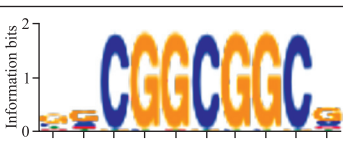
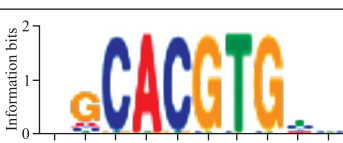
Сайты связывания транскрипционных факторов в промоторных областях исследуемых генов

Table 3

Binding sites of transcription factors in the promoter regions of the studied genes

Ген	Транскрипционный фактор	Логотип мотива	Число сайтов	Лучший сайт связывания	
				Последовательность олигонуклеотидов	Значение <i>p</i> -критерия
<i>PR1b</i>	ERF13		1	TTTAGGGCGGCTCAA	0,000 079
<i>PR2</i>	WRKY71		1	CTTTGACTTGA	0,000 053
<i>PR5</i>	WRKY71		1	AGTTGACTAAT	0,000 063
	ERF13		1	ATCTAGGCGGCTATA	0,000 087
<i>HIN1</i>	WRKY71		1	GATTGACTTTT	0,000 023
<i>JAZ1</i>	WRKY71		1	CGTTAACTTTT	0,000 095
	MYC2		1	AACACGTGTT	0,000 047

Окончание табл. 3
Ending of the table 3

Ген	Транскрипционный фактор	Логотип мотива	Число сайтов	Лучший сайт связывания	
				Последовательность олигонуклеотидов	Значение <i>p</i> -критерия
<i>AP2.1</i>	WRKY71		1	CTTTGACTTAT	0,000 011
<i>WRKY71</i>	WRKY71		3	ATTTGACTATT	0,000 029
<i>MYC2</i>	ERF13		1	TAATCGTCGGCTGCG	0,000 050
<i>NCED3</i>	MYC2		1	AACACGTGGT	0,000 056
<i>AAO3</i>	AP2.1		1	CCCCGCCGCC	0,000 030
<i>CYP707a1</i>	MYC2		1	TACACGTGCC	0,000 0079
<i>ERF13</i>	—	—	0	—	—
<i>PR10a</i>	—	—	0	—	—

Два из пяти проверенных *PR*-генов – *PR1b* и *PR10a* – при заражении бактериями *P. versatile* показали разнонаправленные изменения экспрессии в исследованных органах растений картофеля: индукцию в листьях, но репрессию в клубнях. Такой эффект может быть связан с особенностями гормональной регуляции в этих органах, поэтому интерес представляют выявленные изменения уровня экспрессии маркерных генов гормональной сигнализации. Все четыре гена транскрипционных факторов, являющихся конечными звеньями гормонзависимых сигнальных путей, демонстрируют отличия экспрессии в листьях и клубнях, однако два из них – *ERF13* и *WRKY71* – имеют противоположный характер экспрессии. Ген *ERF13* репрессируется в листьях, но индуцируется в клубнях, тогда как ген *WRKY71*, наоборот, индуцируется в листьях (только при заражении штаммом дикого типа) и репрессируется в клубнях. Из-за несовпадения DspE-зависимых паттернов экспрессии генов *ERF13* и *PR1b* связать их между собой нельзя, однако характеры экспрессии генов *WRKY71* и *PR10a* довольно хорошо совпадают, что позволяет рассматривать предположение о возможности регуляции экспрессии гена *PR10a* с помощью транскрипционного фактора WRKY71. Снижение экспрессии гена *WRKY71* в клубнях картофеля ранее было отмечено при заражении другим некротрофным патогеном из семейства *Pectobacteriaceae* – *D. solani* [27]. Ортолог этого гена у *A. thaliana* индуцируется перекисью водорода, АБК и гиперосмотическим стрессом [30; 31].

Заключение

В листьях и клубнях растений картофеля при заражении бактериями *P. versatile* отмечено снижение уровня экспрессии генов, контролирующих синтез АБК, и одновременно повышение уровня экспрессии

генов, контролирующих ее инактивацию, что позволяет говорить о высокой вероятности уменьшения концентрации активной формы АБК при инфицировании этим патогеном как надземных, так и подземных частей растения. Также повсеместно зарегистрировано подавление жасмонатной сигнализации.

Кроме того, при инфицировании тканей картофеля значительно изменяется уровень экспрессии этилензависимых транскрипционных факторов. Как и транскрипционные факторы с доменом AP2, транскрипционный фактор WRKY71 по-разному регулирует иммунный ответ в надземной и подземной частях растений картофеля.

Интересно, что ранее опубликованные данные об экспрессии маркерных генов у других растений семейства пасленовых отличаются от результатов, полученных в настоящей работе при внедрении бактерий *P. versatile* в растение картофеля. Так, у томата сорта Микро-Том при заражении этим патогеном наблюдается DspE-зависимая репрессия генов *NCED3* и *CYP707a1*, а экспрессия гена *AAO3* возрастает при инфицировании любым из штаммов. Экспрессия генов *PR2* и *PR5* при внедрении патогена не меняется [32]. В то же время для томата сорта Доходный и ортологов генов *PR1b*, *PR2* и *PR5* табака *N. benthamiana* наблюдается увеличение экспрессии вне зависимости от штамма [3]. Однако стоит отметить, что в клубнях дикого картофеля *S. bulbocastanum* паттерн экспрессии генов совпадает с тем, который наблюдается в настоящем исследовании, и почти подобен ему в надземной части растения, за исключением двух генов – *NCED3* и *AP2.1* [5].

Таким образом, каждая патосистема является уникальной и должна рассматриваться отдельно, а гормональная регуляция имеет особенности для каждого вида и обобщению не подлежит. Понимание таких сложных систем может стать ключом к эффективной борьбе с патогеном.

Библиографические ссылки

1. Бабицкая ЕВ, Песнякевич АГ, Николайчик ЕА. Характеристика мутантов бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 3-2 с нарушенной секрецией пектатлиазы. *Прикладная биохимия и микробиология*. 1995;31(4):447–452. EDN: OSSJID.
2. Hogan CS, Mole BM, Grant SR, Willis DK, Charkowski AO. The type III secreted effector DspE is required early in *Solanum tuberosum* leaf infection by *Pectobacterium carotovorum* to cause cell death, and requires Wx_(3–6)D/E motifs. *PLoS One*. 2013;8(6):e65534. DOI: 10.1371/journal.pone.0065534.
3. Бадалян ОА, Николайчик ЕА. Рецепторподобные киназы RLK2 и RLK5 *Nicotiana benthamiana* участвуют в регуляции экспрессии генов ключевых компонентов иммунной системы растения при контакте с *Pectobacterium carotovorum*. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 2014;4:75–80. EDN: TRPIQT.
4. Бадалян ОА, Николайчик ЕА. Участие MAP-киназ WIPK и SIPK растений *Nicotiana benthamiana* в детекции фитопатогена *Pectobacterium carotovorum*. *Доклады Национальной академии наук Беларуси*. 2013;57(6):75–81. EDN: WIQWTH.
5. Колубако АВ, Николайчик ЕА. Транскрипционный фактор WRKY65 участвует в регуляции иммунного ответа растений картофеля на *Pectobacterium versatile*. *Молекулярная и прикладная генетика*. 2021;31:83–92. DOI: 10.47612/1999-9127-2021-31-83-92.
6. Coleman WK, King RR. Changes in endogenous abscisic acid, soluble sugars and proline levels during tuber dormancy in *Solanum tuberosum* L. *American Potato Journal*. 1984;61(8):437–449. DOI: 10.1007/BF02852813.
7. Wang Z, Ma R, Zhao M, Wang F, Zhang N, Si H. NO and ABA interaction regulates tuber dormancy and sprouting in potato. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11:311. DOI: 10.3389/fpls.2020.00311.
8. Tosetti R, Waters A, Chope GA, Cools K, Alamar MC, McWilliam S, et al. New insights into the effects of ethylene on ABA catabolism, sweetening and dormancy in stored potato tubers. *Postharvest Biology and Technology*. 2021;173:111420. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2020.111420.
9. Han Xiaozhen, Shao Shuai, Han Xiaocui, Zhang Yurong. Preparation and characterization of methyl jasmonate microcapsules and their preserving effects on postharvest potato tuber. *Molecules*. 2022;27(15):4728. DOI: 10.3390/molecules27154728.
10. Kolachevskaya OO, Lomin SN, Arkhipov DV, Romanov GA. Auxins in potato: molecular aspects and emerging roles in tuber formation and stress resistance. *Plant Cell Reports*. 2019;38(6):681–698. DOI: 10.1007/s00299-019-02395-0.
11. Engelbrecht L, Bielińska-Czarnecka M. Increase of cytokinin activity in potato tubers near the end of dormancy. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 1972;163(5):499–504. DOI: 10.1016/S0015-3796(17)31276-3.
12. Alexopoulos AA, Aivalakis G, Akoumianakis KA, Passam HC. Effect of gibberellic acid on the duration of dormancy of potato tubers produced by plants derived from true potato seed. *Postharvest Biology and Technology*. 2008;49(3):424–430. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2008.02.009.
13. Weirauch MT, Yang A, Albu M, Cote AG, Alejandro Montenegro-Montero A, Drewe P, et al. Determination and inference of eukaryotic transcription factor sequence specificity. *Cell*. 2014;158(6):1431–1443. DOI: 10.1016/j.cell.2014.08.009.
14. Bailey TL, Gribskov M. Combining evidence using *p*-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics*. 1998;14(1):48–54. DOI: 10.1093/bioinformatics/14.1.48.
15. Hoegen E, Strömberg A, Pihlgren U, Kombrink E. Primary structure and tissue-specific expression of the pathogenesis-related protein PR-1b in potato. *Molecular Plant Pathology*. 2002;3(5):329–345. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2002.00126.x.
16. Lincoln JE, Sanchez JP, Zumstein K, Gilchrist DG. Plant and animal PR1 family members inhibit programmed cell death and suppress bacterial pathogens in plant tissues. *Molecular Plant Pathology*. 2018;19(9):2111–2123. DOI: 10.1111/mpp.12685.
17. Reichardt S, Reppe D, Tuzhikov AI, Galiullina RA, Planas-Marquès M, Chichkova NV, et al. The tomato subtilase family includes several cell death-related proteinases with caspase specificity. *Scientific Reports*. 2018;8:10531. DOI: 10.1038/s41598-018-28769-0.
18. Hotson A, Chosed R, Shu H, Orth K, Mudgett MB. *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Molecular Microbiology*. 2003;50(2):377–389. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03730.x.

