



ЖУРНАЛ
БЕЛОРУССКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

БИОЛОГИЯ

JOURNAL
OF THE BELARUSIAN STATE UNIVERSITY

BIOLOGY

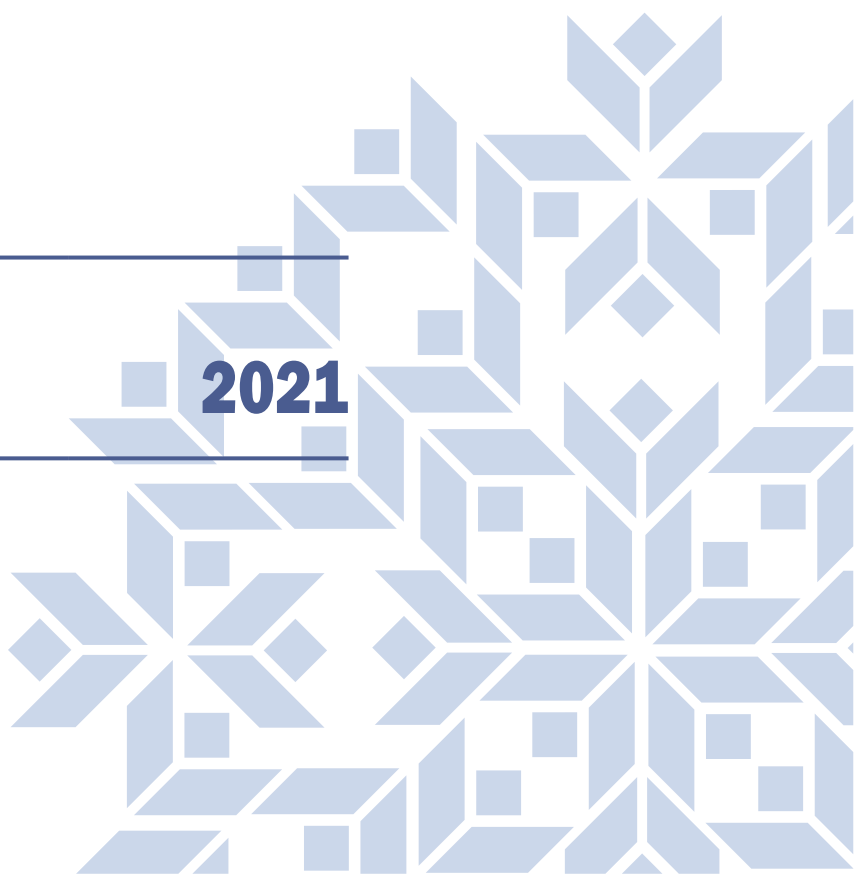
Издается с января 1969 г.
(до 2017 г. – под названием «Вестник БГУ.
Серия 2, Химия. Биология. География»)

Выходит три раза в год

2

2021

МИНСК
БГУ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор	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
Заместитель главного редактора	ДЕМИДЧИК В. В. – доктор биологических наук, доцент; декан биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь. E-mail: dzemidchik@bsu.by
Ответственный секретарь	ХРАМЦОВА Е. А. – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь. E-mail: elena_khramtsova@inbox.ru

Гельтман Д. В.	Ботанический институт им. В. Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия.
Давыденко О. Г.	Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Зинченко А. И.	Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Кильчевский А. В.	Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.
Кульчицкий В. А.	Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Медведев С. С.	Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.
Решетников В. Н.	Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Семак И. В.	Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Титок М. А.	Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Усанов С. А.	Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.

EDITORIAL BOARD

Editor-in-chief	SIDOROV A. V. , doctor of science (biology), full professor; professor at the department of human and animal physiology of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus. E-mail: sidorov@bsu.by
Deputy editor-in-chief	DEMIDCHIK V. V. , doctor of science (biology), docent; dean of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus. E-mail: dzemidchik@bsu.by
Executive secretary	KHRAMTSOVA E. A. , PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus. E-mail: elena_khramtsova@inbox.ru

Geltman D. V.	V. L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia.
Davydenko O. G.	Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Zinchenko A. I.	Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Kilchevsky A. V.	National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Kulchitsky V. A.	Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Medvedev S. S.	Saint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia.
Reshetnikov V. N.	Central Botanical Garden, Minsk, Belarus.
Semak I. V.	Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Titok M. A.	Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Usanov S. A.	National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

УДК 54.057:577.2

ВЛИЯНИЕ ЭМОКСИПИНА НА ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С ЦИТАРАБИНОМ И ЦИКЛОЦИТИДИНОМ

Д. Б. НИЖЕГОРОВА^{1), 2)}, М. М. ЗАФРАНСКАЯ¹⁾,
Е. И. КВАСЮК¹⁾, А. Г. СЫСА¹⁾

¹⁾Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ,
ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

²⁾Белорусская медицинская академия последипломного образования,
ул. П. Бровки, 3, корп. 3, 220013, г. Минск, Беларусь

С учетом особой роли окислительного стресса, возрастающего во время химиотерапии опухолей, исследовано влияние антиоксиданта эмоксипина на мононуклеары периферической крови в условиях, моделирующих процессы цитотоксического воздействия антиметаболитов ряда модифицированных цитидиновых нуклеозидов по отношению

Образец цитирования:

Нижегорова ДБ, Зафранская ММ, Квасюк ЕИ, Сыса АГ. Влияние эмоксипина на цитотоксичность мононуклеаров периферической крови в условиях культивирования с цитарабином и циклоцитидином. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021;2:3–10.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-3-10>

For citation:

Nizheharodava DB, Zafranskaya MM, Kvasyuk EI, Sysa AG. Effect of emoxipine on cytotoxicity of peripheral blood mononuclears under cultivation with cytarabine and cyclocytidine. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;2:3–10. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-3-10>

Авторы:

Дарья Борисовна Нижегородова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры иммунологии факультета экологической медицины¹⁾, ведущий научный сотрудник, руководитель отдела иммунологии и биомедицинских технологий²⁾.

Марина Михайловна Зафранская – доктор медицинских наук, доцент; заведующий кафедрой иммунологии факультета экологической медицины.

Евгений Иванович Квасюк – доктор химических наук, профессор; профессор кафедры экологической химии и биохимии факультета экологической медицины.

Алексей Григорьевич Сыса – кандидат химических наук, доцент; декан факультета экологической медицины.

Authors:

Darya B. Nizheharodava, PhD (biology), docent; associate professor at the department of immunology, faculty of environmental medicine^a, and leading researcher, head of the department of immunology and biomedical technologies^b.
nzh@tut.by

Marina M. Zafranskaya, doctor of science (medicine), docent; head of the department of immunology, faculty of environmental medicine.

zafranskaya@gmail.com

Eugeni I. Kvasyuk, doctor of science (chemistry), full professor; professor at the department of environmental chemistry and biochemistry, faculty of environmental medicine.

Aliaksei G. Sysa, PhD (chemistry), docent; dean of the faculty of environmental medicine.
aliaksei.sysa@iseu.by





к опухолевой клеточной линии K562. Лимфоидные клетки наряду с этим являлись источником для последующего моделирования реакции иммунного ответа на опухоль. Установлено, что ни сами модифицированные нуклеозиды, ни их комбинации с эмоксипином не вызывали изменения IL-2-стимулированной цитотоксичности лимфоидных клеток по отношению к опухолевой клеточной линии K562. Исследование экспрессии маркера CD107a показало значительный стимулирующий эффект 1 мкмоль/л цитарабина на активацию Т-лимфоцитов (CD3⁺) и субпопуляцию цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺).

Ключевые слова: цитарабин; циклоцитидин; окислительный стресс; эмоксипин; цитотоксичность.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования Республики Беларусь и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (гранты № X18MB-019, № M20MC-043).

EFFECT OF EMOXIPINE ON CYTOTOXICITY OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEARS UNDER CULTIVATION WITH CYTARABINE AND CYCLOCYTIDINE

D. B. NIZHEHARODAVA^{a, b}, M. M. ZAFRANSKAYA^a,
E. I. KVASYUK^a, A. G. SYSA^a

^aInternational Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University,
23/1 Daŭhabrodskaja Street, Minsk 220070, Belarus

^bBelarusian Medical Academy of Postgraduate Education,
3 P. Broŭki Street, 3 building, Minsk 220013, Belarus

Corresponding author: A. G. Sysa (aliaksei.sysa@iseu.by)

Taking into account the special role of oxidative stress that increases during cancer chemotherapy, the effect of the antioxidant emoxipine on peripheral blood mononuclears was studied under conditions that simulate the cytotoxic effects of antimetabolites of a number of modified cytidine nucleosides in relation to the tumor cell line K562. Lymphoid cells were also a source for subsequent modelling of the immune response to the cancer. It was found that neither the modified nucleosides themselves nor their combination with emoxipine caused changes in IL-2-stimulated cytotoxicity of lymphoid cells in relation to K562 tumor cell line. A study of the expression of the CD107a marker showed a significant stimulating effect of 1 μmol/L of citarabine on the activation of subpopulations of T-lymphocytes (CD3⁺) and cytotoxic T-lymphocytes (CD3⁺CD8⁺).

Keywords: cytarabine; cyclocytidine; oxidative stress; emoxipine; cytotoxicity.

Acknowledgements. This work was supported by Ministry of Education of the Republic of Belarus and Belarusian Republican Fund for Fundamental Researches (grants No. X18MB-019, No. M20MC-043).

Введение

В настоящее время модифицированные нуклеозиды и их аналоги широко применяются в качестве противовирусных или цитостатических препаратов. Попадая в клетку, такие соединения подвергаются ступенчатому фосфорилированию с образованием 5'-трифосфатов нуклеозидов, которые выступают субстратами либо ингибиторами ДНК-полимераз в инфицированной или трансформированной клетке.

Важным аспектом, ограничивающим применение цитостатических препаратов класса модифицированных нуклеозидов, является то, что данные препараты обладают нежелательными побочными эффектами из-за возможного воздействия на генетический аппарат клетки-хозяина. В связи с этим представляется перспективным поиск веществ или их комбинаций (в частности, с антиоксидантами), способствующих снижению интоксикации [1].

Проблеме протективного эффекта вводимых во время химиотерапии антиоксидантов в отношении нетрансформированных здоровых клеток посвящено большое количество исследований. Однако ввиду различий в дизайне исследования, протоколе вмешательства, типе рака, сроках наблюдения, инклюзивных критериях, статистическом анализе и схеме химиотерапии возникает неопределенность, позволяющая сделать окончательный вывод о риске снижения контроля опухоли из-за введения дополнительного антиоксиданта во время химиотерапии. Так, в исследованиях *in vitro* показано, что цитарабин



и другие аналоги нуклеозидов на основе цитозина токсичны для опухолевых клеток за счет повышения уровня клеточного окислительного стресса [2]. Напротив, ряд авторов приходят к однозначному заключению, что при одновременном применении антиоксиданты не мешают химиотерапии; усиливают цитотоксический эффект химиотерапии; защищают нормальные ткани; повышают выживаемость пациентов и терапевтический ответ [3–5].

Однако очень мало известно о том, как комбинации антиметаболитов с антиоксидантами действуют на цитотоксические врожденные и адаптивные иммунные клетки, влияет ли токсичность по отношению к лимфоцитам на их противоопухолевую эффективность. В настоящей работе в условиях *in vitro* исследовано влияние модифицированных нуклеозидов O2,2'-ангидро-1-(β-D-арабинофуранозил)цитозина (циклоцитидин, цикло-Ц) и 1-(β-D-арабинофуранозил)цитозина (цитарабин, ара-Ц) в комбинации с 6-метил-2-этилпиридином-3 (эмоксипин) – синтетическим производным 3-гидроксипиридина с сильным антиоксидантным действием – на цитотоксичность лимфоидных клеток в кокультуре с опухолевой клеточной линией человека K562.

Материалы и методы исследования

Получение циклоцитидина (цикло-Ц) и цитарабина (ара-Ц). Синтез цикло-Ц осуществляли реакцией взаимодействия природного нуклеозида – цитидина – с хлорангидридом ацетилсалициловой кислоты в ацетонитриле с последующим действием соляной кислоты для снятия блокирующих групп в промежуточном продукте (рис. 1). Выделенный кристаллический продукт цикло-Ц в виде его гидрохлорида очищали перекристаллизацией из воды.

Обработка цикло-Ц раствором гидроксида натрия при комнатной температуре с последующей нейтрализацией раствором соляной кислоты приводила к образованию ара-Ц, который выделялся в кристаллическом виде при охлаждении нейтрального раствора.

Продукт дополнительно очищали перекристаллизацией из воды. Соединения цикло-Ц и ара-Ц по всем параметрам совпадали с заведомыми образцами.

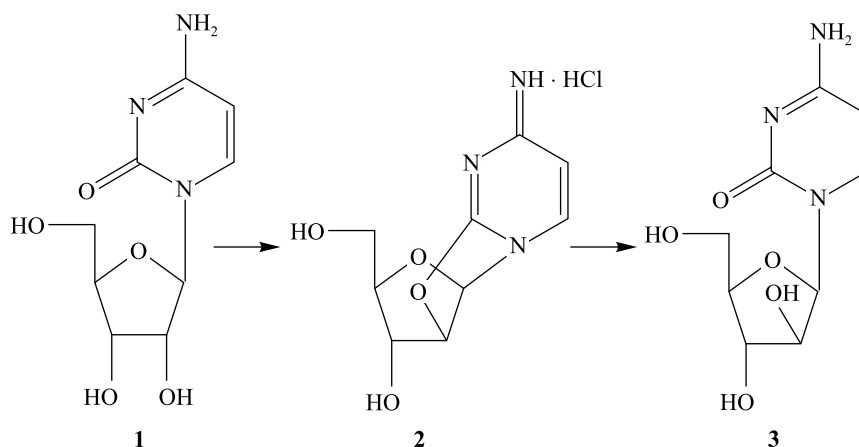


Рис. 1. Схема синтеза цикло-Ц (2) и ара-Ц (3) из цитидина (1)

Fig. 1. Scheme for the synthesis of cyclocytidine (2) and cytarabine (3) from cytidine (1)

Выделение мононуклеаров периферической крови (МПК). Материалом исследования явилась периферическая венозная кровь здоровых доноров ($n = 15$, из них 8 мужчин и 7 женщин), средний возраст которых составил 42,5 (39,0–47,5) года.

Периферическую кровь отбирали в стерильные пробирки с гепарином, разводили физиологическим раствором в соотношении 1 : 1, наслаивали на градиент плотности Histopaque-1077 (*Sigma*, Германия) и центрифугировали в течение 30 мин при 1500 об/мин и 4 °С. Образовавшееся интерфазное кольцо МПК отбирали в стерильные пробирки и дважды отмывали в физиологическом растворе в течение 10 мин при 1500 об/мин и 4 °С.

Культивирование МПК. Полученные МПК в концентрации $2 \cdot 10^5$ клеток на лунку культивировали в полной питательной среде на основе RPMI-1640 (*Bio-Whittaker*, США), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (*Gibco*, Германия), 2 ммоль/л L-глутамина (*Bio-Whittaker*), 1 % антибиотика-антимикотика (*Gibco*) в присутствии цикло-Ц и ара-Ц в концентрациях 1 мкмоль/л или без них (контрольные культуры) в течение 72 ч. Для стимуляции цитотоксичности МПК в кокультуре вводили интерлейкин-2 (IL-2, *Fluka*, Германия) в конечной концентрации 100 МЕ/мл.



Для оценки цитотоксичности к 3-дневной культуре МПК добавляли клетки-мишени – опухолевую клеточную линию человека K562, окрашенную флуоресцентным красителем 6-карбоксифлуоресцеина сукцинимидиловым эфиром (CFSE, *Fluka*), – в соотношении 5 : 1 и культивировали 4 ч. В кокультуры, в которых впоследствии оценивалась экспрессия мембранного протеина 1, ассоциированного с лизосомами (*lysosomal-associated membrane protein 1*, LAMP1), также добавляли ингибитор трансмембранного транспорта брeфельдин А (*Fluka*) и моноклональные антитела CD107a (*R & D Systems*, США).

Метод проточной цитофлуориметрии. Процент гибели клеток-мишеней K562 в результате цитотоксичности МПК в кокультурах определяли путем добавления катионного красителя пропидий йодида (PI, *Invitrogen*, Германия) и идентификации нежизнеспособных клеток опухолевой линии как CFSE⁺PI⁺K562 с использованием проточного цитофлуориметра Cytoflex (*Beckman Coulter*, США) на 50 000 событий. Коэффициент стимуляции цитотоксичности рассчитывали как отношение процента клеточной гибели K562 в кокультуре с МПК, стимулированными IL-2, к аналогичному показателю в кокультуре с нестимулированными МПК.

Фенотипирование МПК осуществляли с использованием моноклональных антител CD8-FITC, CD107a-PE, CD3-APC, CD56-PC7 (*R & D Systems*, *Beckman Coulter*), которыми окрашивали пробы в течение 15 мин в темноте. Результаты регистрировали на проточном цитофлуориметре Cytoflex как количество CD107a-позитивных клеток на 50 000 событий.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с применением стандартного пакета *Statistica 8.0* (*StatSoft Inc.*, США). Для описательной статистики исследуемых групп использовали показатели медианы, нижнего и верхнего процентилей (25-й и 75-й процентиля). Определение достоверных различий между сравниваемыми группами осуществляли непараметрическим критерием Вилкоксона. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Для оценки эффектов цикло-Ц, ара-Ц и их комбинаций с эмоксипином на спонтанную и IL-2-стимулированную цитотоксичность лимфоидных клеток по отношению к опухолевой клеточной линии K562 использовали процент погибших клеток K562, детектируемых как CFSE⁺PI⁺K562. В условиях стимуляции IL-2 наблюдалось статистически значимое увеличение эффектов цитотоксичности МПК во всех исследуемых культурах.

Показано, что ара-Ц в 2,1 раза ингибирует нестимулированную цитотоксичность МПК ($p < 0,05$), а его комбинация с эмоксипином на 57,6 % ослабляет данный ингибиторный эффект. В то же время цикло-Ц, как и его комбинация с эмоксипином, не влияет на цитотоксичность в условиях эксперимента. Оценка эффектов ара-Ц и цикло-Ц и их комбинаций с эмоксипином на IL-2-стимулированную цитотоксичность МПК не выявила статистически значимых различий, однако прослеживалась тенденция ингибиторного эффекта соединений (табл. 1).

Таблица 1

Количество нежизнеспособных клеток CFSE⁺PI⁺K562 в кокультурах с нестимулированными и IL-2-стимулированными МПК в присутствии модифицированных нуклеозидов и эмоксипина, %

Table 1

Number of non-viable cells CFSE⁺PI⁺K562 in cocultures with unstimulated and IL-2-stimulated peripheral blood mononuclear cells after exposure to cytarabine or cyclocytidine and emoxipine, %

Условия культивирования	Спонтанная цитотоксичность	IL-2-стимулированная цитотоксичность
Контроль	19,7 (15,6–22,0)	41,1 (40,0–43,2)
Ара-Ц	9,2* (7,0–10,7)	38,8 (36,2–42,4)
Цикло-Ц	18,8 (15,2–21,7)	39,9 (38,7–41,1)
Эмоксипин	19,7 (16,8–19,9)	38,3 (37,1–39,8)



Окончание табл. 1
Ending table 1

Условия культивирования	Спонтанная цитотоксичность	IL-2-стимулированная цитотоксичность
Ара-Ц + эмоксипин	14,5 (5,8–32,9)	39,3 (34,3–44,1)
Цикло-Ц + эмоксипин	21,5 (15,0–26,3)	38,4 (35,6–42,6)

Примечание. Клетки в кокультуре инкубировали 4 ч в присутствии флуоресцентного красителя CFSE и 1 мкмоль/л цикло-Ц и (или) ара-Ц отдельно либо совместно с 1 мкмоль/л эмоксипином. Каждое значение – медиана, 25-й и 75-й процентиля погибших клеток K562, рассчитанные в процентах от общей популяции клеток; * – достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$).

Экспрессия CD107a на лимфоидных клетках в кокультуре с K562 при культивировании с модифицированными нуклеозидами и их комбинациями с эмоксипином в условиях стимуляции IL-2. Метод оценки экспрессии CD107a позволяет измерять цитотоксическую активность на уровне клетки в конкретной популяции эффекторных клеток.

Показано, что экспрессия CD107a статистически значимо увеличивалась на всех лимфоидных популяциях с потенциальной цитотоксичностью в присутствии K562 (наиболее выражено на НК-клетках: 39,48 и 1,35 %, $p < 0,05$) (табл. 2).

Таблица 2

Экспрессия CD107a на IL-2-стимулированных цитотоксических лимфоидных клетках, культивируемых в присутствии и отсутствии K562, %

Table 2

CD107a expression on IL-2-stimulated cytotoxic lymphoid cells cultured in the presence and absence of K562, %

Условия культивирования	НК-клетки (CD56 ⁺ CD107a ⁺)	Т-клетки (CD3 ⁺ CD107a ⁺)	Цитотоксические Т-клетки (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD107a ⁺)
МПК (контроль)	1,35 (1,25–4,93)	0,86 (0,69–1,62)	0,79 (0,41–1,22)
МПК + K562	39,48* (38,33–40,60)	2,11* (1,29–2,52)	1,78* (0,92–1,97)

*Достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$).

На рис. 2 представлены результаты измерения уровня экспрессии CD107a на Т-лимфоцитах (CD3⁺), цитотоксических Т-лимфоцитах (CD3⁺CD8⁺), естественных киллерных клетках (CD56⁺) при культивировании в кокультуре с клетками K562 отдельно или в присутствии цикло-Ц, ара-Ц и их комбинаций с эмоксипином.

Как видно из данных, представленных на рис. 2, добавление ара-Ц статистически значимо усиливало IL-2-стимулированную экспрессию CD107a на Т-лимфоцитах (CD3⁺) (в 2,1 раза) и цитотоксических Т-лимфоцитах (CD3⁺CD8⁺) (на 47,5 %), но не на естественных киллерных клетках (CD56⁺). При этом цитотоксический эффект модифицированных нуклеозидов увеличивался при добавлении в культуральную смесь эмоксипина. Так, при кокультивировании клеток с 1 мкмоль/л ара-Ц и 1 мкмоль/л эмоксипином удельный вес CD3⁺CD107a⁺-клеток увеличился в 3,5 раза по сравнению с контролем (МПК + K562), а в случае CD3⁺CD8⁺CD107a⁺-клеток – в 2,0 раза. Полученные результаты свидетельствуют о возможности прямой защиты цитотоксических лимфоцитов от гибели в условиях вызываемого противоопухолевой химиотерапией окислительного стресса антиоксидантом эмоксипином. Отметим, что цикло-Ц не оказывал выраженного влияния, в то время как в случае комбинации с эмоксипином наблюдалась тенденция к повышению экспрессии CD107a на Т-лимфоцитах (CD3⁺) (на 69,6 %) и цитотоксических Т-лимфоцитах (CD3⁺CD8⁺) (на 43,4 %).

Известно, что противоопухолевая терапия сопровождается значительными побочными эффектами, что существенно влияет на течение, прогноз и эффективность лечения заболеваний [6; 7]. Многие из них напрямую связаны с процессами свободнорадикального окисления, значительно возрастающими во время химиотерапии опухолей. Так, нарушение баланса между свободными радикалами и антиоксидантной системой способно усиливать интоксикацию и даже приводить к токсическому

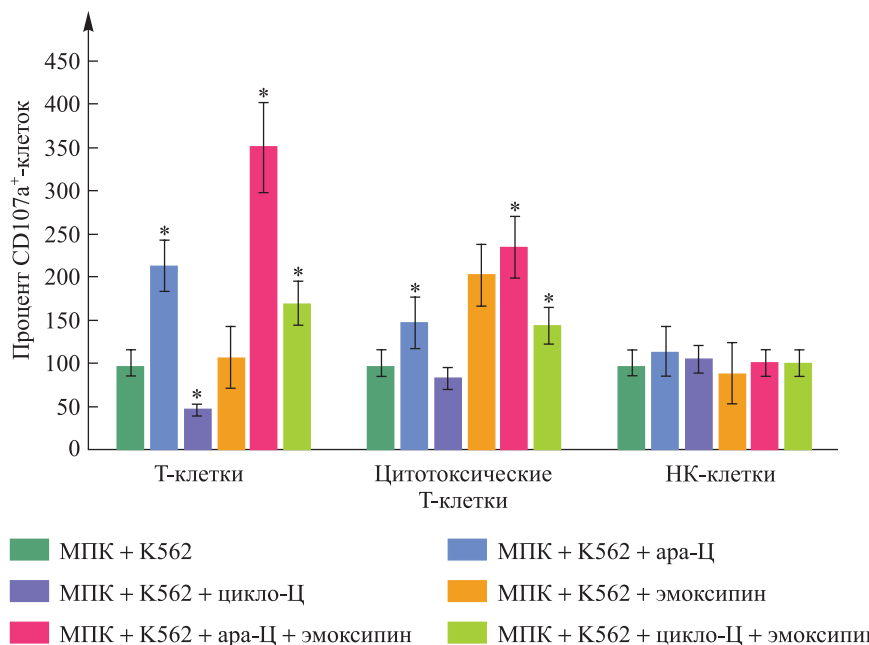


Рис. 2. Процент (по сравнению с контролем (МПК + К562)) CD107a⁺-лимфоидных клеток в кокультуре с клеточной линией К562 при культивировании с ара-Ц, цикло-Ц и их комбинациями с эмоксипином (* – достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$))

Fig. 2. Percentage (compared to control (PBMK + K562)) of CD107a⁺-lymphoid cells in coculture with K562 cell line when cultured after exposure to cytarabine or cyclocytidine and emoxipine (* – significant level compared to the control ($p < 0.05$))

повреждению здоровых органов и тканей, что оказывается лимитирующим фактором при решении вопроса о продолжении терапии [8; 9]. Необходимо учитывать, что у онкологических пациентов со злокачественной опухолью уже активированы процессы перекисного окисления липидов [10].

Однако широкому использованию антиоксидантных препаратов в клинической практике препятствует их недостаточно изученное взаимодействие с элементами современной общепринятой схемы комплексного химиотерапевтического лечения онкологических пациентов [11–13]. И хотя ряд работ отражают возможность повышения противоопухолевой эффективности отдельных цитостатиков при их комбинированном применении с антиоксидантами, полученные результаты не могут быть перенесены на все компоненты комплексного химиотерапевтического лечения и нуждаются в дальнейших подробных исследованиях, касающихся конкретных схем комбинированного применения [14; 15]. В настоящей работе для защиты здоровых немалигнизированных клеток при воздействии антиметаболитов на опухолевую культуру использовали сильный антиоксидант эмоксипин. В качестве модели здоровых клеток выступали лимфоциты периферической крови, которые наряду с этим являлись источником для последующего моделирования реакции иммунного ответа на опухоль. При этом были получены результаты, указывающие на возможность применения антиоксидантов как для защиты здоровых клеток от гибели в условиях вызываемого противоопухолевой химиотерапией окислительного стресса, так и в роли модулятора противоопухолевой активности цитотоксических Т-лимфоцитов.

В настоящем исследовании ни модифицированные нуклеозиды, ни их комбинации с эмоксипином не вызвали изменения IL-2-стимулированной цитотоксичности лимфоидных клеток по отношению к опухолевой клеточной линии К562, что не противоречит известным данным. Однако по экспрессии маркера CD107a нам удалось доказать выраженное влияние ара-Ц на активацию субпопуляции Т-лимфоцитов (CD3⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺), которое потенцировалось эмоксипином.

Заключение

В результате выполненных исследований проведена оценка влияния модифицированных нуклеозидов ара-Ц и цикло-Ц на цитотоксичность лимфоидных киллерных клеток человека.

Установлено, что ара-Ц в 2,1 раза ингибирует нестимулированную цитотоксичность МПК, а его комбинация с эмоксипином на 57,6 % ослабляет данный ингибиторный эффект. В то же время цикло-Ц, как и его комбинация с эмоксипином, не влияет на цитотоксичность в условиях эксперимента.



Оценка эффектов ара-Ц и цикло-Ц и их комбинаций с эмоксипином на IL-2-стимулированную цитотоксичность МПК не выявила статистически значимых различий, однако прослеживалась тенденция ингибиторного эффекта соединений.

Показано, что добавление ара-Ц статистически значимо усиливало IL-2-стимулированную экспрессию CD107a на Т-лимфоцитах (CD3⁺) (в 2,1 раза) и цитотоксических Т-лимфоцитах (CD3⁺CD8⁺) (на 47,5 %), но не на естественных киллерных клетках (CD56⁺). При этом цитотоксический эффект модифицированных нуклеозидов увеличивался при добавлении в культуральную смесь эмоксипина.

Таким образом, продемонстрировано, что вещества, регулирующие протекание окислительно-восстановительных реакций, способны снижать токсические эффекты антиметаболитов по отношению к нормальным клеткам.

Библиографические ссылки

1. Tsesmetzis N, Paulin CBJ, Rudd SG, Herold N. Nucleobase and nucleoside analogues: resistance and re-sensitisation at the level of pharmacokinetics, pharmacodynamics and metabolism. *Cancers*. 2018;10(7):240. DOI: 10.3390/cancers10070240.
2. Hewish M, Martin SA, Elliott R, Cunningham D, Lord CJ, Ashworth A. Cytosine-based nucleoside analogs are selectively lethal to DNA mismatch repair-deficient tumour cells by enhancing levels of intracellular oxidative stress. *British Journal of Cancer*. 2013;108(4):983–992. DOI: 10.1038/bjc.2013.3.
3. Singh K, Bhoir M, Kasu YA, Bhat G, Marar T. Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity – exploring the armoury of obscurity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018;26(2):177–190. DOI: 10.1016/j.jsps.2017.12.013.
4. Simone CB 2nd, Simone NL, Simone V, Simone CB. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 1. *Alternative Therapies in Health and Medicine*. 2007;13(1):22–28.
5. Simone CB 2nd, Simone NL, Simone V, Simone CB. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 2. *Alternative Therapies in Health and Medicine*. 2007;13(2):40–47.
6. Wright AA, Bohlke K, Armstrong DK, Bookman MA, Cliby WA, Coleman RL, et al. Neoadjuvant chemotherapy for newly diagnosed, advanced ovarian cancer: Society of Gynecologic Oncology and American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(28):3460–3473. DOI: 10.1200/JCO.2016.68.6907.
7. Неродо ГА, Златник ЕЮ, Новикова ИА, Арджа АЮ, Вереникина ЕВ, Никитина ВП и др. Неoadъювантная химиоиммунотерапия неоперабельных форм рака яичников. *Казанский медицинский журнал*. 2018;99(1):10–16. DOI: 10.17816/KMJ2018-010.
8. Павлов ВН, Рахматуллина ИР, Фархутдинов РР, Пушкарев ВА, Данилко КВ, Галимова ЭФ и др. Свободнорадикальное окисление и канцерогенез: дискуссионные вопросы. *Креативная хирургия и онкология*. 2017;7(2):54–61. DOI: 10.24060/2076-3093-2017-7-2-54-61.
9. Мартинович ГГ, Мартинович ИВ, Голубева ЕН, Черенкевич СН, Демидчик ЮЕ, Гаин ЮМ и др. Редокс-биотехнологии как основа для новой стратегии в противоопухолевой терапии. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук*. 2012;2:85–104.
10. Панибрат ОВ, Жабинский ВН, Хрипач ВА. Влияние комбинации цисплатина с брассиностероидами на рост раковых клеток. *Доклады Национальной академии наук Беларуси*. 2019;63(4):437–444. DOI: 10.29235/1561-8323-2019-63-4-437-444.
11. Victorino VJ, Pizzatti L, Michelletti P, Panis C. Oxidative stress, redox signaling and cancer chemoresistance: putting together the pieces of the puzzle. *Current Medicinal Chemistry*. 2014;21(28):3211–3226. DOI: 10.2174/0929867321666140601164647.
12. Dayem AA, Hye-Yeon Choi, Jung-Hyun Kim, Ssang-Goo Cho. Role of oxidative stress in stem, cancer, and cancer stem cells. *Cancers*. 2010;2(2):859–884. DOI: 10.3390/cancers2020859.
13. Sharifi N. Commentary: antioxidants for cancer: new tricks for an old dog? *The Oncologist*. 2009;14(3):213–215. DOI: 10.1634/theoncologist.2008-0219.
14. Mahalingaiah PKS, Singh KP. Chronic oxidative stress increases growth and tumorigenic potential of MCF-7 breast cancer cells. *Plos One*. 2014;9(1):e87371. DOI: 10.1371/journal.pone.0087371.
15. Amber KT, Shiman MI, Badiavas EV. The use of antioxidants in radiotherapy-induced skin toxicity. *Integrative Cancer Therapies*. 2014;13(1):38–45. DOI: 10.1177/1534735413490235.

References

1. Tsesmetzis N, Paulin CBJ, Rudd SG, Herold N. Nucleobase and nucleoside analogues: resistance and re-sensitisation at the level of pharmacokinetics, pharmacodynamics and metabolism. *Cancers*. 2018;10(7):240. DOI: 10.3390/cancers10070240.
2. Hewish M, Martin SA, Elliott R, Cunningham D, Lord CJ, Ashworth A. Cytosine-based nucleoside analogs are selectively lethal to DNA mismatch repair-deficient tumour cells by enhancing levels of intracellular oxidative stress. *British Journal of Cancer*. 2013;108(4):983–992. DOI: 10.1038/bjc.2013.3.
3. Singh K, Bhoir M, Kasu YA, Bhat G, Marar T. Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity – exploring the armoury of obscurity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018;26(2):177–190. DOI: 10.1016/j.jsps.2017.12.013.
4. Simone CB 2nd, Simone NL, Simone V, Simone CB. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 1. *Alternative Therapies in Health and Medicine*. 2007;13(1):22–28.
5. Simone CB 2nd, Simone NL, Simone V, Simone CB. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 2. *Alternative Therapies in Health and Medicine*. 2007;13(2):40–47.
6. Wright AA, Bohlke K, Armstrong DK, Bookman MA, Cliby WA, Coleman RL, et al. Neoadjuvant chemotherapy for newly diagnosed, advanced ovarian cancer: Society of Gynecologic Oncology and American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(28):3460–3473. DOI: 10.1200/JCO.2016.68.6907.



7. Nerodo GA, Zlatnik EYu, Novikova IA, Ardzha AYu, Verenikina EV, Nikitina VP, et al. Neoadjuvant chemoimmunotherapy for inoperable ovarian cancer. *Kazan Medical Journal*. 2018;99(1):10–16. Russian. DOI: 10.17816/KMJ2018-010.
8. Pavlov VN, Rakhmatullina IR, Farkhutdinov RR, Pushkarev VA, Danilko KV, Galimova EF, et al. Free radical oxidation and carcinogenesis: debatable issues. *Creative Surgery and Oncology*. 2017;7(2):54–61. Russian. DOI: 10.24060/2076-3093-2017-7-2-54-61.
9. Martinovich GG, Martinovich IV, Golubeva EN, Cherenkevich SN, Demidchik YE, Gain YM, et al. Redox biotechnologies as the basis for a new strategy in anticancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*. 2012;2: 85–104. Russian.
10. Panibrat OV, Zhabinskii VN, Khrpach VA. Effect of combination of cisplatin with brassinosteroids on the growth of cancer cells. *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2019;63(4):437–444. Russian. DOI: 10.29235/1561-8323-2019-63-4-437-444.
11. Victorino VJ, Pizzatti L, Michelletti P, Panis C. Oxidative stress, redox signaling and cancer chemoresistance: putting together the pieces of the puzzle. *Current Medicinal Chemistry*. 2014;21(28):3211–3226. DOI: 10.2174/0929867321666140601164647.
12. Dayem AA, Hye-Yeon Choi, Jung-Hyun Kim, Ssang-Goo Cho. Role of oxidative stress in stem, cancer, and cancer stem cells. *Cancers*. 2010;2(2):859–884. DOI: 10.3390/cancers2020859.
13. Sharifi N. Commentary: antioxidants for cancer: new tricks for an old dog? *The Oncologist*. 2009;14(3):213–215. DOI: 10.1634/theoncologist.2008-0219.
14. Mahalingaiah PKS, Singh KP. Chronic oxidative stress increases growth and tumorigenic potential of MCF-7 breast cancer cells. *Plos One*. 2014;9(1):e87371. DOI: 10.1371/journal.pone.0087371.
15. Amber KT, Shiman MI, Badiavas EV. The use of antioxidants in radiotherapy-induced skin toxicity. *Integrative Cancer Therapies*. 2014;13(1):38–45. DOI: 10.1177/1534735413490235.

Получена 14.10.2020 / принята 07.04.2021.
Received 14.10.2020 / accepted 07.04.2021.



ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ КОМПОНЕНТОВ АСКОРБАТ-ГЛУТАТИОНОВОГО ЦИКЛА В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ *NICOTIANA TABACUM*, ВЫРАЩЕННЫХ В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

К. В. ПРИСТУПА¹⁾, Т. А. КУКУЛЯНСКАЯ¹⁾, Е. А. ХРАМЦОВА¹⁾

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

Проведен сравнительный анализ биохимических характеристик компонентов аскорбат-глутатионного цикла нетрансгенных и трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, выращенных в почве с повышенной концентрацией солей тяжелых металлов. Трансгенные растения несли в своем геноме бактериальный *acdS*-ген, кодирующий фермент 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеамиразу (АЦК-деамиразу). Обработка почвы ионами меди, хрома и свинца в повышенных концентрациях способствовала индукции экспрессии *acdS*-гена и увеличению активности АЦК-деамиразы в трансгенных растениях. Также показано, что в условиях абиотического стресса у исследуемых растений возрастало содержание аскорбиновой кислоты, глутатиона, аскорбатпероксидазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы.

Ключевые слова: антиоксидантная система; аскорбат-глутатионовый цикл; *acdS*-ген; *Nicotiana tabacum*.

STUDY OF THE ASCORBATE-GLUTATHIONE CYCLE IN TRANSGENIC PLANTS *NICOTIANA TABACUM* UNDER ABIOTIC STRESS CONDITIONS

K. V. PRISTUPA^a, T. A. KUKULIANSKAYA^a, E. A. KHRAMTSOVA^a

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

Corresponding author: K. V. Pristupa (kristina.pristupa@mail.ru)

We conducted a comparative analysis of biochemical parameters for the ascorbate-glutathione cycle in non-transgenic and transgenic plants *Nicotiana tabacum*, cultivated in heavy metal polluted soils. Transgenic plants had in their genome a bacterial *acdS*-gene encoding the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC-deaminase) enzyme. The introduction of elevated concentrations of copper, chromium, and lead ions into the soil promotes induction

Образец цитирования:

Приступа КВ, Кукулянская ТА, Храмцова ЕА. Изучение состояния компонентов аскорбат-глутатионного цикла в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях абиотического стресса. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;2:11–18.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-11-18>

For citation:

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

Авторы:

Кристина Владимировна Приступа – аспирантка кафедры биохимии биологического факультета. Научный руководитель – Т. А. Кукулянская.

Татьяна Александровна Кукулянская – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры биохимии биологического факультета.

Елена Аркадьевна Храмцова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:

Kristina V. Pristupa, postgraduate student at the department of biochemistry, faculty of biology.

kristina.pristupa@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-1977-4949>

Tatsiana A. Kukulienskaya, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology.

tak14@tut.by

<https://orcid.org/0000-0002-4204-658X>

Elena A. Khramtsova, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.

elena_khramtsova@inbox.ru





of the *acdS*-gene expression and an increase in ACC-deaminase activity in transgenic plants. It was shown the content of ascorbic acid, glutathione, ascorbate peroxidase, glutathione peroxidase and glutathione reductase increased in plants under abiotic stress.

Keywords: antioxidant system; ascorbate-glutathione cycle; *acdS*-gene; *Nicotiana tabacum*.

Введение

Одной из важнейших задач, которые стоят перед учеными в настоящее время, является повышение устойчивости сельскохозяйственных растений к неблагоприятным факторам окружающей среды. Данное направление считается актуальным в связи с постоянно усиливающимся техногенным воздействием на природные сообщества и ухудшением экологической обстановки на территориях, занятых сельскохозяйственным производством. Растения, которые произрастают в неблагоприятных условиях, подвергаются абиотическому стрессу, что может быть обусловлено загрязнением почв тяжелыми металлами, засолением, засухой и т. д. [1; 2].

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

Механизм функционирования аскорбат-глутатионового цикла заключается в восстановлении пероксида водорода до воды с участием аскорбиновой кислоты и аскорбатпероксидазы. Аскорбат в данной реакции окисляется до дегидроаскорбата, который способен вновь стать восстановленной формой за счет глутатиона. В свою очередь, восстановленный глутатион превращается в окисленную форму, которая восстанавливается в НАДФН-зависимой реакции при участии глутатионредуктазы [5].

Развитие абиотического стресса сопровождается образованием избыточного количества этилена в растениях. Этилен представляет собой фитогормон, который участвует в регуляции прорастания семян, роста корней и стеблей, образования цветков, созревания плодов. Однако его чрезмерное накопление приводит к изменению параметров роста и развития растений.

Одним из современных способов снижения избыточного количества этилена в растениях является создание трансгенных форм, которые несут в своем геноме бактериальный *acdS*-ген, кодирующий 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазу. Данный фермент катализирует разложение предшественника этилена – 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (АЦК) – до аммиака и α -кетобутирата [6–8].

Устойчивость растений к неблагоприятным условиям, вызывающим стресс, в значительной степени обеспечивается функционированием антиоксидантной системы. Во многих странах мира проводится изучение антиоксидантной активности растений под влиянием стрессовых воздействий, создаются трансгенные растения, которые характеризуются сверхэкспрессией генов, кодирующих компоненты аскорбат-глутатионового цикла [9]. Имеются данные об изменении состояния и эффективности антистрессового действия аскорбат-глутатионовой системы для ряда растений, инокулированных бактериями, которые несут *acdS*-ген в своем геноме [10]. Однако изучение активности аскорбат-глутатионового цикла трансгенных растений, несущих этот ген, в условиях абиотического стресса не проводилось.

Цель настоящей работы – анализ влияния тяжелых металлов, внесенных в почву, на активность ряда ферментов, а также содержание неферментативных антиоксидантов аскорбат-глутатионового цикла в нетрансгенных и трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, несущих *acdS*-ген бактерий *Pseudomonas putida* B-37.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования выступали нетрансгенные и трансгенные растения *N. tabacum*, несущие *acdS*-ген бактерий *P. putida* B-37. Предметом исследования являлась активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла (глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и аскорбатпероксидаза) данных растений, а также содержание в них низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбиновая кислота и глутатион).

Растения были разделены на четыре группы:

- контрольная серия (без обработки почвы тяжелыми металлами);
- 1-я серия (обработка CuSO_4 в концентрации 30 мг на 1 кг почвы);



- 2-я серия (обработка $K_2Cr_2O_7$ в концентрации 15 мг на 1 кг почвы);
- 3-я серия (обработка $Pb(CH_3COO)_2$ в концентрации 15 мг на 1 кг почвы).

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

Каждая серия включала в себя по 5 трансгенных растений линий 4-12 и 10-38, а также 5 нетрансгенных растений *N. tabacum*.

Создание трансгенных растений осуществлялось согласно методике, описанной А. А. Мельниковой и соавторами [11]. Линии трансгенных растений *N. tabacum* 4-12 и 10-38 получены с использованием векторной конструкции pBI121-acdS, несущей *acdS*-ген бактерий *P. putida* B-37, который находится под контролем конститутивного промотора CaMV 35S. Генетическая конструкция введена в клетки *Agrobacterium tumefaciens* AGL0. Созданный агробактериальный штамм использован для трансформации каллусов *N. tabacum*.

Линии трансгенных растений 4-12 и 10-38 были получены с разных трансформированных клонов, следовательно, отличаются между собой на уровне ДНК по локусу внедрения и, соответственно, проявлению функций целевого гена, его взаимодействию с другими генами, а также влиянию на растения.

Растения линии 10-38 имели более высокие ($p \leq 0,05$) ростовые характеристики стебля ($(44,50 \pm 0,13)$ см) по сравнению с линией 4-12 ($(40,00 \pm 0,09)$ см) и большую ($p \leq 0,05$) длину корня ($(1,90 \pm 0,12)$ см), чем растения линии 4-12 ($(1,5 \pm 0,1)$ см). Кроме того, данные линии растений отличались ($p \leq 0,05$) своей биомассой: линия 4-12 имела меньшую биомассу ($(20,40 \pm 0,03)$ г) по сравнению с линией 10-38 ($(23,20 \pm 0,06)$ г).

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

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

Содержание аскорбиновой кислоты в растительных экстрактах устанавливали спектрофотометрически с применением метода Даса, который основан на способности фосфомолибдата восстанавливаться данной кислотой до молибдата синего цвета. Измерение проводили при длине волны 660 нм [12].

Содержание восстановленного глутатиона в растительных экстрактах измеряли спектрофотометрическим методом с использованием реактива Элмана при длине волны 412 нм [13].

Активность аскорбатпероксидазы в растительных экстрактах определяли спектрофотометрически по методу, который предложили С. Верма и Р. С. Дубей, при длине волны 290 нм [14].

Активность глутатионпероксидазы в растительных экстрактах устанавливали спектрофотометрически по количеству накопленного окисленного глутатиона в среде инкубации при длине волны 260 нм [15].

Активность глутатионредуктазы в растительных экстрактах измеряли спектрофотометрически по количеству НАДФН, образующегося при восстановлении окисленного глутатиона в среде инкубации, при длине волны 340 нм [16].

Содержание белка в растительных экстрактах определяли биуретовым методом при длине волны 540 нм [17].

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью лицензионного пакета программ *Statistica 6.0*. Данные представлены в виде средних арифметических величин со среднестатистической ошибкой средних арифметических величин. Оценку достоверности различий средних арифметических величин проводили на основании коэффициента Стьюдента. Различия между группами считали достоверными при двустороннем уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Развитие стресса у растений сопровождается активацией свободнорадикальных окислительных процессов в клетке, в том числе компонентов аскорбат-глутатионного цикла [3]. В первую очередь нами было определено содержание аскорбиновой кислоты (в миллиграммах) во всех сериях в расчете на 1 г растительного материала (табл. 1).



Таблица 1

Содержание аскорбиновой кислоты в нетрансгенных и трансгенных растениях *N. tabacum*, мг/г

Table 1

The content of ascorbic acid in non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, mg/g

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы тяжелыми металлами	0,73 ± 0,015	0,81 ± 0,016 ^a	0,78 ± 0,015
Обработка почвы Cu ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,96 ± 0,018*	0,99 ± 0,020*	1,07 ± 0,019 ^a
Обработка почвы Cr ⁶⁺ в концентрации 5 × ПДК	1,38 ± 0,027*	1,53 ± 0,031 ^a	1,74 ± 0,037 ^a
Обработка почвы Pb ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,75 ± 0,016	0,88 ± 0,018 ^a	0,88 ± 0,017 ^a

Примечание. * – различия между сериями без обработки почвы тяжелыми металлами и опытными сериями достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$; ^a – различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях, достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Согласно представленным данным при обработке почвы солями тяжелых металлов содержание аскорбиновой кислоты в трансгенных растениях повышается в той же степени, что и в нетрансгенных. Так, в нетрансгенных растениях содержание витамина С после внесения в почву ионов меди(II) и хрома(VI) увеличилось в 1,3 и 1,9 раза соответственно по сравнению с таковым в растениях, выращенных без внесения тяжелых металлов. В трансгенных растениях линии 10-38 содержание витамина С при обработке почвы ионами меди(II), хрома(VI) и свинца(II) возросло в 1,4; 2,2 и 1,1 раза соответственно по сравнению с его содержанием в растениях контрольной серии.

Помимо этого, нами было определено содержание глутатиона (в миллимолях) во всех сериях в расчете на 1 г растительного материала (табл. 2).