19. Vidya CSS, Manoharan M, Sita GL. Cloning and characterization of salicylic acid-induced, intracellular pathogenesis-related gene from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Biosciences*. 1999;24(3):287–293. DOI: 10.1007/BF02941242.
20. Tian Z-D, Liu J, Xie C-H, Song B-T. Cloning of potato *POTHR-1* gene and its expression in response to infection by *Phytophthora infestans* and other abiotic stimuli. *Acta Botanica Sinica*. 2003;45(8):959–965.
21. Chen Q, Tian Z, Jiang R, Zheng X, Xie C, Liu J. *StPOTHR1*, a NDR1/HIN1-like gene in *Solanum tuberosum*, enhances resistance against *Phytophthora infestans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;496(4):1155–1161. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.01.162.
22. Rezzonico E, Flury N, Meins F Jr, Beffa R. Transcriptional down-regulation by abscisic acid of pathogenesis-related β -1,3-glucanase genes in tobacco cell cultures. *Plant Physiology*. 1998;117(2):585–592. DOI: 10.1104/pp.117.2.585.
23. Oide S, Bejai S, Staal J, Guan N, Kaliff M, Dixelius C. A novel role of PR2 in abscisic acid (ABA) mediated, pathogen-induced callose deposition in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 2013;200(4):1187–1199. DOI: 10.1111/nph.12436.
24. Deb A, Kundu S. Deciphering cis-regulatory element mediated combinatorial regulation in rice under blast infected condition. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137295. DOI: 10.1371/journal.pone.0137295.
25. Zuluaga AP, Solé M, Lu H, Góngora-Castillo E, Vaillancourt B, Coll N, et al. Transcriptome responses to *Ralstonia solanacearum* infection in the roots of the wild potato *Solanum commersonii*. *BMC Genomics*. 2015;16(1):246. DOI: 10.1186/s12864-015-1460-1.
26. Zhou J, Zhang H, Yang Y, Zhang Z, Zhang H, Hu X, et al. Abscisic acid regulates TSRF1-mediated resistance to *Ralstonia solanacearum* by modifying the expression of GCC box-containing genes in tobacco. *Journal of Experimental Botany*. 2008;59(3):645–652. DOI: 10.1093/jxb/erm353.
27. Hadizadeh I, Peivastegan B, Wang J, Sipari N, Nielsen KL, Pirhonen M. Gene expression and phytohormone levels in the asymptomatic and symptomatic phases of infection in potato tubers inoculated with *Dickeya solani*. *PLoS One*. 2022;17(8):e0273481. DOI: 10.1371/journal.pone.0273481.
28. Zhao Y-Q, Sun C, Hu K-D, Yu Y, Liu Z, Song Y-C, et al. A transcription factor SIWRKY71 activated the H₂S generating enzyme *SIDCD1* enhancing the response to *Pseudomonas syringae* pv. DC3000 in tomato leaves. *New Phytologist*. 2025;246(1):262–279. DOI: 10.1111/nph.20431.
29. Major IT, Yoshida Y, Campos ML, Kapali G, Xin X-F, Sugimoto K, et al. Regulation of growth – defense balance by the jasmonate ZIM-domain (JAZ)-MYC transcriptional module. *New Phytologist*. 2017;215(4):1533–1547. DOI: 10.1111/nph.14638.
30. Yu Y, Wang L, Chen J, Liu Z, Park C-M, Xiang F. WRKY71 acts antagonistically against salt-delayed flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*. 2018;59(2):414–422. DOI: 10.1093/pcp/pcx201.
31. Степанова ЕС, Кукреш ГВ, Николайчик ЕА, Колубако АВ. 9-цис-Эпоксикаротиноиддиоксигеназа как переключатель связанных с иммунитетом сигнальных путей растений *Solanum lycopersicum*. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024;2:63–71. EDN: NYDQXM.
32. Николайчик ЕА. Системная индукция PR-генов растений *Solanum lycopersicum* при контакте с бактериями *Pectobacterium carotovorum*: роль гена *dspE*. *Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*. 2009;4(2):215–220. EDN: KBBFCF.

Получена 03.04.2025 / исправлена 27.09.2025 / принята 04.10.2025.
Received 03.04.2025 / revised 27.09.2025 / accepted 04.10.2025.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 579.222.3

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РОСТ КУЛЬТУРЫ ДРОЖЖЕЙ *DOTHIORA* sp. БИМ Y-383 И СИНТЕЗ МЕЛАНИНА

Е. А. ГРИБАНОВА¹⁾, В. П. КУРЧЕНКО¹⁾,
И. И. АЗАРКО¹⁾, В. Е. МЯМИН¹⁾

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

Аннотация. Исследовано влияние температур 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °С на рост дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 в течение 16 сут культивирования. Показано, что дрожжи относятся к психротолерантным микроорганизмам с оптимальным ростом культуры и синтезом меланина при 22–28 °С. Наиболее интенсивно процесс меланиногенеза происходит на стадии отмирания культуры дрожжей. С использованием спектральных методов анализа установлено, что на 16-е сутки культивирования содержание меланина в экстрактах из сублимированного мицелия дрожжей, выращенных при температурах 10; 18; 22; 28 и 32 °С, составило (23,0 ± 0,5) мг/г, (39,0 ± 0,8) мг/г, (62,3 ± 1,2) мг/г, (69,0 ± 1,4) мг/г и (45,1 ± 0,9) мг/г соответственно.

Ключевые слова: меланин; электронный парамагнитный резонанс; ЭПР; электронная спектроскопия; *Dothiora* sp.; меланиногенез.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект «Производство биологически активных веществ психрофильными дрожжами, выделенными из образцов почв Восточной Антарктиды», № гос. регистрации 20231168), а также в рамках государственной программы научных исследований «Конвергенция-2025» (задание 2.2.02.3).

Образец цитирования:

Грибанова ЕА, Курченко ВП, Азарко ИИ, Мямин ВЕ. Влияние температуры на рост культуры дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 и синтез меланина. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2025;3:74–87.
EDN: LZTBJC

For citation:

Gribanova EA, Kurchenko VP, Azarko II, Miamin VE. Influence of temperature on the growth of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast culture and melanin synthesis. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2025;3:74–87. Russian.
EDN: LZTBJC

Сведения об авторах см. на с. 87.

Information about the authors see p. 87.

INFLUENCE OF TEMPERATURE ON THE GROWTH OF *DOTHIORA* sp. BIM Y-383 YEAST CULTURE AND MELANIN SYNTHESIS

E. A. GRIBANOVA^a, V. P. KURCHENKO^a,
I. I. AZARKO^a, V. E. MIAMIN^a

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

Corresponding author: E. A. Gribanova (gribanova@bsu.by)

Abstract. The effect of temperatures of 10; 18; 22; 28; 32 and 37 °C on the growth of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast over 16 days of cultivation was studied. The yeast was shown to be psychrotolerant microorganisms with optimal culture growth and melanin synthesis at 22–28 °C. Melaninogenesis is most intense during the yeast culture death stage. Using spectral methods of analysis, it was established that on the 16th day of cultivation, the melanin content in extracts from freeze-dried yeast mycelium grown at temperatures of 10; 18; 22; 28 and 32 °C was (23.0 ± 0.5) mg/g, (39.0 ± 0.8) mg/g, (62.3 ± 1.2) mg/g, (69.0 ± 1.4) mg/g and (45.1 ± 0.9) mg/g, respectively.

Keywords: melanin; electron paramagnetic resonance; EPR; electron spectroscopy; *Dothiora* sp.; melaninogenesis.

Acknowledgements. This work was carried out with financial support from the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project «Production of biologically active substances by psychrophilic yeast isolated from soil samples of East Antarctica», state registration No. 20231168), as well as within the framework of the state programme of scientific research «Convergence-2025» (assignment 2.2.02.3).

Введение

Антарктида находится в одной из наиболее суровых климатических зон планеты. Низкие температуры, минимальные годовые осадки, регулярные циклы замерзания и оттаивания, сильные ветры, высокий уровень ультрафиолетового излучения, наличие процессов сублимации и испарения, дефицит питательных веществ – все эти условия являются значительными ограничивающими факторами для поддержания жизнедеятельности организмов [1; 2]. К защитным механизмам, которые помогают организмам сохранять метаболическую активность при низких температурах, относится синтез криопротекторов, ферментов, активных при низких температурах, и фотозащитных веществ (каротиноидов, микоспоринов, меланинов), а также высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот в составе цитоплазматических мембран [3–7].

В Антарктиде были обнаружены и описаны дрожжи черного цвета, представляющие собой полифилетическую морфоэкологическую группу грибов, которые относятся либо к порядку Chaetothyriales из класса Eurotiomycetes, либо к классу Dothideomycetes (отдел Ascomycota, подотдел Pezizomycotina) [8]. Класс аскомицетов Dothideomycetes более многочисленный: он насчитывает около 19 000 видов, которые встречаются по всему миру в наземных, пресноводных и морских местообитаниях. Представители данного класса являются симбиотрофами, сапробионтами, фитопатогенами, микопаразитами, эпифитами, эндофитами, эктофитами. Они могут обитать на различных субстратах (например, на поверхности горных пород) и выдерживать экстремальные климатические условия [9]. Так, грибы рода *Dothiora* были выделены из образцов темного льда Гренландского ледникового щита [10] и песчаника из долины Алатна (Антарктида) [9]. Одним из ключевых факторов, обеспечивающих защиту этих микроорганизмов от экстремальных условий окружающей среды, является способность синтезировать меланины.

Меланины – это темно-коричневые либо черные пигменты полимерной природы, образующиеся в результате окисления фенольных и (или) индольных соединений. Данные пигменты широко распространены в организмах животных, растений и микроорганизмов. По химическому строению они классифицируются на феомеланин, зумеланин, пиомеланин и др. На рис. 1 представлены структурные формулы возможных мономеров этих меланинов. Для сравнения приведена известная структурная формула синтетического меланина, полученного путем ферментативного окисления L-3,4-дигидроксифенилаланина (L-ДОФА). Как следует из рис. 1, меланины также могут различаться по степени ароматизации молекул и содержанию функциональных групп. Структурные отличия и строение меланинов разного происхождения оказывают влияние на их спектральные свойства [11].

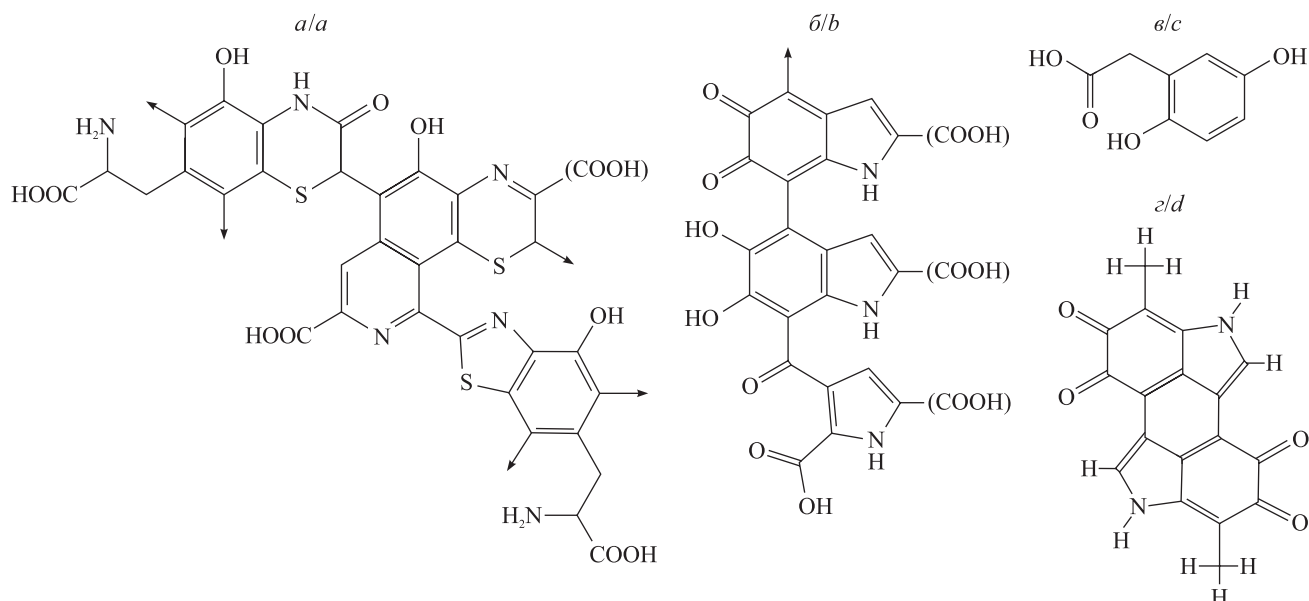


Рис. 1. Структурные формулы возможных мономеров феомеланина (а), зумеланина (б), пиомеланина (в) и синтетического меланина (з).
Источник: https://www.chemicalbook.com/productchemicalpropertiescb9324024_en.htm
Fig. 1. Structural formulas of possible monomers of pheomelanin (a), eumelanin (b), pyomelanin (c) and synthetic melanin (d).
Source: https://www.chemicalbook.com/productchemicalpropertiescb9324024_en.htm

Большое количество типов меланинов, синтезируемых грибами, указывает на сложные адаптивные механизмы и разнообразие биохимических путей синтеза этих пигментов. Будучи гетерогенными полифенолами, они обладают уникальными свойствами, такими как широкополосное оптическое поглощение, парамагнетизм, перенос заряда и высокая структурная стабильность [11; 12].

Широкий спектр биологической активности меланина (антиоксидантная, противоопухолевая, противовоспалительная, антивирусная, гепатопротекторная и радиопротекторная активность [13]) делает актуальным поиск штаммов меланизированных грибов в качестве источника получения меланина для практического использования в медицине, фармакологии, косметологии и других областях.

Исследованные в рамках настоящей работы черные дрожжи *Dothiora* sp. БИМ Y-383 были отобраны полярниками белорусских антарктических экспедиций из образцов мелкозема, собранного на участке Вечерний оазиса Холмы Тала (Восточная Антарктида) [14]. Климат данного региона характеризуется сверхнизкими температурами зимой (длится более 6 мес.), высоким уровнем ультрафиолетовой радиации, а также сильными стоковыми ветрами со скоростью более 60 м/с [15].

Для получения меланина из используемого штамма дрожжей требовалось исследовать процесс меланиногенеза в ходе его культивирования при различных температурах. Вне зависимости от источника получения для меланинов характерны генерализованное поглощение в диапазоне длин волн 220–460 нм и высокое содержание парамагнитных центров благодаря конденсированной структуре ароматических соединений [11; 16; 17].

В связи с вышеизложенным цель настоящей работы заключалась в том, чтобы с использованием методов электронной спектроскопии и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) исследовать влияние температуры культивирования на синтез меланина дрожжами *Dothiora* sp. БИМ Y-383.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования выступал штамм дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383, который был выделен из образца мелкозема, собранного на участке Вечерний оазиса Холмы Тала. Чистую культуру сохраняли путем консервирования в 20 % растворе глицерина и буфера PBS при температуре –70 °C [14; 18]. Штамм депонирован в Белорусскую коллекцию непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 18S рРНК депонирована в базу данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) с присвоением идентификационного номера PP832938 [14; 19; 20].

Культивирование дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383. Культуру дрожжей, выращенную до стационарной фазы роста, высевали на поверхность агаризованной среды Сабуро¹ и культивировали при температурах 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °С. Учет результатов роста дрожжей проводили на 16-е сутки. Мицелий дрожжей снимали с агаризованной среды, замораживали при температуре –20 °С и сублимировали в вакуумной камере установки LyoAlfa-15 (*Telstar Technologies*, Испания) при давлении 0,8 мбар и температуре –85 °С в течение 24 ч. Используя гравиметрический метод, измеряли выход биомассы сублимированного мицелия² [17] на 16-е сутки культивирования при температурах 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °С.

Микроскопические исследования. Окрашивание живых препаратов проводили метиленовым синим. Фотографии клеток делали с помощью светового микроскопа «Микромед-1» (модель 3–20 inf.) (Китай) и программного обеспечения *ToupView* при увеличении объектива ×100, числовой апертуре 1,25 (масляная иммерсия), увеличении окуляра ×10.

Экстракция меланина. В целях проведения спектральных исследований получали экстракты из образцов сублимированного мицелия. Экстракцию проводили из 1 г мицелия 10 мл 1 н. раствора NaOH при температуре 20 °С в течение 24 ч. Полученный экстракт сублимировали и взвешивали. Нерастворенную часть мицелия отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 10 000 об/мин на приборе Sigma 3-30K (*Sigma Laborzentrifugen*, Германия), промывали водой и сублимировали [11; 17; 21].

Для выделения меланина из сублимированного мицелия дрожжей и его очистки проводили щелочную экстракцию. Из щелочного экстракта меланин осаждали 0,1 моль/л HCl, доводя раствор до pH 2. Образовавшийся хлопьевидный осадок коричневого цвета отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 10 000 об/мин, промывали водой до достижения pH 7, сублимировали и использовали для определения парамагнитных свойств пигмента, а также снятия электронных спектров [11; 17; 21].

Спектрофотометрический анализ. Спектры поглощения полученных экстрактов из сублимированного мицелия и щелочных растворов синтетического меланина (M8631; *Sigma-Aldrich*, Великобритания) регистрировали с использованием спектрофотометра UV-VIS PB 2201 (ЗАО «СОЛАР», Беларусь) в диапазоне длин волн 200–800 нм [17; 22].

ЭПР-спектроскопия. Исследования ЭПР проводили на стационарном спектрометре SE/X-2543 (*Radiopan*, Польша) в X-диапазоне с частотой модуляции поляризующего магнитного поля 100 кГц и амплитудой модуляции от 0,05 до 0,50 мТл при комнатной температуре. Для контроля добротности резонатора и настройки фазы использовали кристалл рубина, закрепленный в резонаторе. Образцы располагали в центре резонатора в пучности магнитной компоненты СВЧ-поля. Индукцию постоянного магнитного поля измеряли датчиком ядерного магнитного резонанса, а частоту сверхвысокочастотного электромагнитного излучения – частотомером. Максимальная мощность СВЧ-излучения в резонаторе составляла 200 мВт. Кинетику насыщения сигнала ЭПР исследовали в диапазоне изменения мощности СВЧ-излучения от 0,5 до 30,0 дБ. По результатам ЭПР-спектрометрии рассчитывали количество парамагнитных центров (число спинов на грамм) в образцах сублимированного мицелия дрожжей, в осадках, образовавшихся после экстракции меланина, а также в образцах синтетического меланина и выделенного из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 меланина [11]. Полученные данные спектров обрабатывали с использованием программ *Excel 2016* и *Origin* (версия 8.6).

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов осуществляли в программе *Excel 2016*. Полученные данные представляли в виде средних арифметических значений со стандартным отклонением.

Результаты и их обсуждение

Дрожжи *Dothiora* sp. БИМ Y-383 относятся к отделу Ascomycota, представители которого способны к формированию мицелия [9]. Визуальная оценка роста дрожжей и их микроскопические исследования показали, что на начальных этапах экспоненциального роста происходило образование одноклеточных дрожжей, размножающихся почкованием. Переход в стадию стационарного роста, а затем и в стадию отмирания сопровождался формированием плотной структуры мицелия. Этот процесс описывает способность грибов существовать в двух морфологических формах – мицелиальной (нитевидной) и дрожжевой

¹Использовалась «Питательная среда № 2 ГРМ (Сабуро)» (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Россия), в ее состав входят панкреатический гидролизат рыбной муки (10 г/л), панкреатический гидролизат казеина (10 г/л), дрожжевой экстракт (2 г/л), натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный (2 г/л), D-глюкоза (40 г/л), агар бактериологический ((10 ± 3) г/л).

²ОФС.1.2.1.0010.15. Потеря в массе при высушивании // Фармакопей.пф : сайт. URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-1-0010-15-poterya-v-masse-pri-vysushivanii/> (дата обращения: 28.07.2025).