Таблица 2

Содержание глутатиона в нетрансгенных и трансгенных растениях *N. tabacum*, ммоль/г

Table 2

The content of glutathione of non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, mmol/g

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы тяжелыми металлами	3,46 ± 0,15	3,43 ± 0,16	3,39 ± 0,15
Обработка почвы Cu ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	4,79 ± 0,19*	5,15 ± 0,23*	5,17 ± 0,22*
Обработка почвы Cr ⁶⁺ в концентрации 5 × ПДК	5,45 ± 0,25*	5,88 ± 0,28*	5,91 ± 0,29*
Обработка почвы Pb ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	4,18 ± 0,16*	4,69 ± 0,18*	4,73 ± 0,17*

Примечание. * – различия между сериями без обработки почвы тяжелыми металлами и опытными сериями достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Как видно из табл. 2, содержание глутатиона в растениях при абиотическом стрессе в виде солей тяжелых металлов также возрастало. Показано, что в нетрансгенных растениях при обработке почвы медью(II), хромом(VI) и свинцом(II) оно увеличилось в 1,4; 1,6 и 1,2 раза соответственно по сравнению с контролем. В трансгенных растениях линии 4-12 содержание глутатиона после внесения в почву ионов меди(II), хрома(VI) и свинца(II) возросло в 1,5; 1,7 и 1,4 раза соответственно по сравнению с его содержанием в растениях, выращенных без обработки почвы тяжелыми металлами.



На следующем этапе работы были определены активности основных ферментов аскорбат-глутатионного цикла. Нами изучено влияние солей тяжелых металлов в почве на активность аскорбатпероксидазы (выражается в относительных единицах в минуту на 1 мг белка) в исследуемых растениях (табл. 3).

Таблица 3

Активность аскорбатпероксидазы в нетрансгенных
и трансгенных растениях *N. tabacum*, отн. ед. · мин⁻¹ · мг⁻¹

Table 3

Ascorbate peroxidase activity of non-transgenic
and transgenic plants *N. tabacum*, rel. un. · min⁻¹ · mg⁻¹

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы тяжелыми металлами	0,031 ± 0,002	0,029 ± 0,003	0,030 ± 0,002
Обработка почвы Cu ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,101 ± 0,004*	0,068 ± 0,004 ^a	0,066 ± 0,003 ^a
Обработка почвы Cr ⁶⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,149 ± 0,007*	0,110 ± 0,005 ^a	0,108 ± 0,006 ^a
Обработка почвы Pb ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,093 ± 0,004*	0,061 ± 0,003 ^a	0,058 ± 0,004 ^a

Примечание. * – различия между серией без обработки почвы тяжелыми металлами и опытными сериями достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$; ^a – различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях, достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Как видно из представленных данных, в условиях абиотического стресса активность аскорбатпероксидазы значительно увеличилась и в трансгенных, и в нетрансгенных растениях. Показано, что при обработке почвы солями тяжелых металлов активность данного фермента в трансгенных растениях повышается в меньшей степени, чем в нетрансгенных. Так, в нетрансгенных растениях активность аскорбатпероксидазы после внесения в почву меди(II), хрома(VI) и свинца(II) возросла в 3,3; 4,8 и 3,0 раза соответственно по сравнению с контрольной серией, а в трансгенных растениях линии 10-38 – в 2,2; 3,6 и 1,9 раза соответственно.

Также нами было изучено влияние ионов тяжелых металлов на активность глутатионпероксидазы (выражается в микромолях на литр окисленного глутатиона в минуту на 1 мг белка) в исследуемых растениях (табл. 4).

Таблица 4

Активность глутатионпероксидазы в нетрансгенных
и трансгенных растениях *N. tabacum*, мкмоль · л⁻¹ · мин⁻¹ · мг⁻¹

Table 4

Glutathione peroxidase activity of non-transgenic
and transgenic plants *N. tabacum*, μmol · L⁻¹ · min⁻¹ · mg⁻¹

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы тяжелыми металлами	0,027 ± 0,002	0,028 ± 0,002	0,027 ± 0,002
Обработка почвы Cu ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,051 ± 0,003*	0,037 ± 0,002 ^a	0,036 ± 0,002 ^a
Обработка почвы Cr ⁶⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,078 ± 0,004*	0,052 ± 0,003 ^a	0,053 ± 0,003 ^a
Обработка почвы Pb ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,044 ± 0,002*	0,031 ± 0,002 ^a	0,030 ± 0,002 ^a

Примечание. * – различия между серией без обработки почвы тяжелыми металлами и опытными сериями достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$; ^a – различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях, достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.



Согласно данным табл. 4 активность глутатионпероксидазы после внесения в почву меди(II), хрома(VI) и свинца(II) в нетрансгенных растениях увеличилась в 1,9; 2,9 и 1,6 раза соответственно по сравнению с ее активностью в растениях, выращенных на не загрязненной тяжелыми металлами почве. В трансгенных растениях линии 4-12 при обработке почвы солями ионов меди(II), хрома(VI), свинца(II) активность глутатионпероксидазы выросла в 1,3; 1,9 и 1,1 раза соответственно по сравнению с серией растений, выращенных в отсутствие абиотического стресса.

На последнем этапе нами была определена активность глутатионредуктазы (выражается в микромолях на литр НАДФН в минуту на 1 мг белка) в исследуемых экстрактах растений (табл. 5).

Таблица 5

Активность глутатионредуктазы в нетрансгенных
и трансгенных растениях *N. tabacum*, $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

Table 5

Glutathione reductase activity of non-transgenic
and transgenic plants *N. tabacum*, $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы тяжелыми металлами	$0,045 \pm 0,003$	$0,044 \pm 0,002$	$0,045 \pm 0,003$
Обработка почвы Cu^{2+} в концентрации $5 \times \text{ПДК}$	$0,098 \pm 0,005^*$	$0,067 \pm 0,003^{*a}$	$0,066 \pm 0,004^{*a}$
Обработка почвы Cr^{6+} в концентрации $5 \times \text{ПДК}$	$0,132 \pm 0,006^*$	$0,082 \pm 0,004^{*a}$	$0,083 \pm 0,003^{*a}$
Обработка почвы Pb^{2+} в концентрации $5 \times \text{ПДК}$	$0,077 \pm 0,004^*$	$0,061 \pm 0,003^{*a}$	$0,061 \pm 0,002^{*a}$

Примечание. * – различия между серией без обработки почвы тяжелыми металлами и опытными сериями достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$; ^a – различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях, достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Как видно из представленных данных, при обработке почвы солями тяжелых металлов активность глутатионредуктазы в трансгенных растениях повышается в меньшей степени, чем в нетрансгенных. Так, в нетрансгенных растениях при внесении в почву 5-кратной ПДК ионов меди(II), хрома(VI) и свинца(II) активность фермента выросла в 2,2; 2,9 и 1,7 раза соответственно по сравнению с контролем, а в трансгенных растениях линии 4-12 – в 1,5; 1,9 и 1,4 раза соответственно.

Показано, что трансгенные и нетрансгенные формы растений отвечают на абиотическое стрессовое воздействие увеличением содержания общего пула низкомолекулярных антиоксидантов, в частности аскорбата и глутатиона. Вероятно, в трансгенных растениях, несущих бактериальный *acdS*-ген, в меньшем количестве образуется пероксид водорода, который является одним из субстратов для аскорбатпероксидазы и глутатионпероксидазы. Следовательно, данные формы растений имеют более низкую интенсивность свободнорадикальных окислительных процессов по сравнению с нетрансгенными.

Полученные результаты относительно активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла согласуются с итогами предыдущих исследований, согласно которым трансгенные растения *N. tabacum* имели более низкую активность ферментативных антиоксидантов (пероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы), а также более низкую интенсивность процессов перекисного окисления липидов по сравнению с нетрансгенными формами в условиях абиотического стресса [18]. Кроме того, ранее нами было показано, что трансгенные растения *N. tabacum* отличались более высоким содержанием низкомолекулярных антиоксидантов (фенольных соединений и флавоноидов), чем нетрансгенные формы, при загрязнении почвы солями тяжелых металлов [19].

Также согласно данным литературы были получены трансгенные растения табака, которые сверхэкспрессировали супероксиддисмутазу и при этом демонстрировали увеличение активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла. Эти растения отличались повышенной устойчивостью к окислительному стрессу, только если другие антиоксиданты (в частности, глутатион и аскорбат) тоже присутствовали в клетке в высоких концентрациях [9].

Полученные данные согласуются с выводами, что для ряда растений, инокулированных бактериями, которые несли в своем геноме *acdS*-ген, в условиях абиотического стресса наблюдалась более низкая



активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла. Так, например, растения кукурузы, инокулированные бактериями *P. putida*, при засухе имели более низкую активность аскорбатпероксидазы и глутатионпероксидазы по сравнению с неинокулированными растениями [10]. В свою очередь, стоит отметить, что растения картофеля, выращенные в условиях воздействия на почву тяжелых металлов и инокулированные бактериями *Bacillus* sp., имеющими фермент АЦК-деаминазу, отличались более низкой активностью аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы, чем неинокулированные растения картофеля, выращенные на загрязненной тяжелыми металлами почве [20].

Заключение

Таким образом, трансгенные растения, несущие в своем геноме бактериальный *acdS*-ген и способные синтезировать АЦК-деаминазу, в меньшей степени подвержены воздействию повышенных концентраций ионов тяжелых металлов, присутствующих в почве. Следует отметить, что трансгенные растения *N. tabacum*, которые выращивались на загрязненной почве, имели лучшие ростовые характеристики (большая длина стебля, корня) и более высокую биомассу, чем нетрансгенные образцы [11].

Полученные результаты свидетельствуют об увеличении содержания глутатиона, аскорбиновой кислоты, повышении активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла в условиях абиотического стресса, вызванного обработкой почвы ионами Cu^{2+} , Cr^{6+} , Pb^{2+} . Продemonстрировано, что наименьшая чувствительность растений к загрязнению почвы солями тяжелых металлов отмечалась при внесении в почву солей свинца(II).

Практическая значимость данного исследования связана с использованием трансгенных растений, экспрессирующих бактериальный ген АЦК-деаминазы (*acdS*) и обладающих повышенной устойчивостью к неблагоприятным воздействиям окружающей среды.

Библиографические ссылки

1. Glick BR. Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in Applied Microbiology*. 2004;56:291–312. DOI: 10.1016/S0065-2164(04)56009-4.
2. Grichko VP, Glick BR. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2001;39(1):11–17.
3. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000; 153(1–3):83–104. DOI: 10.1016/S0300-483X(00)00306-1.
4. Ahmad P, Sarwat M, Sharma S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*. 2008; 51(3):167–173. DOI: 10.1007/BF03030694.
5. Вязов ЕВ, Козел НВ, Доманский ВП, Шалыго НВ. Активность аскорбат-глутатионового цикла в растениях огурца (*Cucumis sativus*) в условиях светодиодного освещения. *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. 2014;1:78–83.
6. Hontzeas N, Hontzeas CE, Glick BR. Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Biotechnology Advances*. 2006;24(4):420–426. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.01.006.
7. Grichko VP, Filby B, Glick BR. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *Journal of Biotechnology*. 2000;81(1):45–53. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00270-4.
8. Sergeeva E, Shah S, Glick BR. Growth of transgenic canola (*Brassica napus* cv. Westar) expressing a bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene on high concentrations of salt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006; 22(3):277–282. DOI: 10.1007/s11274-005-9032-1.
9. Young-Pyo Lee, Sun-Hyung Kim, Jae-Wook Bang, Haeng-Soon Lee, Sang-Soo Kwak, Suk-Yoon Kwon. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports*. 2007;26(5): 591–598. DOI: 10.1007/s00299-006-0253-z.
10. Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*. 2016;184:13–24. DOI: 10.1016/j.micres.2015.12.003.
11. Мельникова АА, Храмова ЕА, Королева ЕС, Руткевич ДА, Кукулянская ТА. Анализ экспрессии *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* В-37 в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;1:45–53. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-1-45-53.
12. Das N, Misra M, Misra AN. Sodium chloride salt stress induced metabolic changes in callus cultures of pearl millet (*Pennisetum americanum* L. Leeke): free solute accumulation. *Journal of Plant Physiology*. 1990;137(2):244–246. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)80090-8.
13. Sahoo S, Awasthi JP, Sunkar R, Panda SK. Determining glutathione levels in plants. In: Sunkar R, editor. *Plant stress tolerance. Methods and protocols*. 2nd edition. New York: Humana Press; 2017. p. 273–277. (Methods in molecular biology; volume 1631). DOI: 10.1007/978-1-4939-7136-7_16.
14. Verma S, Dubey RS. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*. 2003;164(4):645–655. DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00022-0.
15. Starlin T, Gopalakrishnan VK. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of *Tylophora pauciflora* Wight and Arn. – an *in vitro* study. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2013;6(suppl. 4):68–71.
16. Kiran BR, Prasad MNV. Defense manifestations of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in *Ricinus communis* L. exposed to lead in hydroponics. *The EuroBiotech Journal*. 2019;3(3):117–127. DOI: 10.2478/ebtj-2019-0014.
17. Семак ИВ, Зырянова ТН, Губич ОИ. *Биохимия белков*. Минск: БГУ; 2007. 49 с.



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

19. Приступа КВ, Кукулянская ТА, Храмцова ЕА. Анализ содержания фенольных антиоксидантов и аскорбиновой кислоты в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях абиотического стресса. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;1:20–26. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-1-20-26.

20. Gururani MA, Upadhyaya CP, Baskar V, Venkatesh J, Nookaraju A, Park SW. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2012;32(2):245–258. DOI: 10.1007/s00344-012-9292-6.

References

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

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

3. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000; 153(1–3):83–104. DOI: 10.1016/S0300-483X(00)00306-1.

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

5. Viazau YV, Kozel NV, Domanskii VP, Shalygo NV. Activity of ascorbate-glutathione cycle in cucumber plants (*Cucumis sativus*) under led lighting. *Vesci Nacyjanal' naj akademyi navuk Belarusi. Seryja bijalagichnyh navuk*. 2014;1:78–83. Russian.

6. Hontzas N, Hontzas CE, Glick BR. Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Biotechnology Advances*. 2006;24(4):420–426. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.01.006.

7. Grichko VP, Filby B, Glick BR. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *Journal of Biotechnology*. 2000;81(1):45–53. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00270-4.

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

9. Young-Pyo Lee, Sun-Hyung Kim, Jae-Wook Bang, Haeng-Soon Lee, Sang-Soo Kwak, Suk-Yoon Kwon. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports*. 2007;26(5): 591–598. DOI: 10.1007/s00299-006-0253-z.

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

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

12. Das N, Misra M, Misra AN. Sodium chloride salt stress induced metabolic changes in callus cultures of pearl millet (*Pennisetum americanum* L. Leeke): free solute accumulation. *Journal of Plant Physiology*. 1990;137(2):244–246. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)80090-8.

13. Sahoo S, Awasthi JP, Sunkar R, Panda SK. Determining glutathione levels in plants. In: Sunkar R, editor. *Plant stress tolerance. Methods and protocols*. 2nd edition. New York: Humana Press; 2017. p. 273–277. (Methods in molecular biology; volume 1631). DOI: 10.1007/978-1-4939-7136-7_16.

14. Verma S, Dubey RS. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*. 2003;164(4):645–655. DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00022-0.

15. Starlin T, Gopalakrishnan VK. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of *Tylophora pauciflora* Wight and Arn. – an *in vitro* study. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2013;6(suppl. 4):68–71.

16. Kiran BR, Prasad MNV. Defense manifestations of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in *Ricinus communis* L. exposed to lead in hydroponics. *The EuroBiotech Journal*. 2019;3(3):117–127. DOI: 10.2478/ebtj-2019-0014.

17. Semak IV, Zyryanova TN, Gubich OI. *Biokhimiya belkov* [Biochemistry of proteins]. Minsk: Belarusian State University; 2007. 49 p. Russian.

18. Pristupa KV, Karaleva KS, Kukulienskaya TA, Rutkevich DA. [Assessment status of the antioxidant system transgenic plants *Nicotiana tabacum* under abiotic stress]. In: *Biotehnologiya v rastenievodstve, zhivotnovodstve i sel'skokhozyaystvennoy mikrobiologii. Sbornik tezisev dokladov XIX Vserossiiskoi konferentsii molodykh uchenykh, posvyashchennoi pamyati akademika RASKhN Georgiya Sergeevicha Muromtseva; 15–16 aprelya 2019 g.; Moskva, Rossiya* [Biotechnology in crop production, animal husbandry and agricultural microbiology. Collection of abstracts of the 19th All-Russian conference of young scientists dedicated to the memory of the Russian Academy of Agricultural Sciences academician Georgy S. Muromtsev; 2019 April 15–16; Moscow, Russia]. Moscow: All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology; 2019. p. 55–56. Russian.

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

20. Gururani MA, Upadhyaya CP, Baskar V, Venkatesh J, Nookaraju A, Park SW. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2012;32(2):245–258. DOI: 10.1007/s00344-012-9292-6.

Получена 20.10.2020 / исправлена 02.02.2021 / принята 03.05.2021.
Received 20.10.2020 / revised 02.02.2021 / accepted 03.05.2021.



ВЛИЯНИЕ ДИОДНОГО УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СКОРОСТЬ РОСТА КОЛОНИЙ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ РОДА *ALTERNARIA*

А. А. РУСАКОВИЧ¹⁾, А. Ю. ШАШКО¹⁾, А. А. ВЕТОШКИН¹⁾,
А. А. СОЛДАТЕНКО²⁾, В. В. БОЛВОНОВИЧ³⁾, И. И. СМОЛИЧ¹⁾,
А. И. СОКОЛИК¹⁾, Ю. К. ШАШКО⁴⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾

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

²⁾ВерумАгро, ул. Совхозная, 4/1, пом. 1–48, 223058, д. Лесковка, Минский р-н, Беларусь

³⁾СелАгро, Луговослободской с/с, 73/1, Минский р-н, Беларусь

⁴⁾Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию,
ул. Тимирязева, 1, 222160, г. Жодино, Беларусь

Фитопатогенные микромицеты вызывают опасные заболевания сельскохозяйственных растений. Традиционно для их предотвращения применяются фунгициды. В последние годы активно развиваются экологически безопасные нехимические методы борьбы с грибными инфекциями, в частности продемонстрировавшая свою эффективность обработка ультрафиолетом (УФ) различной длины волны, интенсивности и происхождения. В настоящей работе проанализированы особенности воздействия светодиодного коротковолнового УФ-излучения (УФ-С) малой

Образец цитирования:

Русакович АА, Шашко АЮ, Ветошкин АА, Солдатенко АА, Болвонович ВВ, Смолич ИИ, Соколик АИ, Шашко ЮК, Демидчик ВВ. Влияние диодного ультрафиолетового излучения на скорость роста колоний мицелиальных грибов рода *Alternaria*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;2:19–28.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-19-28>

For citation:

Rusakovich AA, Shashko AY, Viatoshkin AA, Saldatsenka AA, Balvanovich UV, Smolich II, Sokolik AI, Shashko YuK, Demidchik VV. The effect of ultraviolet diode radiation on the growth rate of *Alternaria* colonies. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;2:19–28. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-19-28>

Авторы:

Алина Андреевна Русакович – стажер младшего научного сотрудника научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Антонина Юрьевна Шашко – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Алексей Андреевич Ветошкин – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Алексей Анатольевич Солдатенко – главный инженер.

Владимир Викторович Болвонович – директор.

Игорь Иванович Смолич – кандидат биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

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

Юрий Константинович Шашко – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент; заведующий лабораторией иммунитета.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, доцент; декан биологического факультета.

Authors:

Alina A. Rusakovich, probationer of junior researcher at the laboratory of plant physiology and biotechnology, department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

aalinarusakovich@gmail.com

Antonina Yu. Shashko, junior researcher at the laboratory of plant physiology and biotechnology, department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

bio.shashkoay@bsu.by

Aliaksei A. Viatoshkin, junior researcher at the laboratory of plant physiology and biotechnology, department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

vetoshkinaa@bsu.by

Aliaksei A. Saldatsenka, chief engineer.

soldatenkoal@verumagro.com

Uladzimir V. Balvanovich, director.

selagro@tut.by

Ihar I. Smolich, PhD (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

smolich@bsu.by

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

sokolik@bsu.by

Yuri K. Shashko, PhD (agricultural science), docent; head of the laboratory of immunity.

shashko_y@tut.by

Vadim V. Demidchik, doctor of science (biology), docent; dean of the faculty of biology.

dzemidchik@bsu.by



мощности на рост и жизнеспособность мицелия *Alternaria radicina* и *A. alternata* – патогенов важных сельскохозяйственных культур, содержащих меланин (пигмент, обладающий протекторными свойствами по отношению к УФ). Показано, что облучение микромицетов рода *Alternaria* УФ-С-диодом ингибирует их рост только на ранних этапах развития. Особенно сильно данный эффект проявляется в первые 3 сут после УФ-воздействия, однако к 5-м суткам после облучения рост патогенных организмов восстанавливается. Установлено, что *A. alternata* менее чувствительна к диодному УФ-облучению. Полученные результаты свидетельствуют об устойчивости содержащих меланин микромицетов к светодиодному УФ-С-излучению малой мощности.

Ключевые слова: ультрафиолет; диод; *Alternaria*; размер колоний.

THE EFFECT OF ULTRAVIOLET DIODE RADIATION ON THE GROWTH RATE OF ALTERNARIA COLONIES

A. A. RUSAKOVICH^a, A. Yu. SHASHKO^a, A. A. VIATOSHKIN^a,
A. A. SALDATSENKA^b, U. V. BALVANOVICH^c, I. I. SMOLICH^a,
A. I. SOKOLIK^a, Yu. K. SHASHKO^d, V. V. DEMIDCHIK^a

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

^bVerumAgro, 4/1 Saŭchoznaja Street, offices 1–48, Liaskoŭka 223058, Minsk district, Belarus

^cSelAgro, 73/1 Luhavaslabadski village council, Minsk district, Belarus

^dResearch and Practical Center of National Academy of Sciences of Belarus for Arable Farming,
1 Cimirazieva Street, Žodzina 222160, Belarus

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

Phytopathogenic micromycetes induce dangerous crop diseases. Traditionally, fungicides have been used to prevent these diseases. In recent years, environmentally friendly non-chemical methods for combating fungal infections have been developed. In particular, ultraviolet (UV) treatment of various wavelengths, intensities and origins has been shown to be effective. In this work, we have analysed the effect of diode low-intensity shortwave UV radiation (UV-C) on the growth and potential viability of the mycelium of *Alternaria radicina* and *A. alternata*, the pathogens of important crops. It was shown that irradiation by UV-C diode inhibited growth of *Alternaria* species at the early stages of development. This effect was high in the first 3 d after UV exposure; however, after 5 d after irradiation, the growth of pathogenic fungi fully restored, suggesting that UV can be only used for partial removal of *Alternaria*. It was found that *A. alternata* is less sensitive to diode UV irradiation. The obtained results indicate that the *Alternaria* micromycetes, particularly, *A. alternata*, containing high melanin levels, are resistant to low-intensity UV-C diode irradiation.

Keywords: ultraviolet; diode; *Alternaria*; colony size.

Введение

Фитопатогенные микромицеты, такие как *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria radicina*, *A. alternata*, *Botrytis cinerea*, вызывают опасные заболевания растений и поражают собранные овощи и фрукты [1–6]. Данные грибы отличаются быстрым ростом мицелия и большим набором ферментативных систем, что позволяет им использовать в качестве источника питания широкий круг материалов природного и искусственного происхождения [7]. Традиционно для предотвращения заболеваний грибной этиологии применяются фунгициды [8]. Однако повышение устойчивости микромицетов к фунгицидам [9] привело к увеличению доз и частоты их применения, что создает угрозу для здоровья населения и высокий риск загрязнения окружающей среды [10].

В последние годы в хранилищах овощей и фруктов, имеющих органический сертификат, стало невозможно использовать основные фунгициды органической природы [11]. В связи с этим высокую актуальность имеет разработка новых типов дезинфекции, в частности, на основе воздействия паром, природными дезинфектантами, ультрафиолетом (УФ) и др. [7; 12].