(одноклеточной). Мицелиальная форма состоит из ветвящихся нитей (гифов), которые обеспечивают питание, а дрожжевая – из одиночных шаровидных или овальных клеток, размножающихся почкованием [23].

Следует отметить, что увеличение температуры культивирования приводило к сокращению периода одноклеточной стадии роста. Так, при 18 °С этот период длился вплоть до 9 сут, при 22 °С – до 6 сут, а при 28 °С был минимальным и составлял 3 сут. Это обстоятельство свидетельствует о температурно-зависимом диморфизме исследуемых микроорганизмов (рис. 2).

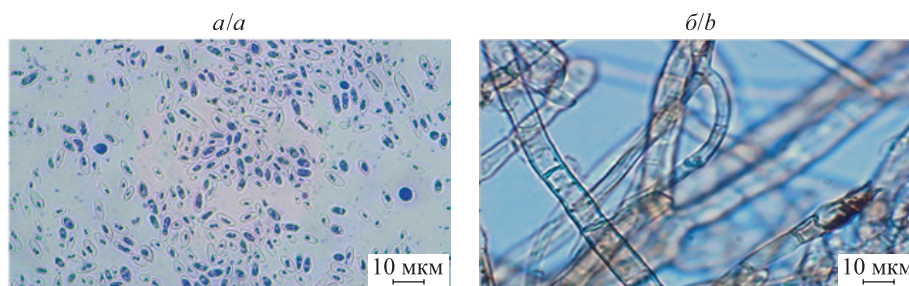


Рис. 2. Микрофотографии дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383, выращенных при температуре 28 °С: а – дрожжевая форма (24-й час культивирования); б – мицелиальная форма (144-й час культивирования)

Fig. 2. Micrographs of yeast *Dothiora* sp. BIM Y-383 grown at a temperature of 28 °С: а – yeast form (24th hour of cultivation); б – mycelial form (144th hour of cultivation)

Таким образом, переход от одноклеточной к нитевидной форме у дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 зависит от времени и температуры культивирования. Для анализа влияния этих параметров на рост дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383, культивируемых на поверхности агаризованной среды Сабуро в течение 16 сут при температурах 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °С, были определены морфологические особенности образования мицелия, выход его биомассы и изучен процесс биосинтеза меланина.

На рис. 3 представлены фотографии роста дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 на 3-и, 6-е, 9-е, 12-е и 16-е сутки культивирования при температурах 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °С.

В ходе визуальной оценки роста дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 было определено, что при температурах культивирования 10 и 32 °С рост культуры и синтез пигмента существенно замедлены, а при температуре культивирования 37 °С отмечено полное отсутствие роста культуры. Образцы, культивируемые при температурах 18; 22; 28 и 32 °С, демонстрировали различные стадии роста культуры во времени. Так, начало стационарной фазы роста, при которой происходит синтез пигмента и мицелий приобретает светло-коричневый цвет, при температуре 22 °С приходится на 6-е сутки, при температуре 28 °С – на 9-е сутки, при температуре 18 °С – на 12-е сутки, а при температуре 32 °С – на 16-е сутки культивирования. Кроме того, на 16-е сутки культивирования при температурах 22 и 28 °С наблюдалось формирование плотной структуры мицелия от темно-коричневого до черного цвета, что, предположительно, связано с активным спороношением дрожжей, переходом культуры к стадии отмирания и, соответственно, максимальным накоплением пигмента. Следует отметить, что при температуре 10 °С большая часть биомассы дрожжей на 16-е сутки культивирования оставалась неокрашенной.

Таким образом, рост дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 в широком диапазоне температур (10–32 °С) позволяет отнести их к группе психротолерантных микроорганизмов с факультативным синтезом пигмента. Оптимальным для роста культуры и синтеза пигмента является диапазон температур 22–28 °С.

Для проведения последующих гравиметрических исследований влияния температуры культивирования на увеличение биомассы дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 их мицелий был снят с чашек Петри и сублимирован. На рис. 4 представлена поверхностная диаграмма, отражающая трехмерную зависимость прироста биомассы сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 от времени и температуры культивирования. Область минимальных значений биомассы приходится на 3-и сутки культивирования: при температурах 18; 22 и 28 °С выход биомассы мицелия составлял $(0,108 \pm 0,031)$ г, $(0,203 \pm 0,024)$ г и $(0,111 \pm 0,027)$ г соответственно. Область же максимальных значений биомассы мицелия (в диапазоне 0,3–0,4 г) приходится на 6–9-е сутки культивирования при температурах 22 и 28 °С.

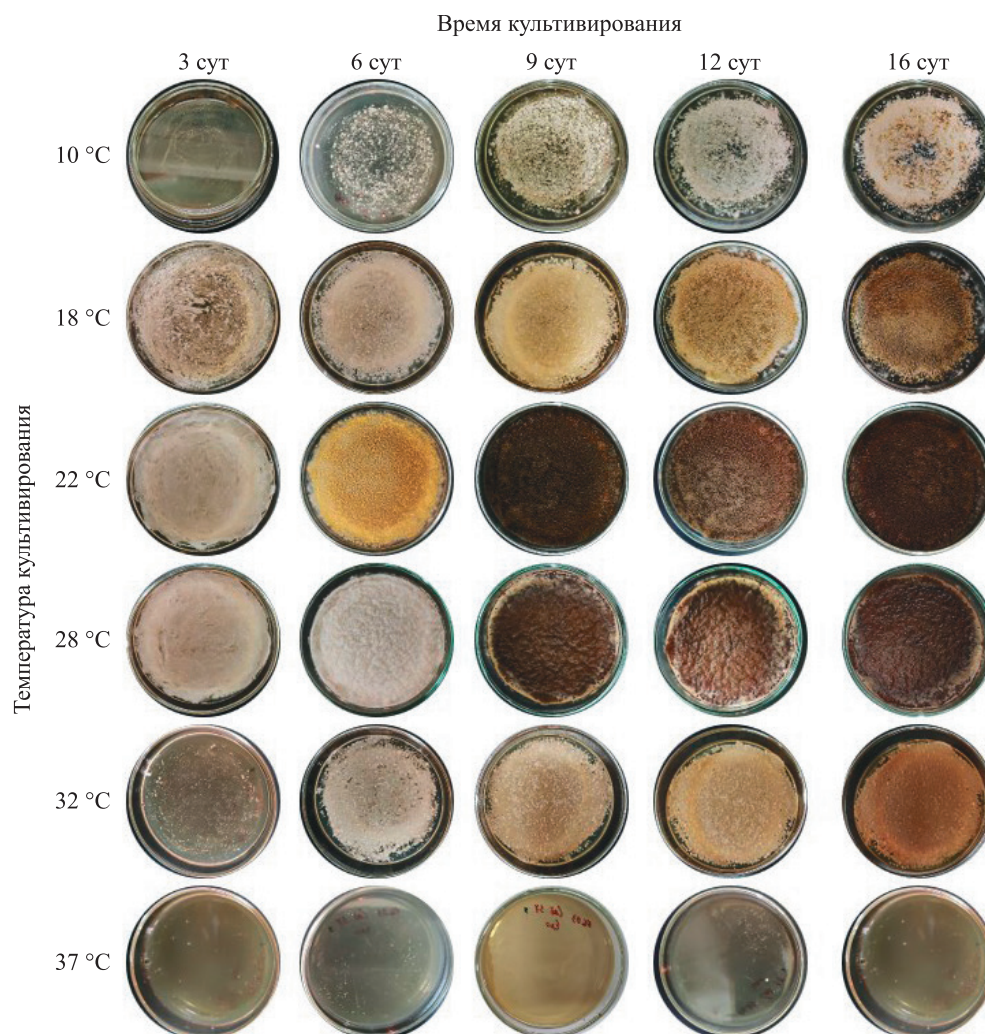


Рис. 3. Фотографии роста дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 на 3-и, 6-е, 9-е, 12-е и 16-е сутки культивирования при температурах 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °C

Fig. 3. Photographs of the growth of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast on 3rd, 6th, 9th, 12th and 16th days of cultivation at temperatures of 10; 18; 22; 28; 32 and 37 °C

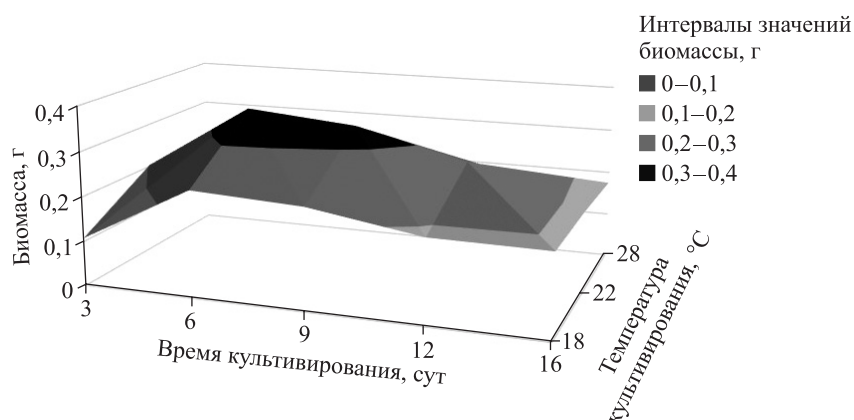


Рис. 4. Поверхностная диаграмма зависимости прироста биомассы сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 от времени и температуры культивирования

Fig. 4. Surface diagram of the dependence of the biomass increase of freeze-dried mycelium of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast on cultivation time and temperature

Исходя из гравиметрических измерений, на 6–9-е сутки культивирования в диапазоне температур 18–28 °C приходится стадия стационарного роста. Уменьшение массы мицелия подтверждает, что на 16-е сутки эксперимента культура переходит к стадии отмирания. Эти данные согласуются с предварительной визуальной оценкой роста дрожжей.

Как показано ранее, при культивировании дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 на плотной питательной среде происходит синтез пигмента темно-коричневого цвета. Для его идентификации исследованы спектральные свойства пигмента, который был выделен из сублимированного мицелия дрожжей, культивируемых при температуре 28 °C в течение 16 сут. Следует отметить, что среди природных биополимеров только меланины проявляют парамагнитные свойства вне зависимости от их происхождения и структурных особенностей [11], при этом отличительной характеристикой является форма спектров, средняя между лоренцевой и гауссовой формами. Эти наблюдения подтверждаются результатами исследования ЭПР пигмента, выделенного из сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383. Для сравнения на рис. 5 представлены спектры ЭПР синтетического меланина (см. рис. 5, кривая 1) и выделенного из мицелия дрожжей пигмента (см. рис. 5, кривая 2), которые указывают на их меланиновый характер [11].

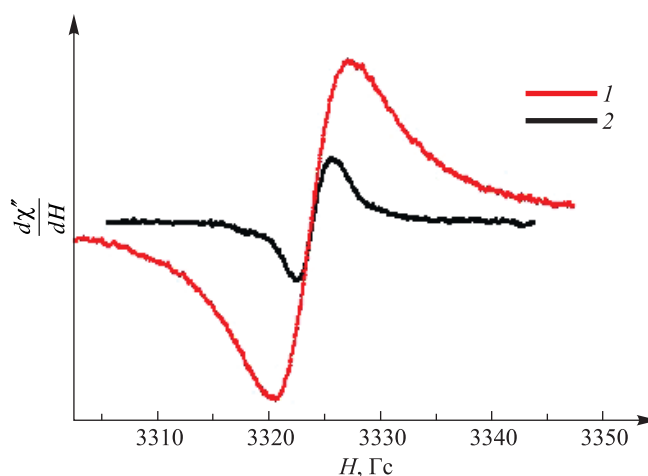


Рис. 5. Спектры ЭПР образцов синтетического меланина (1) и выделенного из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 пигмента (2)
Fig. 5. Electron paramagnetic resonance spectra of synthetic melanin samples (1) and pigment isolated from the mycelium of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast (2)

Необходимо отметить, что содержание парамагнитных центров в выделенном из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 меланине и синтетическом меланине различается на порядок и составляет $1,2 \cdot 10^{18}$ и $1,2 \cdot 10^{19}$ спинов на грамм соответственно.

Спектральные свойства меланинов ввиду их сложной ароматической структуры проявляются в широком и непрерывном поглощении света в видимой и ультрафиолетовой областях с характерными наклонными спектральных кривых в диапазоне длин волн 400–600 нм, что позволяет эффективно поглощать ультрафиолетовые лучи и защищать клетки от повреждений [17; 24; 25].

На рис. 6 представлены спектры поглощения синтетического меланина и выделенного из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 меланина. Оба пигмента имеют характерный нисходящий спектральный профиль.

При одинаковом содержании в растворе синтетического меланина и выделенного из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 меланина их спектры различаются интенсивностью поглощения при длине волны 460 нм, характерной для меланиновых пигментов. Для синтетического меланина оптическая плотность при длине волны 460 нм составила примерно 0,187, а для выделенного из дрожжевого мицелия меланина – 0,044. Низкая оптическая плотность выделенного из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 меланина свидетельствует о его структурных отличиях от синтетического меланина, в котором содержится большое количество функциональных групп (см. рис. 1). Таким образом, показано, что синтезируемый дрожжами *Dothiora* sp. БИМ Y-383 пигмент является меланином и для исследования процесса меланиногенеза можно использовать спектральные методы анализа.

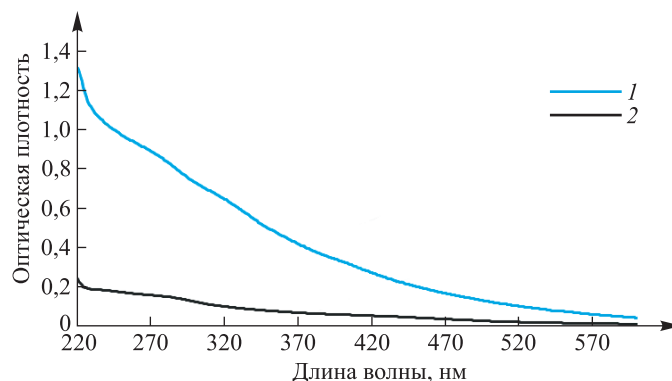


Рис. 6. Спектры поглощения синтетического меланина в концентрации 0,03 мг/мл (1) и выделенного из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 меланина в концентрации 0,03 мг/мл (2)

Fig. 6. Absorption spectra of synthetic melanin at a concentration of 0.03 mg/mL (1) and melanin isolated from the mycelium of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast at a concentration of 0.03 mg/mL (2)

Из рис. 4 видно, что время и температура культивирования влияют и на рост дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383, и на синтез пигмента. Чтобы оценить влияние температуры культивирования на рост дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 и синтез меланина, на 16-е сутки эксперимента были сделаны фотографии культур, выросших на чашках Петри при температурах 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °C (рис. 7, а), и фотографии соответствующих им образцов сублимированного мицелия (рис. 7, б). Как следует из рис. 7, б, при изменении температуры культивирования цвет сублимированного мицелия меняется от светло-бежевого до черного, что свидетельствует о накоплении в нем меланина в разных количествах.



Рис. 7. Морфологические особенности роста дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 на 16-е сутки культивирования при температурах 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °C: а – фотографии роста дрожжей на чашках Петри; б – фотографии сублимированной биомассы дрожжей

Fig. 7. Morphological features of the growth of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast on the 16th day of cultivation at temperatures of 10; 18; 22; 28; 32 and 37 °C: а – photographs of yeast growing on Petri dishes; б – photographs of freeze-dried yeast biomass

Результаты гравиметрических исследований, представленные на рис. 8, показывают, что при увеличении температуры культивирования до 28 °C на 16-е сутки эксперимента выход биомассы сублимированного мицелия возрастает до $(0,25 \pm 0,03)$ г (см. рис. 8, кривая 1). Культивирование дрожжей как при более низких, так и при более высоких температурах приводит к уменьшению выхода биомассы мицелия.

Для оценки количественного содержания меланина в мицелии дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 были исследованы спектральные свойства пигмента, экстрагированного из сублимированной биомассы дрожжей. Необходимо отметить, что полученный после экстракции меланина осадок мицелия имел черный цвет, свидетельствующий о возможном ковалентном взаимодействии пигмента с хитином

клеточных стенок дрожжей. Из представленной на рис. 8 температурной зависимости выхода экстракта из сублимированного мицелия видно, что с увеличением температуры культивирования на 16-е сутки эксперимента количество экстрагированных веществ уменьшается (см. рис. 8, кривая 2).

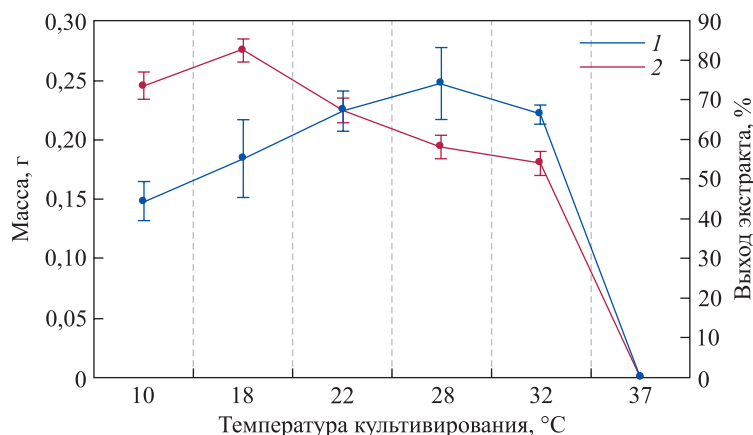


Рис. 8. Масса сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 (1) и выход экстракта из сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 (2) на 16-е сутки культивирования при температурах 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °C

Fig. 8. Mass of freeze-dried mycelium of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast (1) and yield of extract from freeze-dried mycelium of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast (2) on the 16th day of cultivation at temperatures of 10; 18; 22; 28; 32 and 37 °C

Спектральные исследования биосинтеза меланина дрожжами *Dothiora* sp. БИМ Y-383 проведены с использованием методов электронной спектроскопии и ЭПР. На рис. 9 представлены электронные спектры поглощения щелочных экстрактов из сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383, выращенных при температурах 10; 18; 22; 28 и 32 °C.

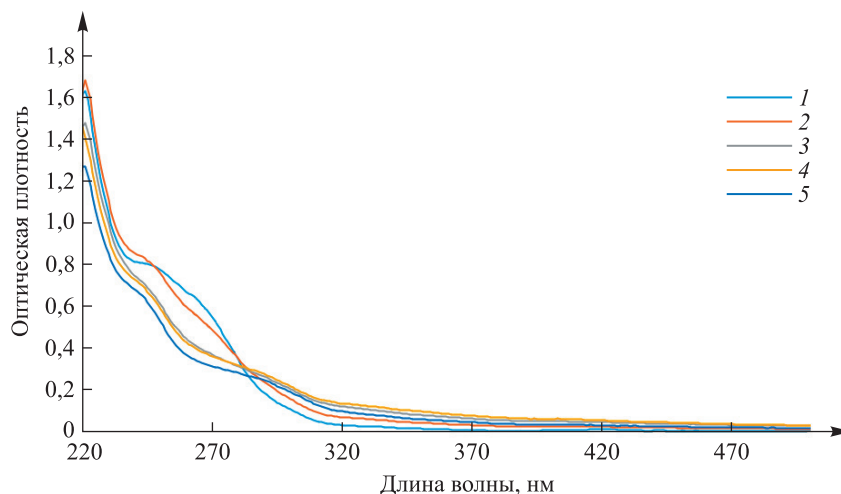


Рис. 9. Электронные спектры поглощения экстрактов из сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 на 16-е сутки культивирования при температурах 10 °C (1), 18 °C (2), 22 °C (3), 28 °C (4) и 32 °C (5)

Fig. 9. Electronic absorption spectra of extracts from freeze-dried mycelium of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast on the 16th day of cultivation at temperatures of 10 °C (1), 18 °C (2), 22 °C (3), 28 °C (4) and 32 °C (5)

Из рис. 9 видно, что с увеличением температуры культивирования в диапазоне длин волн 230–283 нм происходит уменьшение оптической плотности экстракта, тогда как в диапазоне длин волн 283–470 нм оптическая плотность экстракта, наоборот, возрастает.