Среди нехимических подходов эффективность в борьбе с патогенами грибного происхождения продемонстрировала обработка УФ различной длины волны, интенсивности и происхождения [1; 13]. Используемый на практике УФ подразделяется на длинноволновый (УФ-А), средневолновый (УФ-В) и коротковолновый (УФ-С). Наиболее сильным влиянием на рост грибных патогенов обладает УФ-С (200–280 нм) [14]. Показано, что УФ-С может подавлять распространение инфекции в хранилищах овощей и фруктов, повышая их устойчивость к заражению и замедляя процессы созревания, что, в свою



очередь, продлевает срок хранения [11; 15–16]. Обработка УФ-С оказывает влияние на патогены, напрямую вызывая окислительное повреждение органических молекул клетки [17; 18]. УФ-С инициирует генерацию активных форм кислорода (АФК), таких как гидроксильные радикалы и озон, что приводит к повреждению ДНК, дисфункции белков и углеводов, разрушению биомембран [19; 20].

Высшие растения, по сравнению с большинством грибных патогенов, менее чувствительны к УФ-С, однако высокие дозы также вызывают их повреждение [21]. Известно, что маломощное УФ-С-излучение может усиливать иммунитет растений вследствие индукции защитных механизмов на уровне экспрессии генов и активности белков [22]. Умеренное УФ-излучение способно стимулировать АФК-зависимые защитные реакции растений, запуская генетические программы устойчивости и индуцируя выработку вторичных метаболитов [20; 23; 24]. При оптимальном уровне использования обработка УФ приводит к накоплению целого комплекса сигнально-регуляторных молекул, которые играют важную роль в устойчивости растений к болезням [13].

Ряд исследований указывают на высокую эффективность обработки УФ-С по отношению к патогенным микромицетам, которые поражают овощи и фрукты (картофель, яблоки, томаты, цитрусовые, морковь, перец, виноград и др.) в хранилищах [1–6]. Использование УФ-С считается высокоперспективным для дезинфекции хранилищ зерна, овощей и фруктов, имеющих органический сертификат, поскольку, в отличие от биоцидов, химически не загрязняет продукты и помещения [25]. Это делает возможным более широкое применение УФ-дезинфекции в органической пищевой промышленности [11; 26]. В последние годы высокую актуальность представляют развитие и апробация технологий использования УФ-диодов низкой мощности, излучение которых менее опасно для человека (например, оператора, производящего дезинфекцию) [27].

Одними из наиболее важных представителей фитопатогенов, повреждающих растительную продукцию, являются грибы рода *Alternaria*. Они относятся к классу Dothideomycetes. Род *Alternaria* включает около 300 видов растительных сапротрофов или факультативных высокоспецифичных паразитов, встречающихся на всех органах растений и вызывающих пятнистости, называемые альтернариозами [28; 29]. Особенностью представителей рода *Alternaria* является то, что они накапливают меланин, это дает им возможность приспосабливаться к воздействию прямого солнечного света с высоким УФ-фоном [30]. Позволяет ли меланин видам рода *Alternaria* противостоять процедурам УФ-дезинфекции, в особенности с использованием светодиодного УФ-С-излучения малой мощности, пока неизвестно.

Целью настоящего исследования было установление особенностей воздействия УФ-излучения экспериментального УФ-диода малой мощности на рост и жизнеспособность мицелия двух видов рода *Alternaria* (*A. radicina* и *A. alternata*), вызывающих заболевания растений в полевых условиях и поражающих зерно, овощи и фрукты в хранилищах. В качестве источников УФ в работе использованы светодиоды с полосой излучения в области 250–315 нм, которые считаются наиболее перспективными для производства дезинфицирующих систем нового поколения.

Материалы и методы исследования

Тест-объектами выступали чистые культуры мицелиальных грибов *A. radicina* и *A. alternata*, предоставленные кафедрой ботаники биологического факультета БГУ и лабораторией иммунитета НППЦ НАН Беларуси по земледелию соответственно. Культивирование *A. radicina* и *A. alternata* осуществлялось на картофельно-глюкозном агаре согласно ранее разработанным методам [31; 32]. Среда имела следующий состав: картофель – 200 г/л, глюкоза – 20 г/л, агар – 15 г/л [33; 34]. После высевания на чашки Петри культура грибов подращивалась в течение 3 сут в термостате без освещения при постоянной температуре воздуха 25 °C.

В качестве УФ-излучателя использовался диодный источник света с пиковой длиной волны 280 нм (рис. 1, а), излучаемой мощностью 38,6 мВт, энергетической освещенностью 64,5 мВт/м² в диапазоне 280–315 нм и 45,7 мВт/м² в диапазоне 250–280 нм (оценка для расстояния 31,6 см от источника до объекта). УФ-диод и его технические характеристики были предоставлены ООО «ВерумАгро». УФ-диод фиксировался на штативе на высоте 10 см от поверхности среды в чашке с колониями грибов (см. рис. 1, б).

УФ-облучение чашек с колониями грибов *A. radicina* и *A. alternata* проводилось в открытом состоянии (снимались крышки) однократно на 3-и сутки культивирования в течение 30; 60 или 180 мин в ламинарном боксе, что в пересчете на дозу составило 1,2; 2,3 и 6,9 кДж/м² соответственно. Необработанные чашки (контроль) также открывались на 30; 60 и 180 мин в ламинарном боксе (таким же образом, как и обрабатываемые УФ чашки). Модификация роста под действием УФ-облучения в процентах и относительных единицах к исходному размеру колонии оценивалась по изменению площади колоний

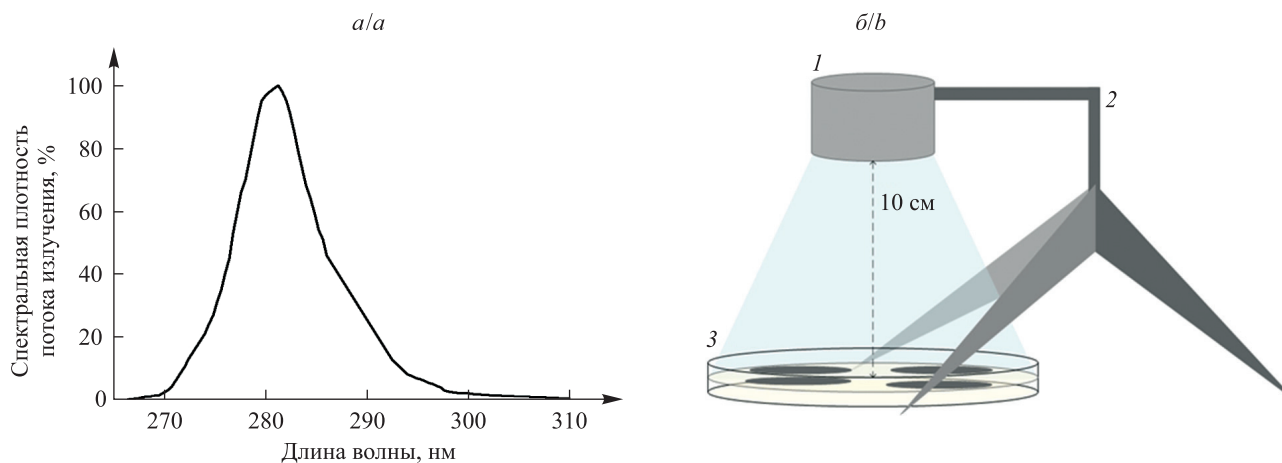


Рис. 1. Спектр излучения диодного источника УФ-С (а) и схема установки для облучения колоний грибов (б):
1 – УФ-диод; 2 – штатив; 3 – чашка Петри с колониями микромицетов

Fig. 1. The emission spectrum of the UV-C diode (a) and the installation scheme for irradiation of fungus colonies (b):
1 – UV diode; 2 – stand; 3 – Petri plate with micromycete colonies

через 3 и 5 сут после облучения. Для анализа ростовых процессов выполнялось фотографирование экспериментальных чашек с колониями грибов в стандартизованных условиях освещения на синем фоне. Расчет площади колоний проводился с помощью программного обеспечения с открытым исходным кодом *ImageJ* (НИН, США). Полученные данные обрабатывались с применением стандартных подходов биологической статистики [35]. Использовались следующие статистические характеристики: средняя арифметическая величина ($\bar{X}$) и ошибка средней величины ($S_{\bar{x}}$). Оценка достоверности различий измеряемых значений осуществлялась на основе парного *t*-критерия Стьюдента при уровне статистической значимости $p < 0,01$. Для дисперсионного анализа (*analysis of variance* (ANOVA)) применялся программный пакет *SigmaPlot 10.0* (*Systat Software Inc.*, США).

Результаты и их обсуждение

Первичная культура грибов выращивалась на агаризованной среде и использовалась для дальнейшего посева на опытные чашки. После 3-дневного культивирования колонии, обычно имеющие близкие размеры (площадь), облучались согласно методике, описанной в предыдущем разделе. На рис. 2, а, и рис. 3, а, представлены фотографии, демонстрирующие внешний вид типичных колоний *A. radicina* и *A. alternata* на 5-е сутки выращивания в контрольных условиях (без облучения) и после УФ-облучения. Средние значения размеров колоний приведены в виде диаграмм на рис. 2, б – г, и рис. 3, б – г. В контрольных опытах (без облучения) скорость увеличения площади колоний *A. radicina* и *A. alternata* была относительно высокой и в среднем составляла $(1,79 \pm 0,03)$ и $(1,35 \pm 0,11)$ см²/сут соответственно (оценка за 5 сут культивирования для 24 колоний каждого гриба ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)). Зарегистрированные ростовые показатели соответствуют литературным данным для различных микромицетов [36–38].

Данные, представленные на рис. 2, а, демонстрируют, что рост мицелия *A. radicina* замедлялся с увеличением времени воздействия УФ-С от 30 до 180 мин. В течение 3 сут после облучения обработанные УФ-С колонии практически не росли (их площадь не изменялась). Это наблюдалось во всех вариантах обработок (30; 60 и 180 мин облучения УФ-С). При открывании чашек без облучения в контрольной группе колонии продолжали расти. Соответственно, обработка УФ-С полностью подавляла развитие мицелия в первые 3 сут (см. рис. 2, а). Количественно это выражалось в том, что на 3-и сутки культивирования площадь облученных колоний была меньше площади контрольных колоний на 36 % при 30-минутном облучении, на 30 % при 60-минутном облучении и на 66 % при 180-минутном облучении (см. рис. 2, б – г).

На 5-е сутки размеры облученных колоний *A. radicina* снова начинали увеличиваться, т. е. рост мицелия восстанавливался. Следовательно, УФ-С подавлял, но не полностью останавливал рост колоний. Суммарно на 5-е сутки площадь облученных колоний была меньше, чем контрольных, на 35 % при 30-минутном облучении, на 34 % при 60-минутном облучении и на 62 % при 180-минутном облучении (см. рис. 2, б – г).

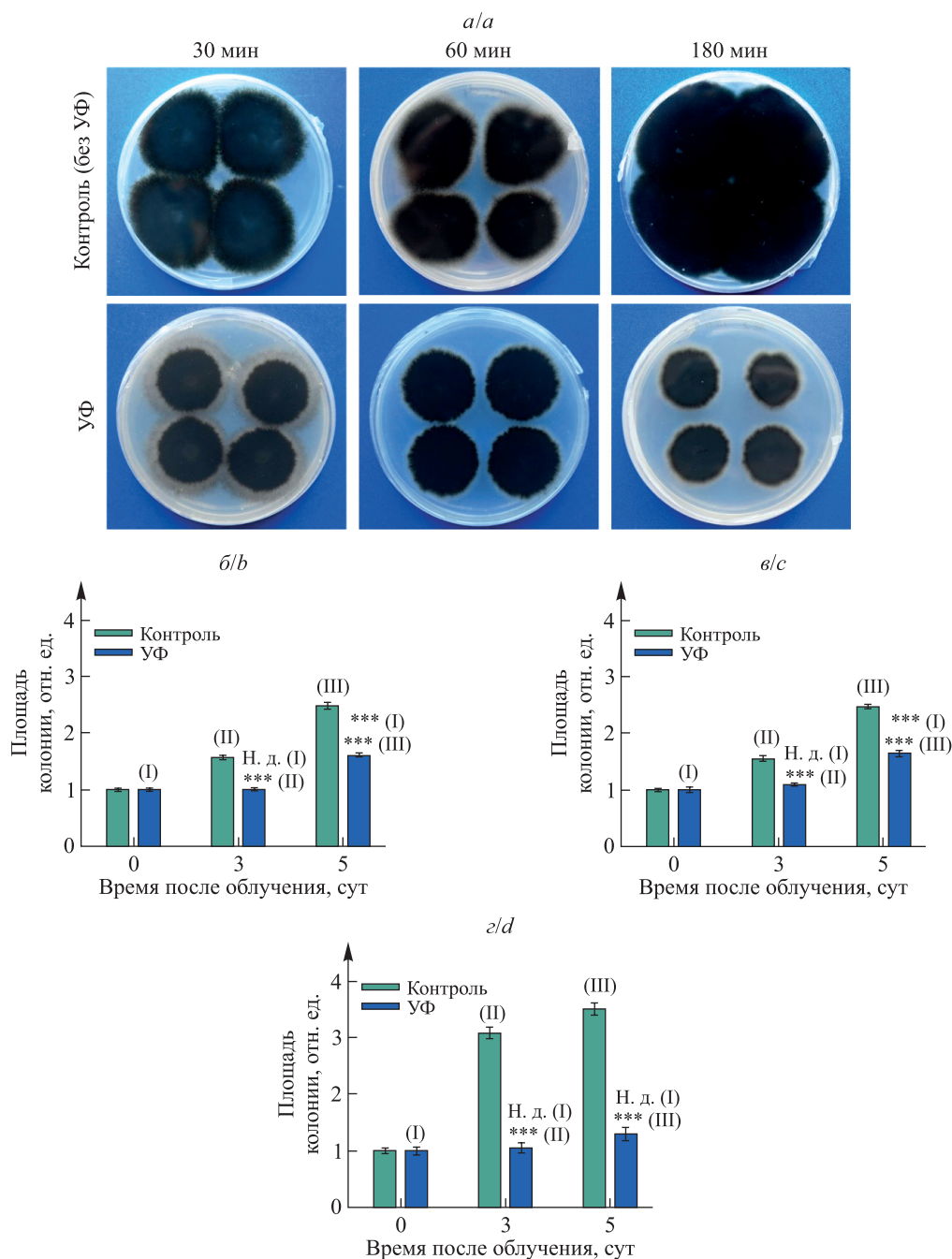


Рис. 2. Внешний вид колоний *A. radicina* на 5-е сутки культивирования в контрольных условиях (без облучения) и после УФ-облучения (а).

Значения площади колоний *A. radicina* в относительных единицах после 30 мин (б), 60 мин (в) и 180 мин (г) облучения ($X \pm S_x$, $n = 24$).

В случае контрольного опыта чашки открывались на 30; 60 или 180 мин (в соответствии со временем облучения опытной группы) в стерильных условиях.

Статистический анализ проведен для колоний, обработанных УФ-С, достоверность отличий рассчитывалась по отношению к площади колоний до облучения (I) и площади колоний в контрольных чашках на 3-и сутки (II) и 5-е сутки (III) после облучения; *** – $p < 0,0001$; н. д. – отсутствие достоверных отличий («недостаточно») (ANOVA-тест))

Fig. 2. Appearance of *A. radicina* colonies after the 5 d of cultivation under control conditions (without irradiation) and after UV irradiation (a).

Colony areas of *A. radicina*, in relative units, after 30 min (b), 60 min (c) and 180 min (d)

UV irradiation ($X \pm S_x$, $n = 24$). In the control experiment, the plates were opened for 30; 60 or 180 min (in accordance with the irradiation time of the experimental group), under sterile conditions.

Statistical analysis was carried out for the colonies treated with UV-C, the significance of differences was calculated in relation to the area of colonies before irradiation (I), and to the area of colonies in control plates after 3 d (II) and 5 d (III) after irradiation; *** – $p < 0.0001$; н. д. – statistical difference not determined («undetermined») (ANOVA test))

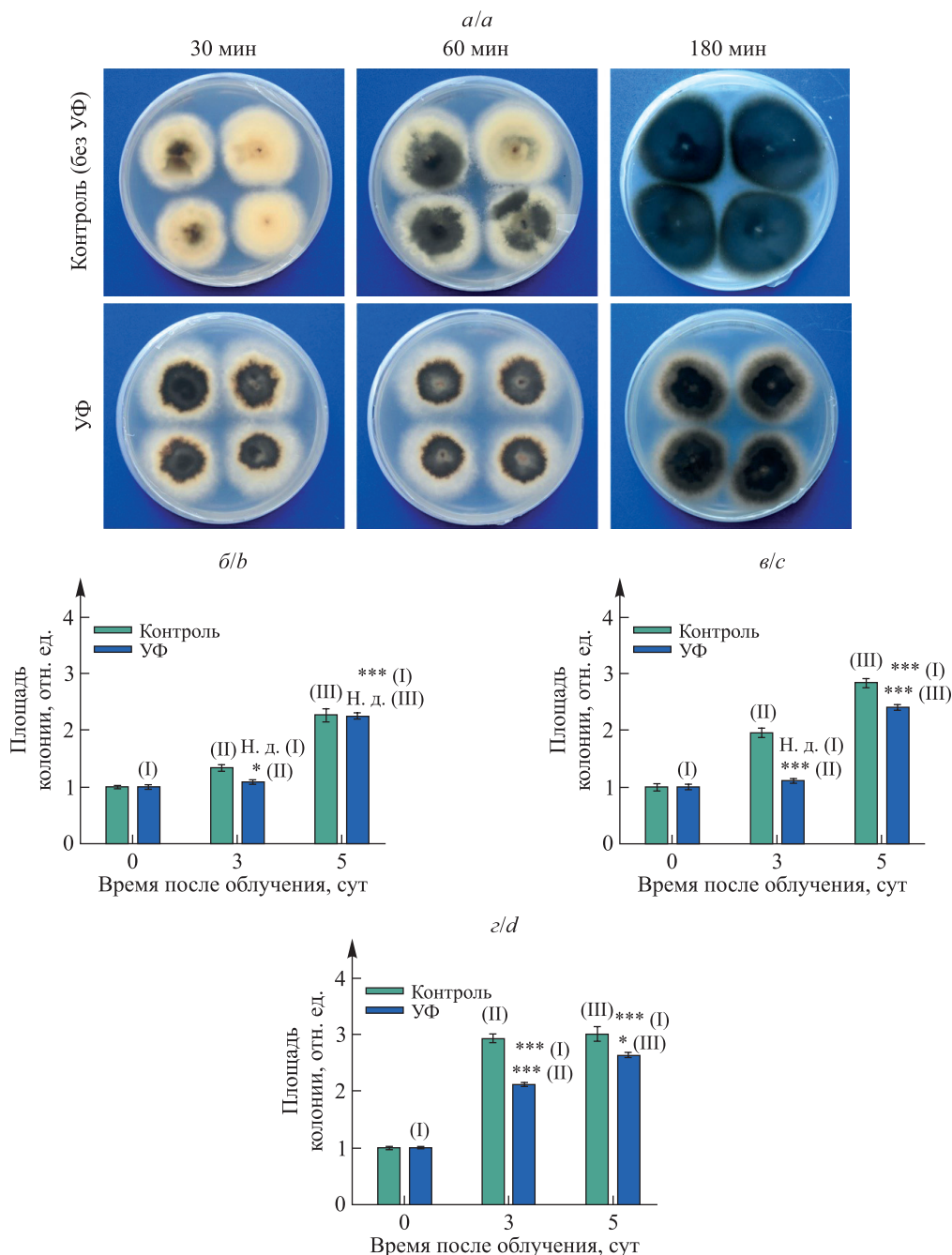


Рис. 3. Внешний вид колоний *A. alternata* на 5-е сутки культивирования в контрольных условиях (без облучения) и после УФ-облучения (а).

Значения площади колоний *A. alternata* в относительных единицах после 30 мин (б), 60 мин (в) и 180 мин (г) облучения ($X \pm S_x$, $n = 24$).

В случае контрольного опыта чашки открывались на 30; 60 или 180 мин (в соответствии со временем облучения опытной группы) в стерильных условиях.

Статистический анализ проведен для колоний, обработанных УФ-С, достоверность отличий рассчитывалась по отношению к площади колоний до облучения (I) и площади колоний в контрольных чашках на 3-и сутки (II) и 5-е сутки (III) после облучения; * – $p < 0,01$; *** – $p < 0,0001$; н. д. – отсутствие достоверных отличий («недостоверно» (ANOVA-тест))

Fig. 3. Appearance of *A. alternata* colonies after the 5 d of cultivation under control conditions (without irradiation) and after UV irradiation (a). Colony areas of *A. alternata*, in relative units, after 30 min (b), 60 min (c) and 180 min (d) UV irradiation ($X \pm S_x$, $n = 24$).

In the control experiment, the plates were opened for 30; 60 or 180 min (in accordance with the irradiation time of the experimental group), under sterile conditions. Statistical analysis was carried out for the colonies treated with UV-C, the significance of differences was calculated in relation to the area of colonies before irradiation (I), and to the area of colonies in control plates after 3 d (II) and 5 d (III) after irradiation;

* – $p < 0.01$; *** – $p < 0.0001$; н. д. – statistical difference not determined («undetermined» (ANOVA test))



На рис. 3 представлены данные о влиянии УФ-обработки на колонии *A. alternata*. Эффект УФ-С для данного гриба был слабее, чем для *A. radicina*. Тем не менее в случае 30-минутной обработки УФ-С на 3-и сутки наблюдалась статистически достоверная разница в размерах между облученными и необлученными колониями (см. рис. 3, б). Площадь облученных колоний на 3-и сутки после экспозиции была меньше площади необлученных на 19; 43 и 28 % для 30-, 60- и 180-минутного воздействия соответственно. На 5-е сутки рост облученных колоний *A. alternata* ускорялся, что качественно схоже с эффектом УФ-С на 5-е сутки для *A. radicina*. В этом случае для 30-минутной обработки УФ не наблюдалось статистически достоверной разницы между обработанной и контрольной группами, но для 60- и 180-минутной обработки она сохранялась и составляла около 15–20 %. Таким образом, на временном отрезке 3–5 сут был обнаружен эффект усиления ростовых процессов у *A. alternata* под действием УФ-С.

Заключение

В результате проведенных исследований было показано, что облучение патогенных микромицетов *A. radicina* и *A. alternata* УФ-диодом малой мощности ингибирует их рост на ранних этапах культивирования в экспериментальной системе (картофельно-глюкозный агар). Эффект особенно сильно проявляется в первые 3 сут, когда для *A. radicina* и *A. alternata* отмечено 100 % и 30–50 % снижение скорости роста соответственно. На 5-е сутки после облучения рост данных патогенных организмов восстанавливался, а в случае 30- и 60-минутного облучения *A. alternata* даже немного ускорялся. Подобные результаты свидетельствуют о том, что содержащие меланин микромицеты в целом устойчивы к светодиодному УФ-С-излучению малой мощности, однако даже эти патогенные организмы существенно замедляют свой рост в первые 3 сут после обработки УФ.

Согласно литературным данным в настоящее время эффективность использования УФ продемонстрирована в отношении родов *Aspergillus*, *Cladosporium* и *Penicillium* [39]. Результаты, представленные в настоящей работе, показывают, что рост *A. radicina* практически полностью подавляется на протяжении 3 сут после облучения светодиодным УФ-С. Таким образом, облучение с интервалами 3 сут может быть использовано для ослабления поражений, вызываемых данным микромицетом.

Для *A. alternata* отмечена высокая устойчивость к светодиодному УФ-С. Рост колоний этого гриба тормозился значительно слабее, чем рост колоний *A. radicina*. Соответственно, применение УФ-С для уничтожения инфекции, вызываемой *A. alternata*, может быть неэффективным. Литературные данные предполагают несколько возможных причин сохранения жизнеспособности колоний представителей рода *Alternaria* после воздействия УФ-излучения. Вероятно, УФ-облучение может приводить к повышению гетерокариотичности мицелия, обеспечивая тем самым приспособляемость гриба к стрессовым воздействиям [7]. Другой возможный механизм устойчивости связан с протекторной функцией меланина по отношению к УФ- и гамма-излучению, отмеченной у ряда пигментированных грибов [40]. Примечательно, что нарушение гена *BRM2*, кодирующего один из ключевых ферментов биосинтеза меланина у *A. alternata*, приводит к уменьшению размера конидий и количества перегородок в них, т. е. меланин и УФ как фактор, стимулирующий его образование, вероятно, требуются *A. alternata* для эффективного спороношения [21]. Для некоторых меланинсодержащих грибов в литературе также описана активация метаболических процессов и роста гиф в условиях действия УФ-излучения [41]. Предполагается, что меланиновые пигменты, участвуя в окислительно-восстановительных реакциях, способны воспринимать энергию излучения и делать ее доступной для метаболических процессов [41].