Следует отметить, что при длине волны 283 нм наблюдается изобестическая точка. Ее наличие свидетельствует о присутствии в растворе двух типов поглощающих в этой спектральной области центров, молярные коэффициенты поглощения которых при указанной длине волны совпадают [26]. Такими

веществами в полученных экстрактах из мицелия могут являться меланин и хорошо растворимые в щелочных растворах белки. Эти наблюдения согласуются с анализом оптической плотности в области поглощения ароматических аминокислот белков при длине волны 280 нм и меланиновых пигментов при длине волны 460 нм [24; 27].

Спектральные свойства экстрагированного из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 меланина исследованы в сравнении со спектральными свойствами синтетического меланина и очищенного меланина из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383. Полученные результаты представлены в таблице.

**Спектральные характеристики синтетического меланина,
очищенного меланина из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383
и меланина в составе экстрактов из мицелия
дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383**

**Spectral characteristics of synthetic melanin,
purified melanin from the mycelium of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast
and melanin in the composition of extracts from the mycelium
of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast**

Образец	Концентрация, мг/мл	Температура культивирова- ния, °C	Оптическая плотность			Соотношение поглощения при длинах волн 280 и 460 нм
			При длине волны 220 нм	При длине волны 280 нм	При длине волны 460 нм	
Синтетический меланин	0,01	—	0,725	0,322	0,080	4,04
	0,02	—	0,881	0,527	0,113	4,66
	0,03	—	1,312	0,843	0,187	4,51
	0,04	—	1,616	1,105	0,239	4,63
Очищенный меланин из мицелия дрожжей <i>Dothiora</i> sp. БИМ Y-383	0,03	—	0,232	0,155	0,044	3,51
	0,10	—	0,974	0,618	0,176	3,51
Меланин в составе экстрактов из мицелия дрожжей <i>Dothiora</i> sp. БИМ Y-383	—	10	1,615	0,341	0,005	71,17
	—	18	1,634	0,348	0,017	20,67
	—	22	1,460	0,313	0,034	9,09
	—	28	1,455	0,318	0,040	8,04
	—	32	1,270	0,281	0,021	13,14

С увеличением концентрации синтетического меланина наблюдается характерное возрастание оптической плотности при длинах волн 220 и 280 нм. Для меланина в составе экстрактов из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 с увеличением температуры культивирования оптическая плотность при указанных длинах волн изменяется незначительно (в сторону уменьшения).

В отличие от белков для меланиновых пигментов характерно поглощение в видимой области спектра при длинах волн 380–480 нм [17; 24; 25]. Как следует из таблицы, при длине волны 460 нм наблюдается увеличение оптической плотности растворов синтетического меланина и очищенного меланина из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 с ростом их концентрации. Увеличение оптической плотности характерно и для меланина в составе экстрактов из мицелия при повышении температуры культивирования от 10 до 28 °C, после чего снова отмечается снижение показателей поглощения при температуре культивирования 32 °C, что свидетельствует о росте содержания меланина в полученных экстрактах при увеличении температуры культивирования до 28 °C.

Анализ соотношения поглощения при длинах волн 280 и 460 нм показал, что с увеличением концентрации синтетического меланина эта величина возрастает. Для экстрактов из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 данный показатель уменьшается при увеличении температуры культивирования до 28 °C,

что обусловлено ростом содержания в них меланинов и снижением количества экстрагированных из мицелия белков. Полученные результаты согласуются с выходом экстрактивных веществ, приведенным на рис. 8.

С использованием очищенного меланина из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 в качестве стандарта рассчитано содержание пигмента в экстрактах из мицелия дрожжей при различных температурах культивирования. Расчет, проведенный по величине оптической плотности при длине волны 460 нм, показал, что содержание меланина в экстрактах из сублимированного мицелия на 16-е сутки культивирования при температурах 10; 18; 22; 28 и 32 °C составило ($23,0 \pm 0,5$) мг/г, ($39,0 \pm 0,8$) мг/г, ($62,3 \pm 1,2$) мг/г, ($69,0 \pm 1,4$) мг/г и ($45,1 \pm 0,9$) мг/г соответственно (рис. 10, кривая 3).

Таким образом, проведенные спектральные исследования позволили установить, что меланиногенез у дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 носит факультативный характер и зависит от стадии роста культуры и температуры культивирования. Синтезируемый дрожжами меланин находится в связанном состоянии с их клеточными стенками, и только небольшая часть пигмента, растворимая в щелочных растворах, может быть выделена из мицелия.

Данные наблюдения подтверждаются исследованием ЭПР сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383. Результаты ЭПР-спектроскопии выявили преобладание одиночного сигнала с g -фактором 2,003 6 и шириной линии 4,1 Гс, характерного для меланинов бензосемихиноновой природы. Этот сигнал насыщается при увеличении мощности СВЧ-излучения. Спектры имеют форму, среднюю между лоренцевой и гауссовой формами, что также является характерной особенностью меланинов. Близкие значения g -факторов позволяют предположить единую природу парамагнитных центров во всех исследуемых образцах мицелия.

На рис. 10 представлена зависимость содержания парамагнитных центров с g -фактором, равным 2,003 6, от температуры культивирования клеток штамма *Dothiora* sp. БИМ Y-383 на 16-е сутки эксперимента до экстракции меланина (см. рис. 10, кривая 1) и после нее (см. рис. 10, кривая 2).

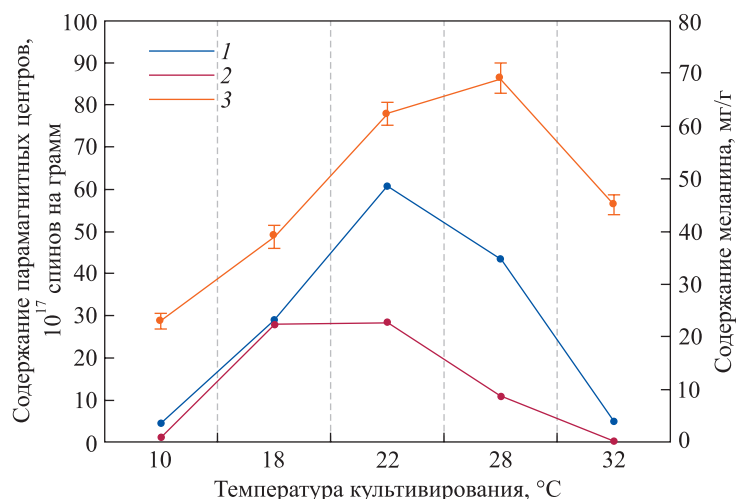


Рис. 10. Содержание парамагнитных центров в образцах сублимированного мицелия до экстракции меланина (1) и после нее (2), а также содержание меланина в экстрактах из сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 (3) в зависимости от температуры культивирования

Fig. 10. The content of paramagnetic centres in samples of freeze-dried mycelium before melanin extraction (1) and after her (2), as well as the content of melanin in extracts from freeze-dried mycelium of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast (3) depending on the cultivation temperature

При повышении температуры культивирования дрожжей от 10 до 22 °C наблюдался рост содержания парамагнитных центров от $4,5 \cdot 10^{17}$ до $60,8 \cdot 10^{17}$ спинов на грамм. Дальнейшее увеличение температуры культивирования до 28 °C сопровождалось постепенным снижением синтеза меланина, при этом содержание парамагнитных центров составляло $43,5 \cdot 10^{17}$ спинов на грамм. Повышение же температуры культивирования до 32 °C приводило к резкому снижению синтеза пигмента, в этом случае содержание парамагнитных центров было равно $5,1 \cdot 10^{17}$ спинов на грамм.

Сублимированный мицелий дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 после экстракции растворимой фракции меланина имел черный цвет, свидетельствующий о содержании в нем связанного с клеточной стенкой пигмента. Определение его количества в образцах с использованием ЭПР показало, что при температурах культивирования дрожжей 10; 18; 22; 28 и 32 °С содержание парамагнитных центров составляло $1,2 \cdot 10^{17}$; $28,0 \cdot 10^{17}$; $28,5 \cdot 10^{17}$; $11,0 \cdot 10^{17}$ и $0,4 \cdot 10^{17}$ спинов на грамм соответственно.

Тот факт, что в образцах мицелия дрожжей, выращенных при температурах 10 и 18 °С, отсутствуют различия в содержании парамагнитных центров до и после экстракции меланина, свидетельствует о синтезе преимущественно связанного с клеточной стенкой пигмента. Вместе с тем в образцах мицелия дрожжей, выращенных при температурах 22; 28 и 32 °С, наблюдается уменьшение количества парамагнитных центров после экстракции меланина на $32,3 \cdot 10^{17}$; $32,5 \cdot 10^{17}$ и $4,7 \cdot 10^{17}$ спинов на грамм соответственно, что говорит о синтезе свободного меланина, не связанного с клеточными стенками дрожжей (см. рис. 10, кривые 1 и 2).

Как следует из полученной с использованием метода электронной спектроскопии температурной зависимости содержания меланина в экстрактах из сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 на 16-е сутки эксперимента (см. рис. 10, кривая 3), максимальный выход меланина был зафиксирован при температурах культивирования 22 и 28 °С, он составил $(62,3 \pm 1,2)$ мг/г и $(69,0 \pm 1,4)$ мг/г соответственно. Эти данные коррелируют с изменением количества парамагнитных центров в мицелии дрожжей до и после экстракции пигмента: количество парамагнитных центров экстрагированного меланина при температурах культивирования 22 и 28 °С составило $3,2 \cdot 10^{18}$ и $3,3 \cdot 10^{18}$ спинов на грамм соответственно. Указанное обстоятельство позволяет применять метод ЭПР для изучения меланиногенеза в дрожжах и других объектах. Кроме того, проведенное исследование показало возможность использования спектральных методов анализа для изучения синтеза меланина дрожжами *Dothiora* sp. БИМ Y-383 в процессе роста культуры при различных температурах.

Заключение

Исследование роста дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 в широком диапазоне температур позволило отнести их к группе психротолерантных микроорганизмов с факультативным синтезом пигмента. Установлено, что оптимальным для роста культуры и синтеза пигмента у данного штамма дрожжей является диапазон температур 22–28 °С. Показано, что синтезируемый дрожжами *Dothiora* sp. БИМ Y-383 пигмент является меланином и что для исследования процесса меланиногенеза можно использовать спектральные методы анализа. Максимальный выход меланина из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 составил $(69,0 \pm 1,4)$ мг/г и был зафиксирован в образцах, культивируемых при температуре 28 °С в течение 16 сут.