Библиографические ссылки

1. Peng Jin, Huanyu Wang, Yu Zhang, Yuping Huang, Li Wang, Yonghua Zheng. UV-C enhances resistance against gray mold decay caused by *Botrytis cinerea* in strawberry fruit. *Scientia Horticulturae*. 2017;225:106–111. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.06.062.
2. Liu J, Stevens C, Khan VA, Lu JY, Wilson CL, Adeyeye O, et al. Application of ultraviolet-C light on storage rots and ripening of tomatoes. *Journal of Food Protection*. 1993;56(10):868–873. DOI: 10.4315/0362-028X-56.10.868.
3. Ke Huang, Yong Zou, Jie Luo, Yiqing Liu. Combining UV-C treatment with biocontrol yeast to control postharvest decay of melon. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015;22(18):14307–14313. DOI: 10.1007/s11356-015-4687-0.
4. Esua OJ, Chin NL, Yusof YA, Sukor R. A review on individual and combination technologies of UV-C radiation and ultrasound in postharvest handling of fruits and vegetables. *Processes*. 2020;8(11):1433. DOI: 10.3390/pr8111433.
5. Rodov V, Ben-Yehoshua S, Kim JJ, Shapiro B, Ittah Y. Ultraviolet illumination induces scoparone production in kumquat and orange fruit and improves decay resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*. 1992;117(5):788–792. DOI: 10.21273/JASHS.117.5.788.
6. Koutchma T. *Ultraviolet light in food technology: principles and applications*. Boca Raton: CRC Press; 2019. 360 p. (Contemporary food engineering series).
7. Ичеткина АА, Трофимова СВ, Кряжев ДВ, Иванова ИП, Смирнов ВФ. Влияние ультрафиолетового излучения и излучения плазмы импульсного искрового разряда на зародышевые структуры и мицелий микромицетов-деструкторов. *Вестник Нижегородского университета имени Н. И. Лобачевского*. 2011;2(2):196–201.



8. Кражев ДВ, Ичеткина АА, Смирнов ВФ. Эффекты комбинированного действия низкоинтенсивного миллиметрового излучения и высокоинтенсивных химических и физических фунгицидных факторов. *Вестник Нижегородского университета имени Н. И. Лобачевского*. 2012;2(3):64–69.
9. Rupp S, Weber RWS, Rieger D, Detzel P, Hahn M. Spread of *Botrytis cinerea* strains with multiple fungicide resistance in German horticulture. *Frontiers in Microbiology*. 2017;7:2075. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02075.
10. del Rosario Valera M, Alvarino L, Iannaccone J. Toxicity of fungicide kresoxim – metil on seven bioindicators of environmental quality. *The Biologist (Lima)*. 2018;16(2):299–321.
11. Sun D-W, editor. *Emerging technologies for food processing*. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier; 2014. 666 p.
12. Wilson SC, Brasel TL, Carriker CG, Fortenberry GD, Fogle MR, Martin JM, et al. An investigation into techniques for cleaning mold-contaminated home contents. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 2004;1(7):442–447. DOI: 10.1080/15459620490462823.
13. Turtot M. Ultraviolet light treatment of fresh fruits and vegetables surface: a review. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. 2013;19(3):325–337.
14. Janisiewicz WJ, Conway WS. Combining biological control with physical and chemical treatments to control fruit decay after harvest. *Stewart Postharvest Review*. 2010;6(1):1–16. DOI: 10.2212/spr.2010.1.3.
15. Rodrigues S, Fernandes FAN, editors. *Advances in fruit processing technologies*. Boca Raton: CRC Press; 2012. 472 p. (Contemporary food engineering series).
16. Narayanasamy P. *Biological management of diseases of crops. Volume 2. Integration of biological control strategies with crop disease management systems*. Dordrecht: Springer; 2013. 364 p. (Progress in biological control; volume 16).
17. Stevens C, Wilson CL, Lu JY, Khan VA, Chalutz E, Droby S, et al. Plant hormesis induced by ultraviolet light-C for controlling postharvest diseases of tree fruits. *Crop Protection*. 1996;15(2):129–134. DOI: 10.1016/0261-2194(95)00082-8.
18. Vega K, Ochoa S, Patiño LF, Herrera-Ramírez JA, Gómez JA, Quijano JC. UV-C radiation for control of gray mold disease in postharvest cut roses. *Journal of Plant Protection Research*. 2020;60(4):351–361. DOI: 10.24425/jppr.2020.133957.
19. Sinha RP, Häder D-P. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2002;1(4):225–236. DOI: 10.1039/B201230H.
20. Urban L, Charles F, de Miranda MRA, Aarrouf J. Understanding the physiological effects of UV-C light and exploiting its agronomic potential before and after harvest. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2016;105:1–11. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.04.004.
21. Aarrouf J, Urban L. Flashes of UV-C light: an innovative method for stimulating plant defences. *Plos One*. 2020;15(7):e0235918. DOI: 10.1371/journal.pone.0235918.
22. Kawamura C, Tsujimoto T, Tsuge T. Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 1999;12(1):59–63. DOI: 10.1094/MPMI.1999.12.1.59.
23. Сазанова КВ, Кирцидели ИЮ. Влияние ультрафиолетового облучения на микроскопические грибы, изолированные из антарктических местообитаний. *Микология и фитопатология*. 2014;48(5):315–321.
24. Palou L, Smilanick JL, editors. *Postharvest pathology of fresh horticultural produce*. Boca Raton: CRC Press; 2019. 842 p.
25. Лаврентьева ЛВ, Авдеев СМ, Соснин ЭА, Величевская КЮ. Бактерицидное действие ультрафиолетового излучения эксимерных и эксиплексных ламп на чистые культуры микроорганизмов. *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2008;2:18–27.
26. Levetin E, Shaughnessy R, Rogers CA, Scheir R. Effectiveness of germicidal UV radiation for reducing fungal contamination within air-handling units. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67(8):3712–3715. DOI: 10.1128/AEM.67.8.3712-3715.2001.
27. Dai T, Vrahas MS, Murray CK, Hamblin MR. Ultraviolet C irradiation: an alternative antimicrobial approach to localized infections? *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2012;10(2):185–195. DOI: 10.1586/eri.11.166.
28. Ганнибал ФБ. Мониторинг альтернариозов сельскохозяйственных культур и идентификация грибов рода *Alternaria*. Санкт-Петербург: Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений; 2011. 70 с.
29. Орина АС, Ганнибал ФБ, Левитин ММ. Видовое разнообразие, биологические особенности и география грибов рода *Alternaria*, ассоциированных с растениями семейства Solanaceae. *Микология и фитопатология*. 2010;44(2):150–159.
30. Carzaniga R, Fiocco D, Bowyer P, O'Connell RJ. Localization of melanin in conidia of *Alternaria alternata* using phage display antibodies. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2002;15(3):216–224. DOI: 10.1094/MPMI.2002.15.3.216.
31. Хохряков МК, составитель. *Методические указания по экспериментальному изучению фитопатогенных грибов*. Ленинград: ВИЗР; 1979. 78 с.
32. Дудка ИА, Вассер СП, Элланская ИА, Коваль ЭЗ, Горбик ЛТ, Никольская ЕА и др. *Методы экспериментальной микологии*. Билай ВИ, редактор. Киев: Наукова думка; 1982. 552 с.
33. U. S. *Pharmacopoeia XXIII*. Easton: Mack Printing Company; 1995. 313 p.
34. Семенов СМ. *Лабораторные среды для актиномицетов и грибов*. Москва: Агропромиздат; 1990. 239 с.
35. Рокицкий ПФ. *Биологическая статистика*. Минск: Вышэйшая школа; 1973. 320 с.
36. Zhu XQ, Xiao CL. Phylogenetic, morphological and pathogenic characterization of *Alternaria* species associated with fruit rot of blueberry in California. *Phytopathology*. 2015;105(12):1555–1567. DOI: 10.1094/PHYTO-05-15-0122-R.
37. Шашко ЮК. Скорость роста мицелия грибов рода *Fusarium* как показатель агрессивности фитопатогенов. *Вестник Марийского государственного университета. Серия: Сельскохозяйственные науки. Экономические науки*. 2020;6(1):66–73. DOI: 10.30914/2411-9687-2020-6-1-66-73.
38. Сидорова СГ. Антифунгальная активность актиномицетов в отношении возбудителя фузариоза томата. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;3:21–32. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-3-21-32.
39. Valero A, Begum M, Leong SL, Hocking AD, Ramos AJ, Sanchis V, et al. Effect of germicidal UVC light on fungi isolated from grapes and raisins. *Letters in Applied Microbiology*. 2007;45(3):238–243. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02175.x.
40. Nosanchuk JD, Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50(11):3519–3528. DOI: 10.1128/AAC.00545-06.
41. Гесслер НН, Егорова АС, Белозерская ТА. Меланиновые пигменты грибов в экстремальных условиях существования (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2014;50(2):125–134.



References

1. Peng Jin, Huanyu Wang, Yu Zhang, Yuping Huang, Li Wang, Yonghua Zheng. UV-C enhances resistance against gray mold decay caused by *Botrytis cinerea* in strawberry fruit. *Scientia Horticulturae*. 2017;225:106–111. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.06.062.
2. Liu J, Stevens C, Khan VA, Lu JY, Wilson CL, Adeyeye O, et al. Application of ultraviolet-C light on storage rots and ripening of tomatoes. *Journal of Food Protection*. 1993;56(10):868–873. DOI: 10.4315/0362-028X-56.10.868.
3. Ke Huang, Yong Zou, Jie Luo, Yiqing Liu. Combining UV-C treatment with biocontrol yeast to control postharvest decay of melon. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015;22(18):14307–14313. DOI: 10.1007/s11356-015-4687-0.
4. Esua OJ, Chin NL, Yusof YA, Sukor R. A review on individual and combination technologies of UV-C radiation and ultrasound in postharvest handling of fruits and vegetables. *Processes*. 2020;8(11):1433. DOI: 10.3390/pr8111433.
5. Rodov V, Ben-Yehoshua S, Kim JJ, Shapiro B, Ittah Y. Ultraviolet illumination induces scoparone production in kumquat and orange fruit and improves decay resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*. 1992;117(5):788–792. DOI: 10.21273/JASHS.117.5.788.
6. Koutchma T. *Ultraviolet light in food technology: principles and applications*. Boca Raton: CRC Press; 2019. 360 p. (Contemporary food engineering series).
7. Ichetkina AA, Trofimova SV, Kryazhev DV, Ivanova IP, Smirnov VF. The effect of ultraviolet radiation and radiation from pulse spark discharge plasma on the embryonic structures and mycelium of micromycetes-destructors. *Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod*. 2011;2(2):196–201. Russian.
8. Kryazhev DV, Ichetkina AA, Smirnov VF. Combined effects of low-intensity millimeter radiation and high-intensity chemical and physical antifungal factors. *Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod*. 2012;2(3):64–69. Russian.
9. Rupp S, Weber RWS, Rieger D, Detzel P, Hahn M. Spread of *Botrytis cinerea* strains with multiple fungicide resistance in German horticulture. *Frontiers in Microbiology*. 2017;7:2075. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02075.
10. del Rosario Valera M, Alvarino L, Iannacone J. Toxicity of fungicide kresoxim – metil on seven bioindicators of environmental quality. *The Biologist (Lima)*. 2018;16(2):299–321.
11. Sun D-W, editor. *Emerging technologies for food processing*. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier; 2014. 666 p.
12. Wilson SC, Brasel TL, Carriker CG, Fortenberry GD, Fogle MR, Martin JM, et al. An investigation into techniques for cleaning mold-contaminated home contents. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 2004;1(7):442–447. DOI: 10.1080/15459620490462823.
13. Turtoi M. Ultraviolet light treatment of fresh fruits and vegetables surface: a review. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. 2013;19(3):325–337.
14. Janisiewicz WJ, Conway WS. Combining biological control with physical and chemical treatments to control fruit decay after harvest. *Stewart Postharvest Review*. 2010;6(1):1–16. DOI: 10.2212/spr.2010.1.3.
15. Rodrigues S, Fernandes FAN, editors. *Advances in fruit processing technologies*. Boca Raton: CRC Press; 2012. 472 p. (Contemporary food engineering series).
16. Narayanasamy P. *Biological management of diseases of crops. Volume 2. Integration of biological control strategies with crop disease management systems*. Dordrecht: Springer; 2013. 364 p. (Progress in biological control; volume 16).
17. Stevens C, Wilson CL, Lu JY, Khan VA, Chalutz E, Droby S, et al. Plant hormesis induced by ultraviolet light-C for controlling postharvest diseases of tree fruits. *Crop Protection*. 1996;15(2):129–134. DOI: 10.1016/0261-2194(95)00082-8.
18. Vega K, Ochoa S, Patiño LF, Herrera-Ramírez JA, Gómez JA, Quijano JC. UV-C radiation for control of gray mold disease in postharvest cut roses. *Journal of Plant Protection Research*. 2020;60(4):351–361. DOI: 10.24425/jppr.2020.133957.
19. Sinha RP, Häder D-P. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2002;1(4):225–236. DOI: 10.1039/B201230H.
20. Urban L, Charles F, de Miranda MRA, Aarouf J. Understanding the physiological effects of UV-C light and exploiting its agronomic potential before and after harvest. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2016;105:1–11. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.04.004.
21. Aarouf J, Urban L. Flashes of UV-C light: an innovative method for stimulating plant defences. *Plos One*. 2020;15(7):e0235918. DOI: 10.1371/journal.pone.0235918.
22. Kawamura C, Tsujimoto T, Tsuge T. Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 1999;12(1):59–63. DOI: 10.1094/MPMI.1999.12.1.59.
23. Sazanova KV, Kirtsideli IYu. Influence of UV-irradiation on microfungi, isolated from antarctic habitats. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2014;48(5):315–321. Russian.
24. Palou L, Smilanick JL, editors. *Postharvest pathology of fresh horticultural produce*. Boca Raton: CRC Press; 2019. 842 p.
25. Lavrentieva LV, Avdeev SM, Sosnin EA, Velichevskaya KYu. [Bactericidal effect of UV radiation of excimer and exciplex lamps on cultures of microorganisms]. *Tomsk State University Journal of Biology*. 2008;2:18–27. Russian.
26. Levetin E, Shaughnessy R, Rogers CA, Scheir R. Effectiveness of germicidal UV radiation for reducing fungal contamination within air-handling units. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67(8):3712–3715. DOI: 10.1128/AEM.67.8.3712-3715.2001.
27. Dai T, Vrahas MS, Murray CK, Hamblin MR. Ultraviolet C irradiation: an alternative antimicrobial approach to localized infections? *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2012;10(2):185–195. DOI: 10.1586/eri.11.166.
28. Gannibal FB. *Monitoring al'ternariozov sel'skokhozyaistvennykh kul'tur i identifikatsiya gribov roda Alternaria* [Monitoring of alternarioses of crops and identification of fungi of the genus *Alternaria*]. Saint Petersburg: All-Russian Institute of Plant Protection RAAS; 2011. 70 p. Russian.
29. Orina AS, Gannibal FB, Levitin MM. [Species diversity, biological characteristics and geography of *Alternaria* associated with Solanaceae plants]. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2010;44(2):150–159. Russian.
30. Carzaniga R, Fiocco D, Bowyer P, O'Connell RJ. Localization of melanin in conidia of *Alternaria alternata* using phage display antibodies. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2002;15(3):216–224. DOI: 10.1094/MPMI.2002.15.3.216.
31. Khokhryakov MK, compiler. *Metodicheskie ukazaniya po eksperimental'nomu izucheniyu fitopatogennykh gribov* [Guidelines for the experimental study of phytopathogenic fungi]. Leningrad: VIZR; 1979. 78 p. Russian.
32. Dudka IA, Vasser SP, Ellanskaya IA, Koval' EZ, Gorbik LT, Nikol'skaya EA, et al. *Metody eksperimental'noi mikologii* [Experimental mycology methods]. Bilai VI, editor. Kyiv: Naukova dumka; 1982. 552 p. Russian.



33. *U. S. Pharmacopoeia XXIII*. Easton: Mack Printing Company; 1995. 313 p.
34. Semenov SM. *Laboratornye sredy dlya aktinomitsvetov i gribov* [Laboratory media for actinomycetes and fungi]. Moscow: Agropromizdat; 1990. 239 p. Russian.
35. Rokitskii PF. *Biologicheskaya statistika* [Biological statistics]. Minsk: Vyshhejschaja shkola; 1973. 320 p. Russian.
36. Zhu XQ, Xiao CL. Phylogenetic, morphological and pathogenic characterization of *Alternaria* species associated with fruit rot of blueberry in California. *Phytopathology*. 2015;105(12):1555–1567. DOI: 10.1094/PHYTO-05-15-0122-R.
37. Shashko YuK. Mycelium growth rate of *Fusarium* fungi as an indicator of phytopathogen aggressiveness. *Vestnik of the Mari State University. Chapter: Agriculture. Economics*. 2020;6(1):66–73. Russian. DOI: 10.30914/2411-9687-2020-6-1-66-73.
38. Sidorova SG. The antifungal activity of ray fungum against the fusarium wilt causal agent of tomato. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;3:21–32. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-3-21-32.
39. Valero A, Begum M, Leong SL, Hocking AD, Ramos AJ, Sanchis V, et al. Effect of germicidal UVC light on fungi isolated from grapes and raisins. *Letters in Applied Microbiology*. 2007;45(3):238–243. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02175.x.
40. Nosanchuk JD, Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50(11):3519–3528. DOI: 10.1128/AAC.00545-06.
41. Gessler NN, Egorova AS, Belozerskaya TA. Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2014;50(2):125–134. Russian.

Получена 09.05.2021 / исправлена 26.05.2021 / принята 26.05.2021.
Received 09.05.2021 / revised 26.05.2021 / accepted 26.05.2021.

УДК 631.872:631.46

ЛИГНИНОВЫЕ ФЕНОЛЫ КАК ОСНОВА БИОПРЕПАРАТОВ

И. В. КОВАЛЕВ¹⁾, Н. О. КОВАЛЕВА¹⁾

¹⁾Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1, 119991, г. Москва, Россия

Изучены содержание и состав лигнинных фенолов в растениях и почвах широтных поясов и вертикальных природных зон Северного Кавказа и Северо-Западного Тянь-Шаня. Выявлена особая роль лигнинных фенолов подземных органов растений в процессе гумификации. Показано, что при трансформации органического вещества от живых растительных тканей до гуминовых кислот почв возрастает степень окисленности биополимера. Рассчитана доля лигнинных фрагментов, остающихся неизменными при биотрансформации полимера в ряду *растительные ткани – опад – подстилки – почвы – гуминовые кислоты – погребенные гуминовые кислоты*. Продемонстрировано также, что биохимический состав растений оказывает решающее влияние на структуру гуминовых кислот почв. С помощью количественного анализа лигнинных фенолов и ¹³C-ЯМР-спектроскопии доказывается, что лигнин высших растений принимает участие в формировании как алифатических, так и ароматических частей молекул гуминовых кислот. Предложены области применения лигнинных фенолов в практике сельского хозяйства.

Ключевые слова: лигнинные фенолы; трансформация лигнина; гуминовые кислоты; биопрепараты; плодородие почв.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 17-14-01120п в рамках госзаданий Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова № 117031410017-4 и № 121040800146-3.

Образец цитирования:

Ковалев ИВ, Ковалева НО. Лигнинные фенолы как основа биопрепаратов. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021;2:29–42.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-29-42>

For citation:

Kovalev IV, Kovaleva NO. Lignin phenols as a basis for biopreparations. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;2:29–42. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-29-42>

Авторы:

Иван Васильевич Ковалев – доктор сельскохозяйственных наук; ведущий научный сотрудник кафедры физики и мелиорации почв факультета почвоведения.

Наталья Олеговна Ковалева – доктор биологических наук, профессор; заведующий лабораторией экологического почвоведения кафедры географии почв факультета почвоведения.

Authors:

Ivan V. Kovalev, doctor of science (agricultural science); leading researcher at the department of soil physics and reclamation, faculty of soil science.

kovalevmsu@mail.ru

Natalia O. Kovaleva, doctor of science (biology), full professor; head of the laboratory of ecological soil science, department of soil geography, faculty of soil science.

natalia_kovaleva@mail.ru



LIGNIN PHENOLS AS A BASIS FOR BIOPREPARATIONS

I. V. KOVALEV^a, N. O. KOVALEVA^a

^aLomonosov Moscow State University, 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

Corresponding author: I. V. Kovalev (kovalevmsu@mail.ru)

The content and composition of lignin phenols in plants and soils of latitudinal zones and vertical natural zones of the North Caucasus and Northwest Tien Shan have been studied. The special role of lignin phenols of underground plant organs in the process of humification was revealed. It was shown that the oxidation degree of the biopolymer increases during the transformation of organic matter from living plant tissues to humic acids in soils. The fraction of lignin fragments that remain unchanged during the biotransformation of the polymer in the row *plant tissues – fall – litter – soils – humic acids – buried humic acids* is calculated. It has also been demonstrated that the biochemical composition of plants has a decisive effect on the structure of humic acids in soils. With the help of quantitative analysis of lignin phenols and ¹³C NMR spectroscopy, it is proved that lignin of higher plants is involved in the formation of humic acids, both aliphatic and aromatic parts of molecules. The areas of application of lignin phenols in the practice of agriculture and medicine are proposed.

Keywords: lignin phenols; transformation of lignin; humic acids; biomarkers; soil fertility.

Acknowledgements. We thank Russian Science Foundation for the financial support of this investigation (grant No. 17-14-01120п); state assignments of the Lomonosov Moscow State University No. 117031410017-4 and No. 121040800146-3.

Введение

Важнейшие экологические функции гуминовых веществ – физиологическая и биопротекторная – в настоящее время активно используются в прикладной области производителями и потребителями широчайшего круга гуминовых препаратов, получаемых из самых разных источников [1]. Например, гидролизный лигнин из отхода производства превратился в ценное сырье для сельского хозяйства (био-препараты и удобрения). Для этого потребовались анализ всего имеющегося материала и пересмотр отношения к лигнину [2]. Сейчас гуминовые препараты имеют исключительно широкий спектр использования – от традиционных областей применения в промышленности, растениеводстве и животноводстве до медицины и биотехнологий очистки и ремедиации загрязненных почв и ландшафтов. Так, экспериментально подтверждены возможность ассимиляции растениями готовых органических соединений, в частности гуминовых веществ и, как следствие, изменение биохимического состава растений и увеличение его энергоемкости, например рост содержания лигнина в проростках амаранта [3], хотя данная реалистичная мембранотропная гипотеза этого процесса пока не получила убедительного подтверждения.

Высокомолекулярные соединения лигнина, обладая ценными свойствами, находят широкое применение в производстве гуминовых препаратов для внесения в почву и растения. Однако понимание структуры макромолекул лигнина древесных и травянистых растений и дальнейшая их трансформация в почве все еще остаются малоизученными. Недостаточная изученность лигнина как одного из самых распространенных в биосфере биополимеров, поступающего в почву с надземной и подземной биомассой растений, была обусловлена трудностью его биохимической диагностики в почвах.

Неуклонное развитие методов тонкой биохимии почв и использование нанотехнологий в почвенных исследованиях дают возможность по-новому взглянуть на устоявшиеся научные парадигмы, в том числе теорию гумусообразования, в целях получения биопрепаратов с уникальными свойствами и разработки способов управления почвенным плодородием.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись:

- экосистемы горизонтального ряда – евразийские леса из сосны, лиственницы, кедра, ели, пихты, южнотаетжные березово-осиновые леса и агроэкосистемы, в том числе осушенные, Коломенского ополья Московской области, дубово-липовые широколиственные леса (Тульские засеки) на серых лесных почвах, березовые колки лесостепи и агроэкосистемы Брянской области на агросерых почвах и заповедник «Брянский лес», типичный чернозем (Курский биосферный заповедник), тропический лес Амазонии на красноземах (Бразилия);



• экосистемы вертикальных природных зон Тянь-Шаня – разнотравье степи на горных черноземах, можжевельниковое редколесье на горных коричневых почвах, орехово-плодовый лес на горных черно-коричневых почвах, сосновый лес и субальпийский луг на горных черноземовидных и горно-луговых субальпийских почвах и альпийский луг на горно-луговых альпийских почвах.