Согласно литературным данным очищенный меланин обладает парамагнитными свойствами, благодаря которым он может проявлять антиоксидантную, противоопухолевую, противовоспалительную, анти-вирусную, гепатопротекторную и радиопротекторную активность [11], что делает его перспективной субстанцией для использования в качестве биологически активной добавки и др.

Библиографические ссылки

1. Cowan DA, Tow LA. Endangered Antarctic environments. *Annual Review of Microbiology*. 2004;58:649–690. DOI: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090811.
2. Ruisi S, Barreca D, Selbmann L, Zucconi L, Onofri S. Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 2007;6(1–3):127–141. DOI: 10.1007/s11157-006-9107-y.
3. Amato P, Doyle S, Christner BC. Macromolecular synthesis by yeasts under frozen conditions. *Environmental Microbiology*. 2009;11(3):589–596. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01829.x.
4. Libkind D, Sommaruga R, Zagarese H, van Broock M. Mycosporines in carotenogenic yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*. 2005;28(8):749–754. DOI: 10.1016/j.syapm.2005.05.005.
5. Thomas-Hall SR, Turchetti B, Buzzini P, Branda E, Boekhout T, Theelen B, et al. Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps – description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. nov. *Extremophiles*. 2010;14(1):47–59. DOI: 10.1007/s00792-009-0286-7.
6. Vaz ABM, Rosa LH, Vieira MLA, de Garcia V, Brandão LR, Teixeira LCRS, et al. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011;42(3):937–947. DOI: 10.1590/S1517-83822011000300012.
7. Vishniac HS. Yeast biodiversity in the Antarctic. In: Rosa C, Péter G, editors. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Berlin: Springer-Verlag; 2006. p. 419–440 (The yeast handbook). DOI: 10.1007/3-540-30985-3_16.

8. Coleine C, Selbmann L, Masonjones S, Onofri S, Zucconi L, Stajich JE. Draft genome sequence of an Antarctic isolate of the black yeast fungus *Exophiala mesophila*. *Microbiology Resource Announcements*. 2019;8(19):e00142-19. DOI: 10.1128/MRA.00142-19.
9. Ruibal C, Gueidan C, Selbmann L, Gorbushina AA, Crous PW, Groenewald JZ, et al. Phylogeny of rock-inhabiting fungi related to Dothideomycetes. *Studies in Mycology*. 2009;64:123–133. DOI: 10.3114/sim.2009.64.06.
10. Perini L, Gostinčar C, Anesio AM, Williamson C, Tranter M, Gunde-Cimerman N. Darkening of the Greenland Ice Sheet: fungal abundance and diversity are associated with algal bloom. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10:557. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00557.
11. Грачева НВ, Желтобрюхов ВФ. Меланины. Перспективы и проблемы использования в промышленности. Волгоград: Волгоградский государственный технический университет; 2019. 92 с.
12. Курченко ВП, Сенчук ВВ, Гавриленко НВ, Кукулянская ТА, Бабицкая ВГ, Щерба ВВ. Сравнительная характеристика меланиновых пигментов макромицетов *Phellinus igniarius* и *Inonotus* sp. *Вестник Белорусского государственного университета. Серия 2, Химия. Биология. География*. 1998;3:22–26. EDN: JNXXUD.
13. Dong C, Yao Y. Isolation, characterization of melanin derived from *Ophiocordyceps sinensis*, an entomogenous fungus endemic to the Tibetan Plateau. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2012;113(4):474–479. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.12.001.
14. Gribanova EA, Akhremchuk KU, Semenchukova EA, Dolgikh AV, Shchur VV, Yantsevich AV, et al. Isolation and primary characterisation of yeasts isolated from different ecosystems in East Antarctica. *Polar Science*. 2025;46:101262. DOI: 10.1016/j.polar.2025.101262.
15. Lukashanets DA, Convey P, Borodin OI, Miamin VYe, Hihiniak YuH, Gaydashov AA, et al. Eukarya biodiversity in the Thala Hills, East Antarctica. *Antarctic Science*. 2021;33(6):605–623. DOI: 10.1017/S0954102021000328.
16. Сушинская НВ, Кукулянская ТА, Курченко ВП, Сенчук ВВ. Характеристика меланина, полученного из *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pil. f. *sterilis* (Vanin) Nicol. *Вестник Белорусского государственного университета. Серия 2, Химия. Биология. География*. 2004;3:33–36. EDN: ZBLGDZ.
17. Хабибрахманова ВР, Рассабина АЕ, Хайруллина АФ, Минибаева ФВ. Физико-химические характеристики и антиоксидантные свойства меланинов, выделенных из лишайника *Leptogium furfuraceum* (Harm.). *Химия растительного сырья*. 2022;4:115–125. DOI: 10.14258/jcprm.20220411774.
18. Грибанова ЕА, Мямин ВЕ, Курченко ВП. Исследование особенностей меланиногенеза «черных дрожжей» Антарктиды. В: Аршанский ЕЯ, Балаева-Тихомирова ОМ, Галкин АН, Дорофеев СА, Красовская ИА, Литвенкова ИА и др., редакторы. *Экологическая культура и охрана окружающей среды: IV Дорофеевские чтения. Материалы Международной научно-практической конференции; 29 ноября 2024 г.; Витебск, Беларусь*. Витебск: Витебский государственный университет имени П. М. Машерова; 2024. с. 237–239.
19. Грибанова ЕА, Охремчук ЕВ, Семенчукова ЕА, Гигиняк ЮГ, Мямин ВЕ. Молекулярно-биологическая идентификация дрожжей, выделенных из различных экосистем Восточной Антарктики. В: *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Материалы XIII Международной научной конференции; 6–9 июня 2023 г.; Минск, Беларусь*. Минск: Белоруская наука; 2023. с. 39–40.
20. Грибанова ЕА, Охремчук ЕВ, Семенчукова ЕА, Мямин ВЕ. Разнообразие и биотехнологический потенциал дрожжей, выделенных из различных экосистем Восточной Антарктиды. В: Сергеев ЮВ, Кураков АВ, Белозерская ТА, Волобуев СВ, Бурова СА, Кононенко ГП и др., редакторы. *Современная микология в России. Том 10, Материалы Международного микологического форума. Выпуск 1, Генетика, морфология и физиология грибов*. Москва: Национальная академия микологии; 2024. с. 55–58.
21. Pralea I-E, Moldovan R-C, Petrache A-M, Ilieș M, Hegheș S-C, Ielciu I, et al. From extraction to advanced analytical methods: the challenges of melanin analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(16):3943. DOI: 10.3390/ijms20163943.
22. Бухало АС, Бабицкая ВГ, Бисько НА, Вассер СП, Дудка ИА, Митропольская НЮ и др. *Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре. Том 1*. Вассер СП, редактор. Киев: Альтерпрес; 2011. 212 с.
23. Satyanarayana T, Kunze G, editors. *Yeast biotechnology: diversity and applications*. Dordrecht: Springer; 2009. XXI, 744 p. DOI: 10.1007/978-1-4020-8292-4.
24. Курченко ВП, Сенчук ВВ, Кукулянская ТА, Новиков ДА, Леонтьев ВН, Борисик ОИ. Структура и функции природных меланиновых пигментов. *Труды Белорусского государственного технологического университета. Серия 3, Химия и технология неорганических веществ*. 1998;6:85–90. EDN: TBROHU.
25. Курченко ВП, Новиков ДА. Особенности физико-химических свойств меланинов из винограда (*Vitis vinifera*) и черного чая (*Thea sinensis*). *Вестник Белорусского государственного университета. Серия 2, Химия. Биология. География*. 2001;3:33–39. EDN: VUYMJP.
26. Белько НВ, Самцов МП, Гусаков ГА, Тарасов ДС, Луговский АА, Воропай ЕС. Спектрально-люминесцентные свойства и морфология самоорганизованных наноструктур индотрикарбоцианинового красителя. *Журнал прикладной спектроскопии*. 2018;85(6):868–878. EDN: YNRUBF.
27. Суховская ИВ, Борвинская ЕВ, Смирнов ЛПИ, Немова НН. Сравнительный анализ методов определения концентрации белка – спектрофотометрии в диапазоне 200–220 нм и по Бредфорд. *Труды Карельского научного центра Российской академии наук*. 2010;2:68–71. EDN: NBJDXP.

Получена 23.08.2025 / исправлена 09.10.2025 / принята 10.10.2025.
Received 23.08.2025 / revised 09.10.2025 / accepted 10.10.2025.

Авторы:

Екатерина Александровна Грибанова – старший преподаватель кафедры микробиологии биологического факультета.

Владимир Петрович Курченко – кандидат биологических наук, доцент; заведующий научно-исследовательской лабораторией прикладных проблем биологии кафедры общей экологии и методики преподавания биологии биологического факультета.

Игорь Иосифович Азарко – кандидат физико-математических наук, доцент; заведующий научно-исследовательской лабораторией физики и техники полупроводников кафедры физики полупроводников и наноэлектроники физического факультета.

Владислав Евгеньевич Мямин – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры микробиологии биологического факультета.

Authors:

Ekaterina A. Gribanova, senior lecturer at the department of microbiology, faculty of biology.

gribanova@bsu.by

<https://orcid.org/0009-0008-1562-4218>

Vladimir P. Kurchenko, PhD (biology), docent; head of the laboratory of applied biology, department of general ecology and methods of biology teaching, faculty of biology.

kurchenko@tut.by

<https://orcid.org/0000-0002-4859-2389>

Igor I. Azarko, PhD (physics and mathematics), docent; head of the laboratory of physics and engineering of semiconductors, department of semiconductor physics and nanoelectronics, faculty of physics.

azarko@bsu.by

Vladislav E. Miamin, PhD (biology), docent; associate professor at the department of microbiology, faculty of biology.

vladmiamin@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-6379-2207>

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

УДК 574(075.8)

Гричик В. В. Общая экология : электрон. учеб.-метод. комплекс с креатив. компонентом для спец. 6-05-0521-01 «Экология» / В. В. Гричик, Е. Е. Гаевский ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2025. 73 с. Библиогр.: с. 73. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/330987>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 26.06.2025, № 008026062025. Текст : электронный.