Поскольку результаты, получаемые общепринятыми методами выделения лигнина (лигнин Классона, остаточный лигнин), слишком грубы даже для растительных материалов и чрезвычайно завышены для образцов подстилки и почвы, была использована методика Ертеля и Хеджеса [4] в приведенной ниже модификации Амелунга [5; 6]. Определение лигнина в почвах включало щелочное окисление образца оксидом меди при 170 °C под давлением в азотной среде, осаждение гуминовых кислот, концентрацию фенольных продуктов под давлением на компактных одноразовых колонках C18. Колонки, после того как через них пропустили образец, высушивались, а лигнин растворялся в этилацетате. Процедура эвапорирования этилацетата на ротационном испарителе позволила выделить собственно препараты лигнина. Составляющие лигнин фенолы, после предварительной дериватизации и превращения их в триметилсилиловые эфиры на газовом хроматографе с масс-спектрометром Hewlett-Packard Palo Alto (США), разделялись на пламенно-ионизационном детекторе, оборудованном капиллярной колонкой. Индивидуальные продукты реакции – ванилин, синрингиловый альдегид, ванилиновая, синрингиловая, п-кумаровая и феруловая кислоты – идентифицированы путем сравнения времени удерживания (в минутах) и пиков с известными компонентами и количествами, используемыми в качестве внешних стандартов. Площади пиков интегрируются, и окончательные результаты представляются в миллиграммах на 1 г углерода (далее – $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$). Щелочное окисление исследуемых образцов оксидом меди дало 11 фенолов, которые сгруппированы по их химической природе в три структурных семейства: ванилиновые, или гваяциловые (V), синрингиловые, или сиреневые (S), циннамилловые (C), включая п-кумаровые (K) и феруловые (F), фенолы. Суммарное количество продуктов окисления лигнина (VSC) отражает его общее содержание в образце.

В препаратах гуминовых кислот были сняты ^{13}C -ЯМР-спектры. Препараты гуминовых кислот выделялись из исследуемых почв трехкратной экстракцией 0,1 н. NaOH и 0,4 моль/л NaF из декальцированных 0,05 н. H_2SO_4 образцов. После отделения коллоидов центрифугированием (2500 г, 15 мин; центрифуга Beckman J6 (США)) осуществляли очистку препаратов гуминовых кислот от минеральных солей электродиализом (MWCO 12 000–14 000). Отдиализованные и высушенные вымораживанием препараты гуминовых кислот (50 мг) растворяли в 0,6 мл 0,3 моль/л NaOD/D₂O. Съемка спектров осуществлялась на ЯМР-спектрометре Bruker Avance DRX 500 (Германия) при 290 К с частотой 25,18 МГц. В 10 препаратах гуминовых кислот выполнено определение содержания лигниновых фенолов [7]. Статистическую обработку полученных данных проводили с применением программ *Excel 2010* и *Statistica 20.0* (StatSoft Inc., США).

Результаты и их обсуждение

Разработана и апробирована системная методология изучения биохимического круговорота продуктов окисления лигнина в различных биомах и основных типах почв (серых лесных, черноземах, красноземах и др.), в том числе почв сельскохозяйственного использования. Трансформация биополимера впервые изучена практически во всех звеньях цепи, начиная от растительных тканей и опада и заканчивая гумусовыми веществами. Предложена научная гипотеза, объясняющая генезис продуктов окисления лигнина в составе гумуса отдельных типов почв в различных природных зонах и позициях ландшафта с учетом биохимического состава растений. Изучены факторы и установлены причинно-следственные связи состава органического вещества почв (гумуса) и биохимического состава различных частей растений, выявлена особая роль лигниновых фенолов подземных органов растений в процессе гумификации. Показаны закономерности трансформации лигнина в почвах в зависимости от термодинамических условий среды и агроантропогенного использования. Раскрыты пути и механизмы стабилизации продуктов окисления лигнина на всех уровнях структурной организации почв: в геохимически сопряженных катенах, по профилю почв, в почвенных агрегатах и конкреционных новообразованиях, гранулометрических фракциях, на уровне молекулярных взаимодействий [5; 7–10].

В частности, подтверждены существующие закономерности и обнаружены три известных типа лигнина.

Во-первых, лигнин хвойных растений (мягкий древесный лигнин), содержащий ванилиновые (гваяциловые) фенолы в качестве основной структурной единицы (до $60 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$ – можжевельник, до $80 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$ – опад пихты). Сиреневые и циннамилловые кислоты и альдегиды в хвое практически отсутствуют, и отношение синрингиловых фенолов к ванилиновым (S/V) близко к нулю. Впервые установлен химический состав лигнина из тканей можжевельника. Соотношение V : S : C в нем составило 41 : 1 : 2 [8; 9].



Во-вторых, лигнин лиственных деревьев (тяжелый древесный лигнин), преимущественно состоящий из примерно равного количества ванилиновых (гваяциловых) и сиригилловых (сиреневых) структур [8; 9]. При этом лигнин тканей лиственных пород горных лесов Кавказа (бук, каштан) почти не отличается от лигнина листвы пород умеренного пояса и орехово-плодового горного леса Тянь-Шаня и имеет действительно близкие количества ванилиновых и сиригилловых фенолов. Содержание циннамиловых (п-кумаровых и феруловых) фенолов близко к нулю. В мелколиственных породах умеренного пояса композиционные соотношения составили 4 : 4 : 1; 2 : 1 : 1, а в тканях широколиственных растений – 8 : 2 : 1. Отсутствие кумаровых и феруловых фенолов и нехарактерные для широколиственных пород следовые количества сиреневого альдегида обнаруживают опад тропических древесных растений Амазонии, п-кумаровые кислоты отсутствуют и в древесине хвойных растений – сосны и можжевельника.

В-третьих, лигнин травянистых растений, которым присуще наибольшее количество циннамиловых структурных единиц: их содержание в степных и луговых злаках и разнотравье возрастает до 20–30 мг · г⁻¹ C_{орг}, что в 4–6 раз больше, чем у древесных растений. Феруловые кислоты ассоциированы главным образом с гемицеллюлозами в клеточных стенках волокон злаков [8; 9].

Таким образом, полученные данные не противоречат известным закономерностям формирования обсуждаемого биополимера в природе [11] и подтверждают существование трех групп источников лигнина в почве. Первая группа – хвоя и древесина хвойных пород с ванилиновыми (гваяциловыми) фенолами в качестве основной структурной единицы, вторая группа – недревесные ткани лиственных деревьев, состоящие из ванилиновых и сиригилловых фенолов, третья группа – травы, содержащие не только ванилиновые (гваяциловые) и сиригилловые, но и кумаровые и феруловые фенолы, последние преимущественно сосредоточены в тканях злаков. Окисление и хроматографическое разделение биополимеров лигнина на простые фенолы позволяют получить информацию о типах растительных тканей. Кроме того, параметр S/V может использоваться для разделения тканей голосеменных и покрытосеменных растений, а параметр C/V (отношение циннамиловых фенолов к ванилиновым) – для разделения органического вещества древесного и недревесного происхождения. Тип растительных тканей изначально создает неравные условия для превращения ароматических компонентов растительного происхождения в ароматические соединения почв.

Лигнин (VSC) в подстилках, ветоши. Выделение продуктов окисления лигнина из подстилок разных типов растительных ассоциаций показало, что различия лигниновых параметров в них менее контрастны, а содержание лигнина значительно ниже, чем в живых растительных тканях.

Минимальное содержание лигнина отмечено для горизонтов F и H подстилок елового (3,06 мг · г⁻¹ C_{орг}), кедрового (3,08 мг · г⁻¹ C_{орг}) [8], осинового (4 мг на 100 г почвы) и букового (6,5 мг на 100 г почвы) лесов. Максимальные запасы лигнина обнаружены в высокогорных экосистемах можжевельного редколесья (491 мг на 100 г почвы) и пихтового леса (186 мг на 100 г почвы). Березовые криволесья (26 мг на 100 г), орехово-плодовый (53 мг на 100 г) и сосновый (42 мг на 100 г) леса отличаются средним содержанием лигнина в подстилках. Хотя композиционно подстилки повторяют присущие живым тканям закономерности: подстилки хвойных пород характеризуются накоплением ванилиновых (гваяциловых) фенолов – до 33 мг · г⁻¹ C_{орг} под кроной можжевельника – и сохраняют тенденцию к меньшему содержанию сиригилловых и циннамиловых (п-кумаровых и феруловых) структур (табл. 1).

Таблица 1

Содержание лигнина, лигниновые параметры
в горизонтах F и H лесных подстилок хвойных пород

Table 1

Lignin content, lignin parameters
in the F and H horizons of coniferous forest litters

Экосистема	Лигнин (VSC)*, мг · г ⁻¹ C _{орг}	V	S	C	S/V	C/V	K/F	V : S : C
Еловый лес	3,06 ± 0,08	1,24	1,14	0,68	0,92	0,55	0	2 : 1 : 1
Сосновый лес	13,70 ± 2,34	6,77	3,73	3,19	0,55	1,47	1,13	2 : 1 : 1
Кедровый лес	3,08 ± 0,67	1,47	0	1,11	0	0,83	0,70	1 : 0 : 1
Лиственный лес	9,71 ± 2,11	3,75	2,15	3,22	0,73	0,86	0,66	2 : 1 : 1
Пихтовый лес	5,77 ± 0,23	3,45	1,57	0,75	0,46	0,22	0	5 : 2 : 1
Тропический лес	7,79 ± 3,12	3,94	3,78	0,22	0,96	0,06	0,44	1 : 1 : 0
Можжевельный лес: под кроной	62,56 ± 5,67	32,70	18,83	11,06	0,58	0,32	0,68	3 : 2 : 1
на поляне	12,86 ± 1,99	5,70	5,72	1,64	1,00	0,29	0,70	4 : 4 : 1

Примечание. * – среднее значение плюс-минус стандартное отклонение ($p < 0,05$; $n = 4-5$); K/F – отношение кумаровых кислот к феруловым.



Подстилки лиственных пород имеют примерно равные соотношения ванилиновых и сиригильовых фенолов и меньшее, по сравнению с кумаровыми, количество феруловых кислот ($V : S : C = 4 : 4 : 1$; $2 : 1 : 1$) (табл. 2). Значительное уменьшение продуктов окисления лигнина (VSC) характерно для буково-грабово-каштанового опада (с $10,4$ до $2,2 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$), опада в березовой (с $24,5$ до $10,9 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$) и осиновой (с $9,3$ до $1,6 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$) рощах.

Таблица 2

Содержание лигнина, лигниновые параметры
в горизонтах F и H лесных подстилок лиственных пород

Table 2

Lignin content, lignin parameters
in the F and H horizons of forest litters of deciduous species

Экосистема	Лигнин (VSC)*, $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$	V	S	C	S/V	C/V	K/F	V : S : C
Орехово-плодовый лес	$9,10 \pm 1,02$	4,33	3,74	1,03	0,86	0,24	0,72	4 : 4 : 1
Буково-грабово-каштановый лес	$2,16 \pm 0,06$	0,71	0,73	0,17	0,58	0,17	0	4 : 4 : 1
Осиновая роща	$1,58 \pm 0,32$	0,74	0,47	0,46	0,50	0,62	2,08	2 : 1 : 1
Березовая роща	$10,87 \pm 0,21$	7,54	1,95	1,78	0,53	0,23	0,83	4 : 1 : 1

*Среднее значение плюс-минус стандартное отклонение ($p < 0,05$; $n = 4$).

В то же время слои войлока и ветоши травянистых растений демонстрируют отчетливое накопление циннамиловых фенолов и особенно феруловых кислот (параметр $K/F < 1$), причем в слоях ветоши это ярко выражено (до $21,2 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$) (табл. 3).

Таблица 3

Содержание лигнина, лигниновые параметры
в войлоке, ветоши травянистых экосистем

Table 3

Lignin content, lignin parameters in fall of herbaceous ecosystems

Экосистема	Войлок или ветошь	Лигнин (VSC)*, $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$	V	S	C	S/V	C/V	K/F	V : S : C
Ткани злаков									
Степь	Войлок	$10,12 \pm 2,67$	4,17	4,31	4,63	1,03	1,11	0,39	1 : 1 : 1
Субальпийский луг	Ветошь	$26,47 \pm 4,11$	5,70	5,72	15,05	1,00	2,64	0,70	1 : 1 : 3
Культурные злаки	Ветошь	$10,85 \pm 0,98$	4,59	4,36	4,90	0,95	1,07	0,96	1 : 1 : 1
Ткани разнотравья									
Степь	Войлок	$13,06 \pm 1,12$	5,71	5,72	5,64	1,00	0,29	0,69	1 : 1 : 1
Альпийский луг	Ветошь	$81,68 \pm 5,34$	21,24	38,39	22,05	2,73	0,77	1,08	1 : 2 : 1

*Среднее значение плюс-минус стандартное отклонение ($p < 0,05$; $n = 5-6$).

Таким образом, природа растительных тканей в горизонтах подстилок отчетливо диагностируется.

Лигнин (VSC) в корнях растений. В ходе исследования обнаружено, что наибольшее содержание лигниновых фенолов свойственно не надземным, а подземным тканям растений. Во всех случаях, будь то древесный или травянистый растительный покров, преобладает лигнин корней (до $66 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$ в древесине корней можжевельника и до 46 и $49 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \text{C}_{\text{орг}}$ в корнях злаков на глубине $0-30$ и $30-60$ см соответственно) [8]. Коэффициент корреляции между содержанием лигнина в почве и биомассой корней составил $0,92-0,99$ ($p < 0,05$).

Наибольший вклад корневого лигнина отмечен в луговых экосистемах, особенно в степных сообществах со значительным преобладанием подземной биомассы над надземной, где отношение подземных органов к надземным достигает 20 (рис. 1, а, б). В лесных экосистемах это отношение значительно ниже – $3-7$ (см. рис. 1, в).

Наименьшая роль корней в круговороте лигнина обнаружена в агроантропогенных экосистемах (рис. 2) с равными долями надземной и подземной биомассы ($П/Н \approx 1$). Соотношения лигниновых фенолов в корневой биомассе повторяют закономерности, свойственные надземным органам.

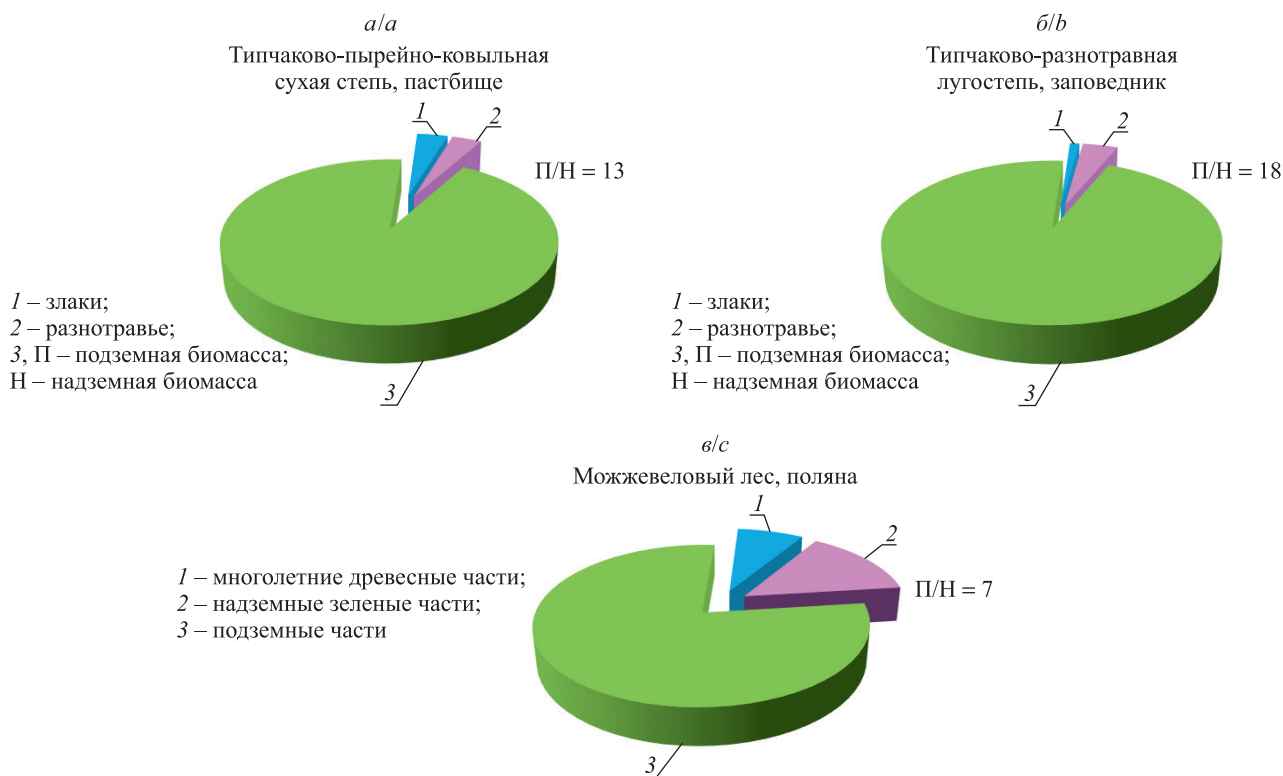


Рис. 1. Структура биомассы растительных сообществ ($r = 0,92-0,99$; $p < 0,05$):
а – степная экосистема; б – луговая экосистема; в – лесная экосистема

Fig. 1. The structure of the biomass of plant communities ($r = 0,92-0,99$; $p < 0,05$):
а – steppe ecosystem; б – meadow ecosystem; в – forest ecosystem

Условия разложения лигнина в почве. Дальнейшие превращения полимера в почвах определяются гидротермическими условиями среды и физико-химическими свойствами почв, активностью микробиоты, способной продуцировать различные лигнинпероксидазы, Мп-пероксидазы, фенолоксидазы, лакказы и разрушать лигнин [12]. В результате совместных действий смешанных микробных популяций достигается синергетический эффект трансформации лигниновых структур, прежде всего имеют место реакции расщепления и деструкции боковых цепочек биополимера.

Для характеристики интенсивности разложения и трансформации лигнина в почвах используется отношение кислот к альдегидам в единицах ванилина или сирингила как мера степени окисленности молекулы [5; 6; 13]. Этот параметр применяется в расчете степени измененности боковых цепочек по сравнению с исходной растительной тканью. Дж. Эртель и Дж. Хеджес [4] убедительно показали, что с увеличением степени разложенности лигнина возрастает количество ароматических кислот по отношению к количеству ароматических альдегидов, и разработали формулу для расчета степени измененности боковых цепочек биополимера (параметр Т, %):

$$T = 74 - (100 - K)(1 + (Ac/Al)_v)^{-1},$$

где $(Ac/Al)_v$ – отношение ванилиновых кислот к ванилиновым альдегидам; K – содержание кетонов в исходных растительных тканях, %.

Высокая цифра выхода продуктов окисления лигнина (VSC) и низкие величины отношения кислот к альдегидам в подстилке и гумусовых горизонтах почв гумидных ландшафтов являются закономерным следствием пока слабого изменения растительных остатков, а значит, слабой трансформации боковых цепочек ароматических структур лигнина в органическом веществе почв.

На основании многочисленных данных о содержании лигнина и его трансформации в почвах широтной зональности показана линейная зависимость увеличения степени измененности боковых цепочек лигниновых структур в ряду от светло-серых почв к черноземам и красноземам (рис. 3). Так, в почвах южной тайги она составляет 5–8 %, в лесостепи – 9–10 %, в черноземах – 10–12 %, достигая максимальных значений в красноземах – до 30–50 %, т. е. фактически следует за величиной периода биологической активности (ПБА). Невысокие значения степени измененности боковых цепочек лигниновых структур по сравнению с исходной растительной тканью, типичные для светло-серых почв Московской области, по-видимому, являются прямым отражением механизма (действия) встраивания неизменных фенольных структур в молекулу гуминовых кислот.

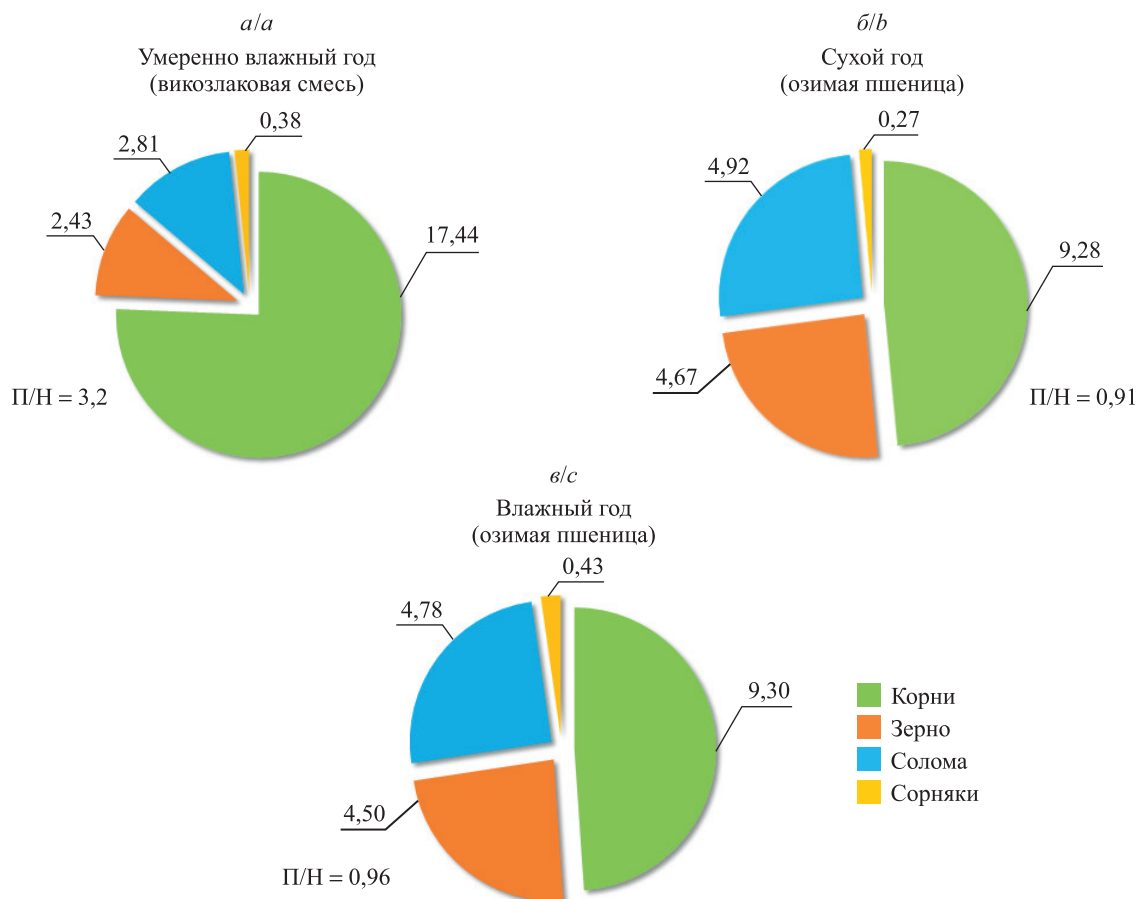


Рис. 2. Структура биомассы растительных сообществ ($r = 0,96-0,97$; $p < 0,05$) агроантропогенной экосистемы, т/га
Fig. 2. The biomass structure of plant communities ($r = 0,96-0,97$; $p < 0,05$) of the agro-anthropogenic ecosystem, t/ha

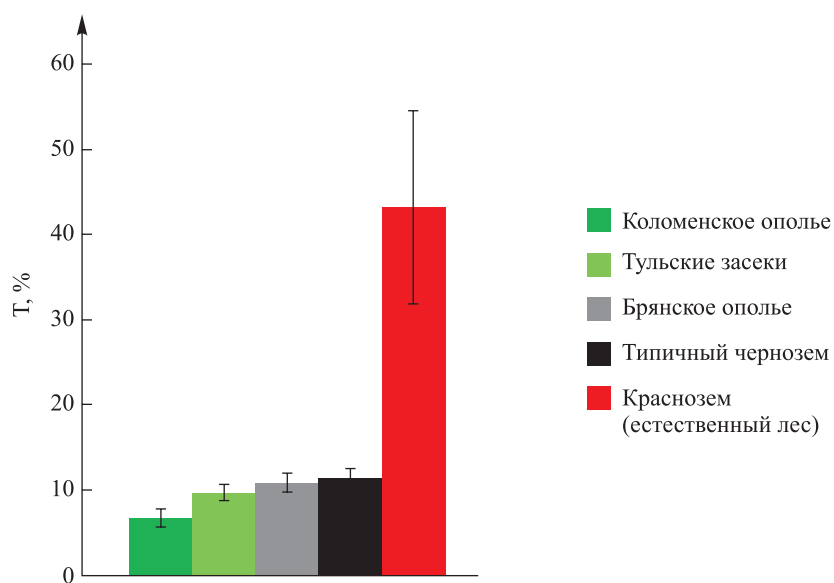


Рис. 3. Диаграмма степени измененности боковых цепочек лигнина по отношению к исходным растительным тканям (Т) в почвах широтной зональности. «Усы» обозначают стандартное отклонение ($p < 0,05$; $n = 4-8$)

Fig. 3. The diagram of the change degree in the side chains of lignin in relation to the original plant tissues (T) in the soils of latitudinal zones. «Mustache» denotes standart deviation ($p < 0,05$; $n = 4-8$)



Линейная зависимость степени трансформации лигнина от гидротермических условий хорошо проявляется и в горных экосистемах. Например, в гумидных условиях Северного Кавказа степень измененности боковых цепочек лигнина составляет 5 % для чернозема и 1,5 % для субальпийских почв, в аридных условиях Средней Азии – 20–25 % для горного чернозема и 3 % для альпийских луговых почв [9].