Электронный учебно-методический комплекс предназначен для студентов специальности 6-05-0521-01 «Экология». Он включает в себя теоретический раздел, раздел контроля знаний и вспомогательный раздел, содержащий учебно-программные материалы и список рекомендованной литературы. Курс «Общая экология» предполагает изучение основных разделов современной экологии, включая ее прикладные аспекты и анализ глобальных и региональных экологических проблем.

УДК 579.23(075.8)

Структурная организация клеток микроорганизмов : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 6-05-0511-03 «Микробиология» / БГУ ; сост. В. Е. Мямин. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2025. 106 с. : ил. Библиогр.: с. 105–106. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/331349>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 27.06.2025, № 008227062025. Текст : электронный.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов общего высшего образования специальности 6-05-0511-03 «Микробиология». Содержание ЭУМК посвящено рассмотрению особенностей строения и функционирования клеточных оболочек прокариот, цитоплазматических мембран, внутриклеточных структур прокариот, органелл, движения прокариот, дифференцированных клеточных структур, а также описанию роста и деления клеток прокариот.

УДК 579.26(075.8) + 578(075.8)

Общая экологическая микробиология с основами вирусологии : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 6-05-0521-01 «Экология» / В. Е. Мямин [и др.] ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2025. 297 с. : 119 ил. Библиогр.: с. 296–297. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/331352>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 27.06.2025, № 008327062025. Текст : электронный.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов общего высшего образования специальности 6-05-0521-01 «Экология». Содержание ЭУМК посвящено рассмотрению многообразия, важнейших свойств и особенностей организации и репродукции микроорганизмов и вирусов, их классификации, а также значения в природных процессах, народном хозяйстве и здравоохранении.

УДК 612.015(075.8)

Орёл Н. М. Функциональная биохимия : электрон. учеб.-метод. комплекс с креатив. компонентом для спец. 6-05-0511-02 «Биохимия» / Н. М. Орёл ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2025. 188 с. : ил. Библиогр.: с. 186–188. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/331451>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 30.06.2025, № 008430062025. Текст : электронный.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) с креативным компонентом предназначен для студентов, обучающихся по специальности 6-05-0511-02 «Биохимия». Содержание ЭУМК способствует повышению эффективности управления образовательным процессом и самостоятельной работой

студентов по освоению учебной дисциплины «Функциональная биохимия» с помощью внедрения в образовательный процесс инновационных образовательных технологий, в том числе с выраженным креативным компонентом.

УДК 608.3(075.8) + 608.1(075.8)

Биобезопасность и биоэтика : электрон. учеб.-метод. комплекс с креатив. компонентом для спец.: 6-05-0511-05 «Биоинженерия и биоинформатика», 6-05-0511-06 «Биотехнология», 7-07-0511-01 «Фундаментальная и прикладная биотехнология» / БГУ ; сост.: А. В. Лагодич, О. В. Лагодич. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2025. 110 с. : ил. Библиогр.: с. 107–110. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/331620>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 02.07.2025, № 009002072025. Текст : электронный.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальностей 6-05-0511-05 «Биоинженерия и биоинформатика», 6-05-0511-06 «Биотехнология», 7-07-0511-01 «Фундаментальная и прикладная биотехнология». Содержание ЭУМК способствует изучению следующих вопросов: раскрытию морально-этических проблем, возникающих при использовании новых технических решений и подходов в медицинской и биотехнологической отраслях, знакомству с основными нормативными актами по государственному и международному регулированию биобезопасности генно-инженерной деятельности, ознакомлению с существующими методическими приемами и подходами к оценке потенциальной опасности и рисков использования новых технологий.

*УДК 630*16/.18(075.8) + 712.41(075.8)*

Писарчук Н. М. Декоративная дендрология и фитодизайн : электрон. учеб.-метод. комплекс с креатив. компонентом для спец. 1-31 02 01 «География (по направлениям)», направление спец. 1-31 02 01-02 «География (научно-педагогическая деятельность)» / Н. М. Писарчук ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2025. 222 с. Библиогр.: с. 221–222. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/334141>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 16.09.2025, № 010416092025. Текст : электронный.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) по учебной дисциплине «Декоративная дендрология и фитодизайн» предназначен для обучающихся по географическим специальностям. Он содействует освоению студентами программы дисциплины. ЭУМК включает теоретический раздел, практический раздел, раздел контроля знаний и вспомогательный раздел. В них рассматриваются вопросы теории по дисциплине, методики проведения семинарских, практических, управляемых самостоятельных работ и коллоквиумов, контроля усвоения материала и оценки знаний. Значительное внимание уделено эвристической и креативной составляющим.

УДК 577.1(075.8) + 615.015.1(075.8)

Биотрансформация веществ : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 6-05-0511-02 «Биохимия» / БГУ ; сост. Н. М. Орёл. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2025. 147 с. : ил. Библиогр.: с. 145–147. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/336439>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 27.10.2025, № 012227102025. Текст : электронный.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов, обучающихся по специальности 6-05-0511-02 «Биохимия». Он является необходимым для организации и поддержки учебного процесса, обеспечивает доступ к учебным материалам. Содержание ЭУМК предполагает изучение вопросов биотрансформации эндогенных токсических и чужеродных веществ (в том числе лекарственных), механизмов регуляции и взаимосвязи метаболических процессов биотрансформации в организме в целом и в органах и тканях в частности.

СОДЕРЖАНИЕ

ФИЗИОЛОГИЯ И КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

Гриусевич П. В., Артишевская В. Е., Мыслейко М. А., Соколик А. И., Пишибытко Н. Л., Смолич И. И., Демидчик В. В. Регуляция катионных токов через плазматическую мембрану клеток корня высших растений под действием наночастиц оксидов меди, железа и титана.....	4
Доманская И. Н., Кабашикова Л. Ф., Пашкевич Л. В., Артемчук Я. Н., Молчан О. В. Окислительный статус здоровых и инфицированных грибом <i>Fusarium oxysporum</i> растений огурца <i>Cucumis sativus</i> L. при разных соотношениях синего света в полноспектральных композициях LED-освещения.....	16
Самович Т. В., Свечко А. Д., Козел Н. В. Механизмы индукции накопления β -каротина в клетках микроводоросли <i>Dunaliella salina</i> при азотном голодании.....	26

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Покладок Е. С., Мелешко А. Н., Кисель М. С. Исследование влияния способов доставки нуклеазы Cas9 на уровень нокаута в Т-лимфоцитах при использовании системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 на экспериментальной модели Т-клеточной линии Jurkat.....	38
Песоцкая К. Ю., Сорокин Д. В., Лагоненко А. Л., Евтушенков А. Н. Регуляция экспрессии гена <i>slyA</i> у фитопатогенных бактерий <i>Erwinia amylovora</i>	48
Колубако А. В., Григорьева Н. А., Шруб Е. В., Николайчик Е. А. Особенности иммунных реакций в листьях и клубнях растений <i>Solanum tuberosum</i> при заражении бактериями <i>Pectobacterium versatile</i>	62

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

Грибанова Е. А., Курченко В. П., Азарко И. И., Мямин В. Е. Влияние температуры на рост культуры дрожжей <i>Dothiora</i> sp. БИМ Y-383 и синтез меланина.....	74
Аннотации депонированных в БГУ работ.....	88

CONTENTS

PHYSIOLOGY AND CELL BIOLOGY

<i>Hryvusevich P. V., Artsisheuskaya V. Ya., Mysleika M. A., Sokolik A. I., Pshybytko N. L., Smolich I. I., Demidchik V. V.</i> Regulation of cation currents through the plasma membrane of root cells of higher plants under the influence of copper, iron and titanium oxide nanoparticles.....	4
<i>Domanskaya I. N., Kabashnikova L. F., Pashkevich L. V., Artemchuk Ya. N., Molchan O. V.</i> Oxidative status of healthy and fungus <i>Fusarium oxysporum</i> infected cucumber <i>Cucumis sativus</i> L. plants at different blue light ratio in full-spectrum LED lighting compositions.....	16
<i>Samovich T. V., Svechko A. D., Kozel N. V.</i> Mechanisms of induction of β -carotene accumulation in microalgae <i>Dunaliella salina</i> cells with nitrogen starvation.....	26

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

<i>Pokladok K. S., Meleshko A. N., Kisel M. S.</i> Study of the impact of nuclease Cas9 delivery methods on knockout efficiency in T lymphocytes using the CRISPR/Cas9 genome editing system in the experimental T cell line model Jurkat.....	38
<i>Pesotskaya K. Yu., Sorokin D. V., Lagonenko A. L., Evtushenkov A. N.</i> The regulation of <i>slyA</i> gene expression in phytopathogenic bacteria <i>Erwinia amylovora</i>	48
<i>Kalubaka N. V., Hryhoryeva N. A., Shrub K. V., Nikolaichik Y. A.</i> Features of immune reactions in leaves and tubers of <i>Solanum tuberosum</i> plants during infection by <i>Pectobacterium versatile</i> bacteria.....	62

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

<i>Gribanova E. A., Kurchenko V. P., Azarko I. I., Miamin V. E.</i> Influence of temperature on the growth of <i>Dothiora</i> sp. BIM Y-383 yeast culture and melanin synthesis.....	74
Indicative abstracts of the papers deposited in BSU.....	88

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. 2025**

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) 259-72-34, (017) 259-72-38.
E-mail: jbiol@bsu.by
URL: <https://journals.bsu.by/index.php/biology>

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

Редакторы *М. Д. Баранова, О. А. Семенец*
Технический редактор *М. А. Панкратова*
Корректор *Л. А. Меркуль*

Подписано в печать 31.10.2025.
Тираж 25 экз.

© БГУ, 2025

**Experimental Biology
and Biotechnology.
No. 3. 2025**

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) 259-72-34, (017) 259-72-38.
E-mail: jbiol@bsu.by
URL: <https://journals.bsu.by/index.php/biology>

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

Editors *M. D. Baranova, O. A. Semenets*
Technical editor *M. A. Pankratova*
Proofreader *L. A. Merkul'*

Signed print 31.10.2025.
Edition 25 copies.

© BSU, 2025