Лигниновые фенолы как структурные фрагменты гуминовых кислот. В целом гуминовые кислоты по содержанию продуктов окисления лигнина и лигниновым параметрам (табл. 4) похожи на образцы почв, наследуют характерные свойства растительных тканей, но демонстрируют бóльшую упорядоченность структурных фрагментов лигнина. Пропорции ванилиновых, сиригилловых и циннамиловых фенолов в них оказались одинаковыми для разных типов травянистых экосистем (1 : 1 : 1 – от степи до субальпийского луга) и характеризуют, как показано выше, ткани травянистых растений. Композиционные отношения 3 : 4 : 1 свойственны гуминовым кислотам из горизонтов коричневой почвы можжевельного леса и отражают свойства растительных тканей можжевельника.

Таблица 4

**Продукты окисления лигнина в препаратах
гуминовых кислот, выделенных из различных типов почв**

Table 4

**Lignin oxidation products in preparations
of humic acids isolated from different types of soils**

Почва	Горизонт, глубина, см	Лигнин (VSC), мг · г ⁻¹ C _{орг}	V	S	C	V : S : C
Светло-серая	Ap, 0–20	2,37	1,08	1,21	0,89	1 : 1 : 1
Чернозем	A, 12–38	3,32	0,73	0,95	1,65	1 : 1 : 2
Горно-луговая черноземовидная	A, 0–23	5,10	1,48	1,93	1,70	1 : 1 : 1
Горно-луговая субальпийская	A, 5–35	3,66	1,59	0,56	0,75	2 : 1 : 1
Коричневая (можжевельный лес)	A, 4–34	1,83	0,85	0,90	0,24	3 : 4 : 1
Горно-луговая альпийская	A, 3–20	2,06	0,55	0,77	0,74	1 : 1 : 1

Из представленных в табл. 5 и на рис. 4 данных также следует, что с увеличением степени трансформации лигнина в ряду *растительные ткани – опад – подстилка – почвы – гуминовые кислоты – погребенные гуминовые кислоты* возрастает количество ароматических кислот по отношению к количеству альдегидов во всех типах объектов, независимо от общего содержания лигнина в них, и достигает максимума в препаратах гуминовых кислот из погребенных почв. Гуминовые кислоты, по сравнению с почвами, дают более кислую фенольную смесь: отношения кислот к альдегидам в препаратах гуминовых кислот превышают аналогичные отношения в экстрактах из почв. Тем самым полученные результаты подтверждают положение о нарастающем карбоксилировании лигниновых остатков как о главном процессе их трансформации в гумус. Реакции деструкции, по-видимому, возникают прежде всего в боковых цепочках лигнина, образуя фенилкарбоновые кислоты как первые специфические соединения.

Таблица 5

**Величины отношения кислот к альдегидам*
в экосистемах на разных стадиях трансформации лигнина**

Table 5

**Values of the ratio of acids
to aldehydes at different stages of lignin transformation**

Экосистема	Ткани растений	Подстилка	Почва	Гуминовые кислоты
Сосновый лес	0,11	0,20	0,48	0,96
Можжевельное редколесье: под кроной на поляне	0,08 0,14	0,29 –	0,44 0,21	0,52 1,50
Пашня	0,09	–	0,60	1,05
Березовая роща	0,57	0,60	0,65	–
Тропический лес	0,13	–	2,26	–
Болото	0,18	0,34	0,40	0,73

*Среднее арифметическое значение ($n = 2-5$).

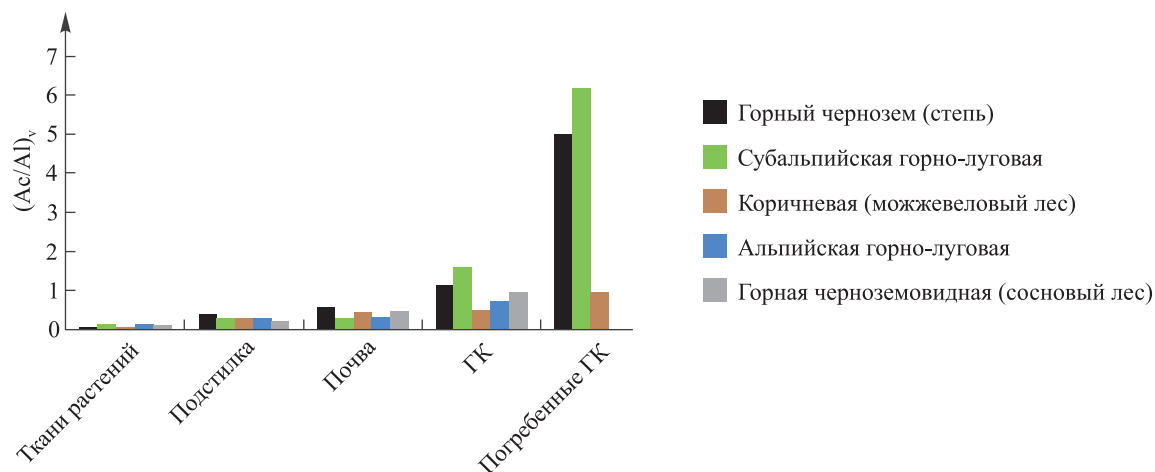


Рис. 4. Величины отношения ванилиновых кислот к ванилину ((Ac/Al)_v) на разных стадиях трансформации лигнина в ряду растительные ткани – опад – подстилки – почвы – гуминовые кислоты (ГК) – погребенные гуминовые кислоты
Fig. 4. Values of the ratio of vanillic acids to vanillin ((Ac/Al)_v) parameter at different stages of lignin transformation in the series plant tissues – fall – litter – soils – humic acids – buried humic acids

Таким образом, метод окисления и хроматографического разделения биополимеров лигнина позволяет получить информацию о типах растительных тканей в подстилках и почвах, исследовать механизмы трансформации лигнина в гуминовые кислоты. Гетерогенность генезиса лигнина обуславливает возможность возникновения большого числа разнообразных низко- и высокомолекулярных продуктов разложения (ванилиновых, сиригилловых, феруловых и кумаровых семейств), сохраняющих композиционный состав биополимера в ряду растительные ткани – опад – подстилки – почвы – гуминовые кислоты – погребенные гуминовые кислоты. Данный факт подтверждает образование в почвах унифицированных гуминовых веществ специфической природы, в формировании которых, наряду с прочими ароматическими соединениями, участвует лигнин высших растений.

С помощью количественного анализа лигниновых фенолов и ¹³C-ЯМР-спектроскопии также доказывается, что лигнин высших растений принимает участие в формировании специфических соединений гумуса почв, входя структурными фрагментами как в алифатическую (пики при 56 ppm), так и в ароматическую (пики при 147 ppm) часть молекул гуминовых кислот. Площади пиков лигниновых структур одинаковы в ароматической и алифатической частях молекул горно-луговых альпийских почв (табл. 6, рис. 5). В почвах зональных рядов ароматические фрагменты лигнинового происхождения преобладают в алифатической части спектра светло-серых почв Коломенского ополья и оглеенных почв аккумулятивных позиций ландшафта.

Коэффициент корреляции между содержанием лигнина (VSC) в гумусовых горизонтах почв гумидных ландшафтов и площадью пика лигнинового происхождения в алифатической части ¹³C-ЯМР-спектра при 56 ppm составил 0,94 ($p < 0,05$) (рис. 6).

В гуминовых кислотах почв лесостепи, сформированных на лёссе, а также в черноземах вклад ароматических лигниновых фрагментов в ядерной части молекул в 2 раза больше, чем в периферийной части (рис. 7).

Коэффициент корреляции между содержанием лигнина (VSC) в гумусовых горизонтах почв и площадью пика лигнинового происхождения в ароматической части ¹³C-ЯМР-спектра при 147 ppm составил 0,93 ($p < 0,05$) (рис. 8).

Сравнение ¹³C-ЯМР-спектров нативных препаратов лигнина (рис. 9), выделенных из разных пород древесных и травянистых растений, со спектром молекулы гуминовой кислоты [7] (рис. 10) позволило впервые обнаружить, что, во-первых, спектр пиков, наследуемых гуминовой кислотой от растительной ткани, весьма широк. Они отчетливо диагностируются при 102; 115; 119; 131; 152; 160 ppm (см. табл. 6).

Во-вторых, набор пиков разнороден в спектрах различных растений, следовательно, в молекулах гуминовых кислот разных почв он тоже должен отличаться. Это означает, что различия в химическом строении лигнина хвойных и лиственных пород, злаковых и травянистых растений заключаются не только в количественном содержании основных типов межмономерных связей β—О—4, β—5, β—β, C_{аром}—C (см. табл. 6), но и в композиционном составе макромолекул, т. е. в соотношении трех типов мономерных звеньев – ванилиновых (гваяциловых), сиригилловых и п-кумаровых (V : S : C).

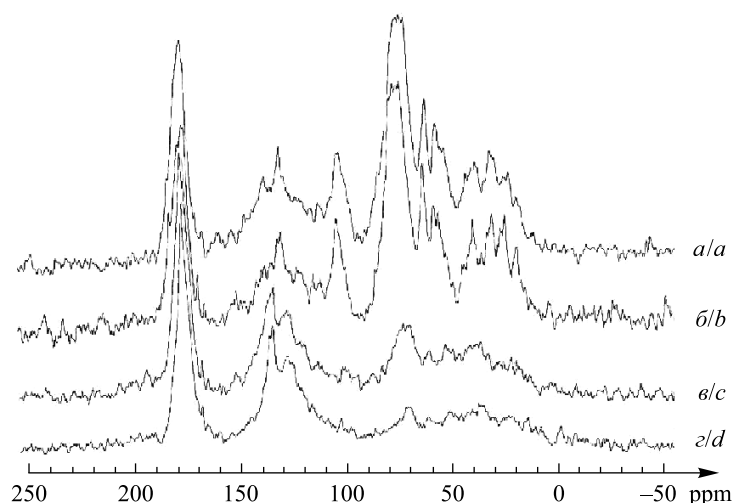


Рис. 5. ^{13}C -ЯМР-спектры препаратов гуминовых кислот
светло-серых оглеенных почв (Коломенское ополье):
a – глубокооглеенная почва (на микроповышении); *б* – глееватая почва (в микропонижении);
в – орштейны глееватой почвы; *г* – орштейны глееватой осушенной почвы
Fig. 5. ^{13}C NMR spectra of humic acids of light gray gleyed soils (Kolomenskoe opolye):
a – deeply gley (on microelevation); *b* – gleyic (in microdepressions);
c – nodules of gleyic soil; *d* – nodules of gleyic drained soil

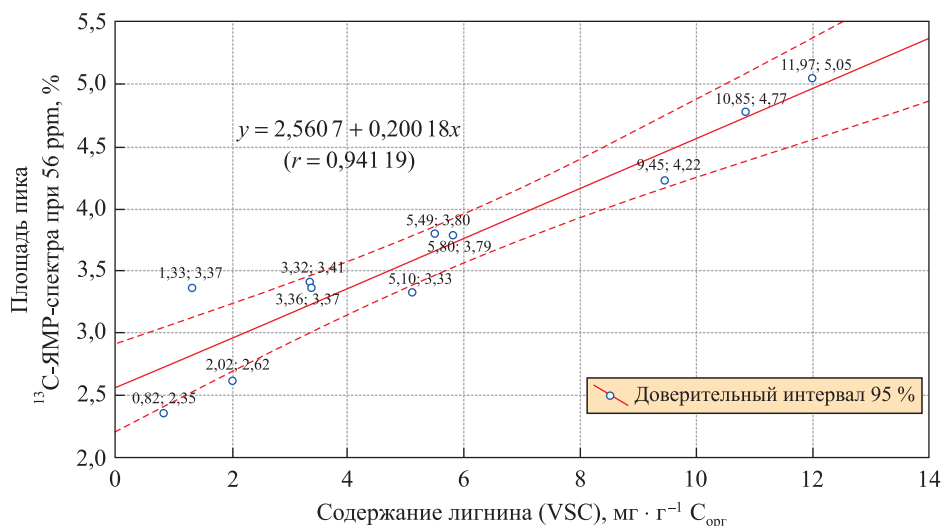


Рис. 6. Коэффициент корреляции между содержанием лигнина (VSC)
и площадью пика ^{13}C -ЯМР-спектра при 56 ppm
Fig. 6. Correlation coefficient between lignin content (VSC)
and peak area of ^{13}C NMR spectrum at 56 ppm

Наличие пиков фенольных структур на ^{13}C -ЯМР-спектрах препаратов гуминовых кислот лесных почв

Table 6

The peaks of phenolic structures in the ^{13}C NMR spectra of preparations of humic acids of forest soils

Почва	Горизонт, глубина, см	53,5–53,8 ppm (кумарины, пинорезинолы)	55,7 ppm (гваяцилы)	55,9 ppm (сирингилы)	102–104 ppm (сирингилы, C2, C6)	115,5 ppm (C2, C5)	119,1 ppm (гваяцилы, C6)	131,4–131,5 ppm (C2, C6, п-кумарины)	151,0–152,0 ppm (C3, C5—OCH ₃)	160,1 ppm (C4-эфиры)	166,7 ppm (C β -кумарины)
Березовые колки лесостепи (Брянское ополье)											
Серая лесная	A, 0–30	Следы	Следы	+	+	+	+	+	–	–	–
Темно-серая лесная	A, 0–30	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
	G, 60–70	+	+	+	+	+	+	Следы	–	–	–
Южнотаежные леса из березы и осины (Коломенское ополье, пашня на месте сведенного леса)											
Светло-серая лесная глееватая	A, 0–10	+	+	+	+	+	–	+	+	–	+
Светло-серая лесная	A, 0–10	+	+	+	+	–	–	+	–	–	–
Северо-Западный Кавказ											
Чернозем	A, 8–27	+	+	+	+	+	+	+	+	Следы	+
Субальпийская горно-луговая почва	A, 10–25	+	+	+	+	+	+	+	–	Следы	–
Северный Тянь-Шань											
Чернозем	A, 12–38	+	+	+	+	–	+	+	+	+	Следы
	A, 38–44	+	+	+	+	–	+	+	+	+	Следы
Черноземовидная (сосновый лес)	A, 15–25	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+
	[A], 37–50	+	++	+	+	–	–	+	–	–	+
Коричневая (можжевеловый лес)	A, 0–23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	AB, 37–50	Следы	Следы	Следы	+	–	–	–	–	–	–

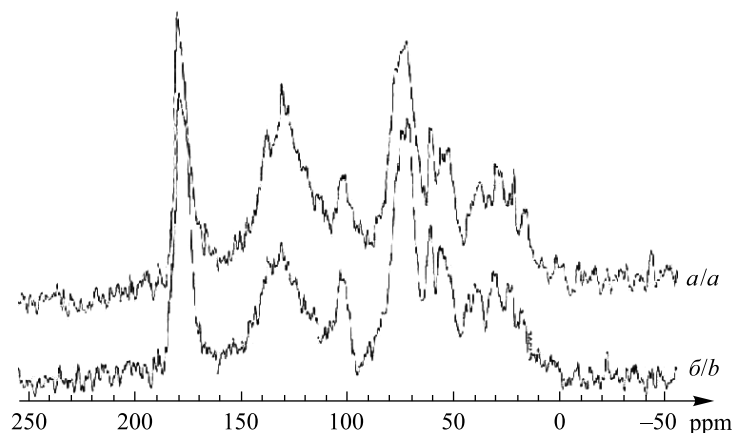


Рис. 7. ^{13}C -ЯМР-спектры препаратов гуминовых кислот почв Северного Кавказа: *a* – чернозем (А, 8–27 см); *б* – субальпийская луговая почва (А, 10–25 см)

Fig. 7. ^{13}C NMR spectra of humic acids of soils of the North Caucasus: *a* – chernozem (A, 8–27 cm); *b* – subalpine meadow soil (A, 10–25 cm)

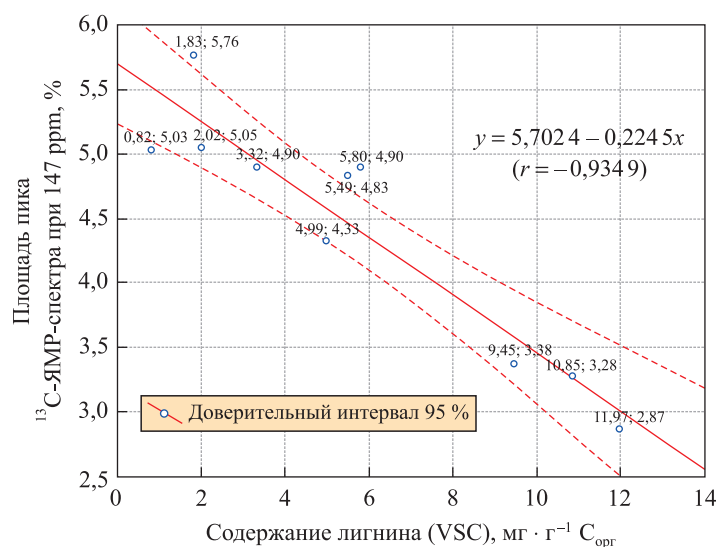


Рис. 8. Коэффициент корреляции между содержанием лигнина (VSC) и площадью пика ^{13}C -ЯМР-спектра при 147 ppm

Fig. 8. Correlation coefficient between lignin content (VSC) and peak area of the ^{13}C NMR spectrum at 147 ppm

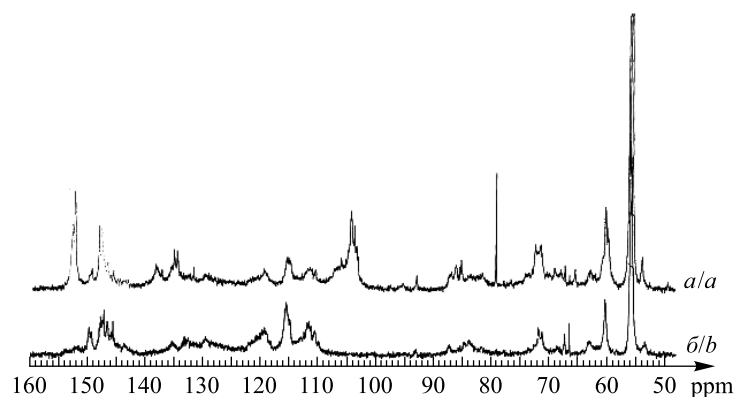


Рис. 9. ^{13}C -ЯМР-спектры нативных препаратов лигнина древесных культур: *a* – акация; *б* – лиственница. Источник: [14]

Fig. 9. ^{13}C NMR spectra of lignin preparations from tree tissue: *a* – acacia; *b* – larch. Source: [14]

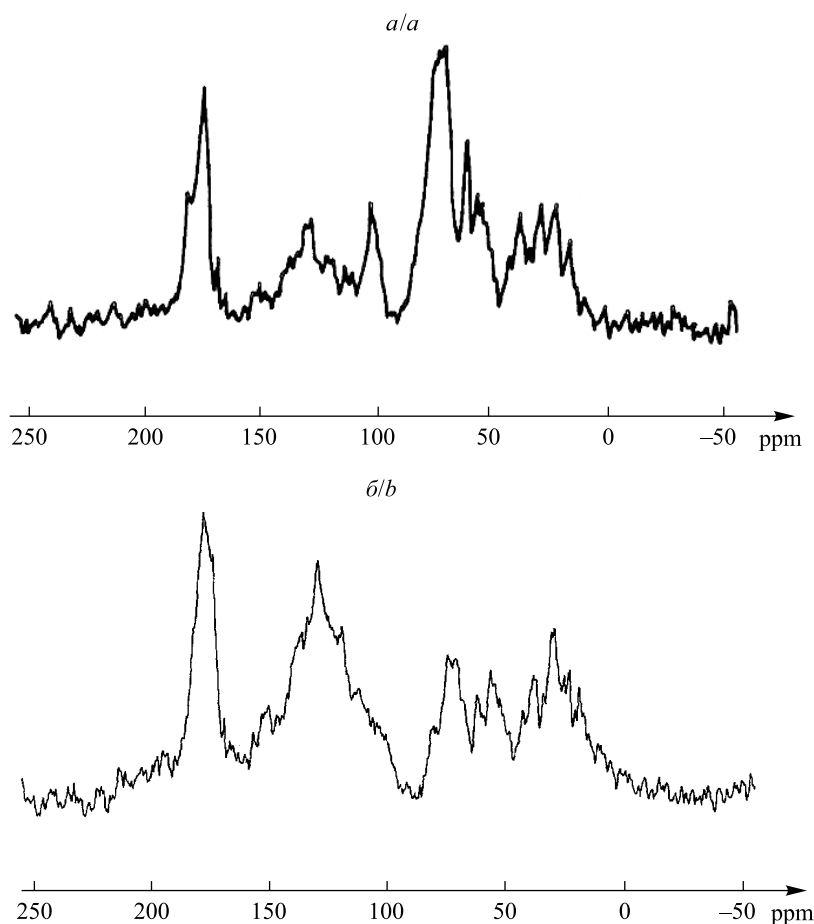


Рис. 10. ^{13}C -ЯМР-спектры препаратов гуминовых кислот:
a – светло-серая лесная почва (Ap, 0–20 см);
б – черноземовидная почва (сосновый лес) (A, 8–27 см)
 Fig. 10. ^{13}C NMR spectra of humic acids: *a* – light gray forest soil (Ap, 0–20 cm);
b – chernozem-like soil (pine forest) (A, 8–27 cm)

И наконец, лигнин древесных растений южной тайги становится источником более развитых пространственно вытянутых с развитой алифатической частью молекул гуминовой кислоты (мощные хорошо вытянутые пики) (см. рис. 10, *a*), а феруловые и кумаровые фенолы травянистых растений формируют пространственно компактные структуры гуминовых кислот (см. рис. 10, *б*).

Заключение

Результаты исследований оригинальны и могут быть использованы в следующих областях.

1. *Производство гуминовых препаратов, их идентификация и сертификация.* Впервые стало возможным идентифицировать генезис гуминовых препаратов. Допускается, что именно благодаря лигнину в почве образуются гуминовые вещества, придающие почвенному органическому веществу и его стабильной части – гумусу – особые свойства и функции. Разработка новых продуктов, от сорбентов до препаратов гуминовых веществ на основе биополимера лигнина, отвечает современным тенденциям науки.

2. *Разработка технологий применения органических удобрений.* В зависимости от содержания и композиционного состава лигнина растений в органическом удобрении корректируется его норма внесения в почву.

3. *Биоконверсия и консервация отходов гидролизной, деревообрабатывающей и иной промышленности, имеющей сырьевым источником лигнинсодержащие соединения.* Показаны возможные механизмы и скорость трансформации лигниновых фенолов в зависимости от композиционного состава лигнина древесных и травянистых растений в разных почвенно-географических условиях, и на этой основе продемонстрирован выбор оптимальной технологии утилизации лигноцеллюлозы. Гидролизный лигнин превратился из отхода производства в ценное сырье для сельского хозяйства (биопрепараты и удобрения).

4. *Оценка современных приемов обработки почвы и приемов биологизации земледелия.* Проявление аллелопатических свойств лигниновых фенолов при длительном использовании приемов биологического земледелия требует систематических исследований биохимии лигнина в почвах. Так, в практике применения технологии *no-till* в первые годы можно рассчитывать на получение высоких урожаев, а уже на 3–4-й годы наблюдается резкое снижение урожайности сельскохозяйственных культур.



Библиографические ссылки

1. Chukov SN. Problems of biotesting of humic substances ecological functions. In: *Fourth international conference of CIS IHSS on humic innovative technologies «From molecular analysis of humic substances – to nature-like technologies»*; 2017 October 15–21; Moscow, Russia. Moscow: Klub pechati; 2017. p. 30–31.
2. Комаров АА. Физиологическая активность продуктов трансформации лигнина. В: Шевелуха ВС, редактор. *Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях. Тезисы докладов Шестой международной конференции*; 26–28 июня 2001 г.; Москва, Россия. Москва: Издательство МСХА; 2001. с. 101.
3. Попов АИ, Чертов ОГ. Биогенотическая роль органического вещества почв. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология*. 1996;2:88–97.
4. Ertel JR, Hedges JJ. The lignin component of humic substances: distribution among soil and sedimentary humic, fulvic, and base-insoluble fractions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1984;48(10):2065–2074. DOI: 10.1016/0016-7037(84)90387-9.
5. Ковалев ИВ, Ковалева НО. Биохимия лигнина в почвах периодического переувлажнения (на примере агросерых почв ополей Русской равнины). *Почвоведение*. 2008;10:1205–1216.
6. Amelung W. *Zum Klimaeinfluß auf die organische Substanz nordamerikanischer Prärieböden*. Bayreuth: Universität Bayreuth; 1997. 131 S.
7. Ковалева НО, Ковалев ИВ. Лигниновые фенолы в почвах как биомаркеры палеорастительности. *Почвоведение*. 2015;9:1073–1086.
8. Ковалев ИВ, Ковалева НО. Пул лигниновых фенолов в почвах лесных экосистем. *Лесоведение*. 2016;2:148–160.
9. Ковалева НО, Ковалев ИВ. Биотрансформация лигнина в дневных и погребенных почвах горных ландшафтов. *Почвоведение*. 2009;11:1362–1373.
10. Kovalev IV, Kovaleva NO. The role of lignin phenols in organic-mineral interactions in soils. In: Filcheva E, editor. *19th International conference of humic substances and their contribution to the climate change mitigation*; 2018 September 16–21; Albena Resort, Bulgaria. Sofia: Bulgarian Humic Substances Society; 2018. p. 120–121.
11. Манская СМ, Кодина ЛА. *Геохимия лигнина*. Виноградов АП, редактор. Москва: Наука; 1975. 232 с.
12. Заварзин ГА. *Лекции по природоведческой микробиологии*. Москва: Наука; 2004. 348 с.
13. Kögel I. Estimation and decomposition pattern of the lignin component in forest humus layers. *Soil Biology and Biochemistry*. 1986;18(6):589–594. DOI: 10.1016/0038-0717(86)90080-5.
14. Karmanov AP, Kocheva LS, Marchenko TA, Belayev VYu. Topological structure of lignin macromolecules. In: *Proceedings of the 11th International symposium on wood and pulping chemistry*; 2001 June 11–14; Nice, France. Volume 2. Paris: L'Association technique de l'industrie papetière; 2001. p. 7–10.

References

1. Chukov SN. Problems of biotesting of humic substances ecological functions. In: *Fourth international conference of CIS IHSS on humic innovative technologies «From molecular analysis of humic substances – to nature-like technologies»*; 2017 October 15–21; Moscow, Russia. Moscow: Klub pechati; 2017. p. 30–31.
2. Komarov AA. [Physiological activity of lignin transformation products]. In: Shevelukha VS, editor. *Regulatory rosta i razvitiya rastenii v biotekhnologiyakh. Tezisy докладов Shestoi mezhdunarodnoi konferentsii*; 26–28 iyunya 2001 g.; Moskva, Rossiya [Regulators of plant growth and development in biotechnology. Abstracts of the 6th International conference; 2001 June 26–28; Moscow, Russia]. Moscow: Publishing House of the Moscow Timiryazev Agricultural Academy; 2001. p. 101. Russian.
3. Popov AI, Chertov OG. [Biogeocenotic role of soil organic matter]. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Seriya 3. Biologiya*. 1996;2:88–97. Russian.
4. Ertel JR, Hedges JJ. The lignin component of humic substances: distribution among soil and sedimentary humic, fulvic, and base-insoluble fractions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1984;48(10):2065–2074. DOI: 10.1016/0016-7037(84)90387-9.
5. Kovalev IV, Kovaleva NO. Biochemistry of lignin in soils of periodic excessive moistening (with agrogray soils in opolie landscapes of the Russian Plain as an example). *Pochvovedenie*. 2008;10:1205–1216. Russian.
6. Amelung W. *Zum Klimaeinfluß auf die organische Substanz nordamerikanischer Prärieböden*. Bayreuth: Universität Bayreuth; 1997. 131 S.
7. Kovaleva NO, Kovalev IV. [Lignin phenols in soils as biomarkers of paleovegetation]. *Pochvovedenie*. 2015;9:1073–1086. Russian.
8. Kovalev IV, Kovaleva NO. Pool of lignin phenols in soils of forest ecosystems. *Lesovedenie*. 2016;2:148–160. Russian.
9. Kovaleva NO, Kovalev IV. [Transformation of lignin in surface and buried soils of mountainous landscapes]. *Pochvovedenie*. 2009;11:1362–1373. Russian.
10. Kovalev IV, Kovaleva NO. The role of lignin phenols in organic-mineral interactions in soils. In: Filcheva E, editor. *19th International conference of humic substances and their contribution to the climate change mitigation*; 2018 September 16–21; Albena Resort, Bulgaria. Sofia: Bulgarian Humic Substances Society; 2018. p. 120–121.
11. Manskaya SM, Kodina LA. *Geokhimiya lignina* [Geochemistry of lignin]. Vinogradov AP, editor. Moscow: Nauka; 1975. 232 p. Russian.
12. Zavarzin GA. *Lektsii po prirovedcheskoi mikrobiologii* [Lectures on natural history microbiology]. Moscow: Nauka; 2004. 348 p. Russian.
13. Kögel I. Estimation and decomposition pattern of the lignin component in forest humus layers. *Soil Biology and Biochemistry*. 1986;18(6):589–594. DOI: 10.1016/0038-0717(86)90080-5.
14. Karmanov AP, Kocheva LS, Marchenko TA, Belayev VYu. Topological structure of lignin macromolecules. In: *Proceedings of the 11th International symposium on wood and pulping chemistry*; 2001 June 11–14; Nice, France. Volume 2. Paris: L'Association technique de l'industrie papetière; 2001. p. 7–10.

Получена 28.11.2020 / исправлена 15.02.2021 / принята 03.05.2021.
Received 28.11.2020 / revised 15.02.2021 / accepted 03.05.2021.



УДК 615.322+615.017

ИССЛЕДОВАНИЕ АДАПТОГЕННЫХ И ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ПАДУБА ПАРАГВАЙСКОГО (*ILEX PARAGUARIENSIS*) НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ *in vivo*

О. И. ГУБИЧ¹⁾, С. С. ОКорокова¹⁾, Д. В. КОПЫЛЕВА¹⁾,
Н. С. ДЖААФАР¹⁾, Д. В. ДУЦ¹⁾, М. И. КОВАЛЬ¹⁾

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

Изучено влияние препарата паду́ба парагвайского (*Ilex paraguariensis*) на показатели энергетического и углеводного обмена в условиях повышенной физической нагрузки, а также проанализирована возможность стабилизации им величин биохимических маркеров поражения печени и перекисного окисления липидов у крыс в экспериментальной модели хронической алкогольной интоксикации. Установлено, что отвар паду́ба парагвайского оказывает антиоксидантное и гепатопротекторное влияние на крыс с экспериментальным алкогольным поражением печени, сопоставимое с действием классического растительного гепатопротектора – расторопши пятнистой (*Silybum marianum*), обладает стимулирующим и адаптогенным эффектами в условиях физической нагрузки, лишь немного уступающими таковым энергетического напитка «Wild Jaguar». Указанные свойства паду́ба парагвайского могут быть обусловлены наличием в составе данного растения флавоноидов, аскорбиновой и хлорогеновой кислот, проявляющих антиоксидантный эффект, а также кофеина, способного стимулировать работу центральной нервной и сердечно-сосудистой систем.

Ключевые слова: углеводный обмен; энергетический обмен; физическая нагрузка; хроническая алкогольная интоксикация; гепатопротекция; перекисное окисление липидов; паду́б парагвайский; мате.

Образец цитирования:

Губич ОИ, Окорокова СС, Копылева ДВ, Джаафар НС, Дуц ДВ, Коваль МИ. Исследование адаптогенных и гепатопротекторных свойств паду́ба парагвайского (*Ilex paraguariensis*) на экспериментальных моделях *in vivo*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021; 2:43–51.

<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-43-51>

For citation:

Hubich AI, Okarakava SS, Kopyleva DV, Jaafar NS, Duts DV, Koval MI. The investigation of adaptogenic and hepatoprotective properties of *Ilex paraguariensis* on experimental models *in vivo*. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2021;2:43–51. Russian.

<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-43-51>

Авторы:

Оксана Игоревна Губич – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры биохимии биологического факультета.

Светлана Сергеевна Окорокова – студентка биологического факультета. Научный руководитель – О. И. Губич.

Дарья Викторовна Копылева – студентка биологического факультета. Научный руководитель – О. И. Губич.

Надежда Салам Джаафар – студентка биологического факультета. Научный руководитель – О. И. Губич.

Диана Витальевна Дуц – студентка биологического факультета. Научный руководитель – О. И. Губич.

Мария Игоревна Коваль – студентка биологического факультета. Научный руководитель – О. И. Губич.

Authors:

Aksana I. Hubich, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology.

hubich_oksana@tut.by

Svyatlana S. Okarakava, student at the faculty of biology.

svetka_konfetti1999@gmail.com

Darya V. Kopyleva, student at the faculty of biology.

kopyleva.darya@mail.ru

Nadezhda S. Jaafar, student at the faculty of biology.

nadezhdajaafar@gmail.com

Dziyana V. Duts, student at the faculty of biology.

dianaduts0@gmail.com

Mariya I. Koval, student at the faculty of biology.

koval.masha.99@gmail.com





THE INVESTIGATION OF ADAPTOGENIC AND HEPATOPROTECTIVE PROPERTIES OF *ILEX* *PARAGUARIENSIS* ON EXPERIMENTAL MODELS *in vivo*

A. I. HUBICH^a, S. S. OKARAKAVA^a, D. V. KOPYLEVA^a,
N. S. JAAFAR^a, D. V. DUTS^a, M. I. KOVAL^a

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

Corresponding author: A. I. Hubich (hubich_oksana@tut.by)

This work is devoted to the study of the effect of *Ilex paraguariensis* decoction for energy and carbohydrate metabolism in conditions of increased physical activity, the analysis of the stabilisation possibilities of liver injury and lipid peroxidation markers in rats in an experimental model of chronic alcohol intoxication. It's established that *I. paraguariensis* exhibits antioxidant and hepatoprotective effects in rats with experimental alcoholic liver, comparable to the action of classical plant hepatoprotector – *Silybum marianum*, has a stimulating and adaptogenic effects in experimental model of physical activity, comparable to the energy drink «Wild Jaguar». The results obtained may be due to the presence of flavonoids, ascorbic and chlorogenic acids, exhibiting an antioxidant effect, as well as caffeine, which is known to stimulate the work of the central nervous and cardiovascular systems.

Keywords: carbohydrate metabolism; energy metabolism; physical activity; chronic alcohol intoxication; hepatoprotection; lipid peroxidation; *Ilex paraguariensis*; mate.

Введение

В современном фармацевтическом арсенале, предназначенном для терапевтических целей, не менее 25 % средств приходится на природные препараты растительного происхождения [1]. Несмотря на успехи химии в синтезе новых лекарственных формул, в последние десятилетия тенденция к использованию натуральных препаратов остается четко выраженной.

В то же время появление большого количества не подкрепленных данными экспериментальной и клинической проверки публикаций и заявлений, предлагающих растительные препараты с «уникальными целебными свойствами», предопределило формирование у части населения стойкого отрицательного мнения о травяных биодобавках и растительных средствах.

В связи с растущей сегодня популярностью отвара падуба парагвайского (мате, парагвайский чай, чай мате) и появлением в печати и на телевидении многочисленных рекомендаций о его использовании перед авторами была поставлена задача расширить существующие данные об этом препарате, экспериментально определив, в частности, способность отвара падуба парагвайского проявлять гепатопротекторные свойства при хронической алкогольной интоксикации, а также сравнив эффективность его адаптогенного действия в условиях интенсивной физической нагрузки с аналогичными показателями, присущими иным популярным стимулирующим напиткам.

Падуб парагвайский (*Ilex paraguariensis*) – дикорастущее и культивируемое растение семейства падубовых (Aquifoliaceae), произрастающее в тропических и субтропических лесах Южной Америки [2] и широко используемое для приготовления мате – традиционного тонизирующего напитка из высушенных и измельченных листьев, а также в качестве популярного фитотерапевтического средства коренных народов указанного региона. Основную долю растительного сырья в настоящее время собирают с культурных плантаций Южной Бразилии, Парагвая, Уругвая и юго-восточной части Аргентины, которые одновременно являются и основными потребителями мате. В США и Европе падуб парагвайский в комбинации с иными компонентами применяется при приготовлении энергетических напитков, а также в качестве фитопрепаратов, используемых для снижения веса.

Фитохимический анализ показал наличие в листьях и стеблях данного растения алкалоидов (кофеин (в листьях – 0,97–1,79 %, в стеблях – в среднем 0,73 %), теofilлин, теобромин), тритерпеновых сапонинов (матесапонины), флавоноидов (рутин, кверцетин), хлорогеновой кислоты и ее производных, фенольных гликозидов, дубильных веществ (4–10 %), витаминов (группа В; С, РР), микроэлементов (магний, цинк, железо, калий, марганец) [3–5]. В водном экстракте листьев падуба парагвайского общее содержание фенольных компонентов составляет 5 г/л, сапонинов – 0,35 г/л [6].

Исследование свойств водных экстрактов данного растения позволило установить наличие у них способности регулировать липидный обмен. В частности, экспериментально показано снижение уровня



общего холестерина и размера атеросклеротических бляшек на аорте кроликов, находившихся на диете, обогащенной холестерином, при ежедневном приеме экстракта падуба парагвайского [6]. Клинические исследования продемонстрировали дополнительное снижение уровня липопротеинов низкой плотности у пациентов, принимавших статины и экстракт падуба парагвайского, что указывает на возможность уменьшения дозы статинов и, соответственно, минимизации их побочных эффектов [7]. Интересно также, что компоненты падуба парагвайского снижают риск развития ожирения у животных, находящихся на диете, обогащенной жирами, как ингибируя активность панкреатической липазы, так и разобщая окислительное фосфорилирование в митохондриях и повышая активность цАМФ-зависимой киназы в висцеральной жировой ткани [6; 8].

Помимо этого, в настоящее время экспериментально подтверждена противовоспалительная, ДНК-протекторная, антиоксидантная, антидепрессантная, нейропротекторная, болеутоляющая, диуретическая активность водных и водно-спиртовых экстрактов падуба парагвайского, его способность подавлять рост и жизнедеятельность ряда бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) и грибковой микрофлоры (*Malassezia furfur*) [4; 6; 9–21]. Установлена важность ежедневного приема отвара падуба парагвайского пациентами, страдающими сахарным диабетом 2-го типа, для улучшения ключевых параметров углеводного и липидного обмена [16]. В странах Южной Америки и США употребление отвара данного растения рекомендуется для увеличения выносливости, при переутомлении, снижении памяти, мышечной слабости, астении, невралгии, ожирении, отравлениях, а также в качестве кардиотонического и антидепрессантного средства [6]. Фармакологическое и токсикологическое исследование падуба парагвайского продолжается.

Материалы и методы исследования

Работа проводилась на самцах беспородных белых мышей массой 30–50 г (исследование адаптогенных свойств падуба парагвайского в условиях физической нагрузки) и на самцах беспородных белых крыс массой 180–200 г (модель хронического алкогольного поражения печени). Все эксперименты выполнялись в соответствии с этическими нормами обращения с животными, а также правилами проведения работ с использованием лабораторных животных в научных исследованиях, составленными на основании рекомендаций и требований Всемирного общества защиты животных и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (Страсбург, 1986).

В работе применяли коммерческий препарат *Ilex paraguariensis* (*Meta Mate Ind.*, Бразилия), отвар которого готовили согласно прилагающейся инструкции (50 мг листьев на 200 мл воды) и предоставляли для питья соответствующим группам экспериментальных животных вместо питьевой воды (модель хронического алкогольного поражения печени) или вводили в дозе 2 мл/кг однократно перорально с помощью пипетки перед проведением эксперимента (исследование адаптогенных свойств в условиях физической нагрузки).

Исследование адаптогенных свойств падуба парагвайского в условиях физической нагрузки предполагало 10-минутное плавание животных в воде комнатной температуры (24,5 °C). Наступление утомления фиксировали по убыли концентрации глюкозы и приросту концентрации пирувата (предшественника молочной кислоты) в крови, снижению содержания суммарной фракции макроэргов и отдельно креатинфосфата в скелетной мускулатуре подопытных мышей. В качестве препаратов сравнения в данной модели эксперимента использовали коммерческий энергетический напиток «Wild Jaguar» (ЗАО «ОСТ-Аква», Россия) и отвар кофе (*Coffea arabica*) («Lavazza», Италия). Препараты сравнения вводили лабораторным мышам однократно перорально с помощью пипетки в экспериментально подобранных максимально эффективных дозах (2 мл/кг – для энергетика, 4 мл/кг – для кофе) за 15 мин до начала опыта.

Для создания экспериментальной модели хронической алкогольной интоксикации 96 % этанол разводили водой до 15 % и предоставляли для питья (как альтернативу воде) в течение 6 нед. лабораторным крысам, имеющим предрасположенность к алкоголизму, т. е. добровольно употреблявшим этиловый спирт в объеме (V_{cp}) 10–12 мл/сут. Указанная модель была разработана Институтом фармакологии имени А. В. Вальдмана (на базе Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И. П. Павлова) и использована нами без модификаций.

В качестве эталонного растительного препарата гепатопротекторного действия использовали шрот расторопши пятнистой (*Silybum marianum*) (ООО «Клуб “Фарм-Эко”», Беларусь), содержащий комплекс флаволигнанов (2,7–4,0 г по силимарину) и рекомендуемый для профилактики нарушений функции печени и в качестве дополнительного источника антиоксидантов [22]. Водную суспензию (2 г на 200 мл воды) данного препарата предоставляли intactным животным и крысам с алкогольным поражением печени на протяжении 7 сут вместо питьевой воды (среднее потребление составило 10 мл/сут на крысу).



По истечении указанного времени животных выводили из эксперимента путем декапитации и проводили измерение величин основных биохимических маркеров изучаемых патологий. Активность щелочной фосфатазы определяли спектрофотометрическим методом с помощью коммерческого набора реагентов, содержание билирубина – методом Йендрашика [23], суммарное количество основных макроэргов – по цветной реакции с молибдатом аммония в присутствии аскорбиновой кислоты [19], содержание креатинфосфата – как описано в работе [24], уровень пирувата – модифицированным методом Умбрайт [23], концентрацию глюкозы – глюкозооксидазным методом с помощью коммерческого набора реагентов, активность каталазы – как описано в статье [25], содержание ТБК-активных продуктов – спектрофотометрическим методом [26].

Статистическую обработку экспериментальных данных с подсчетом среднего арифметического ($\bar{X}$), стандартной ошибки среднего арифметического ($\pm S_x$) и достоверности при уровне значимости $p \leq 0,05$ проводили с использованием лицензионного пакета программ *Stadia 6.0*.

Результаты и их обсуждение

Первый этап работы был посвящен изучению количественной характеристики адаптогенного и стимулирующего действия отвара паду́ба парагвайского в условиях повышенной физической нагрузки, которая, как отмечалось выше, представляла собой 10-минутное плавание лабораторных мышей в воде при температуре 24,5 °С. В качестве анализируемых показателей выбраны общее содержание макроэргов и содержание креатинфосфата в скелетной мускулатуре, отражающие энергообеспечение начальных (пусковых) этапов мышечного сокращения, а также концентрация глюкозы и уровень пирувата крови, косвенно отображающие интенсивность гликолитического пути энергообеспечения сокращающейся скелетной мускулатуры. Информация о влиянии отвара паду́ба парагвайского на указанные биохимические параметры в доступной литературе не представлена.

Физическая нагрузка в нашем эксперименте логично приводила к наступлению состояния утомления, выражающегося в неспособности животных совершать дальнейшие активные плавательные движения, что было проявлением закономерного снижения содержания макроэргов в скелетной мускулатуре животных (суммарное количество макроэргов оказалось ниже начальных значений на 60,8 %, содержание креатинфосфата – на 43,6 %), почти полного истощения концентрации глюкозы в крови (+17,7 % к контролю) и, соответственно, накопления пирувата (+262,1 % к контролю) (табл. 1).

Иная картина наблюдалась при аналогичной нагрузке, но после однократного приема животными препарата паду́ба парагвайского в экспериментально подобранной максимально эффективной дозе (4 мл/кг) за 15 мин до начала эксперимента. Так, снижение уровня макроэргов в скелетной мускулатуре было менее выраженным (суммарное содержание составило 60,3 % от исходного), равно как и уменьшение концентрации глюкозы в крови (–10,5 % к контролю) (см. табл. 1). При этом мыши по-прежнему находились в состоянии активного плавания, попыток использовать энергосберегающие приемы (лежание на воде, зависание у стенок, висение в воде) или выпрыгнуть из воды не наблюдалось.

Подобный эффект может быть обусловлен достаточно высоким содержанием в листьях паду́ба кофеина (1,06 г на 100 г) [3–5], стимулирующего нервную систему посредством ингибирования фосфодиэстеразы и обеспечения накопления цАМФ, который, в свою очередь, стимулирует процессы липолиза, гликогенолиза и иные метаболические пути, в том числе протекающие в нервной, мышечной и сердечно-сосудистой системах. Определенную роль играет и наличие в листьях паду́ба простых углеводов (1,89 г на 100 г) [3; 19], облегчающих физическую активность.

Особый интерес представляет сравнение эффектов паду́ба парагвайского с эффектами иных кофеинсодержащих напитков, в частности весьма популярного сегодня у молодежи энергетического напитка «Wild Jaguar» и самого популярного напитка в мире – кофе (*C. arabica*) – известной торговой марки «Lavazza». Сравнение выполнялось в описанной экспериментальной модели с использованием указанных выше энергетических маркеров. Результаты проведенной работы, представленные в табл. 1, свидетельствуют, что наблюдаемый при приеме отвара паду́ба парагвайского стимулирующий эффект несколько уступал действию на энергетические показатели кофеин- и сахарозосодержащего энергетика «Wild Jaguar», однако значительно превосходил влияние, оказываемое отваром кофе. Так, при употреблении энергетического напитка общее содержание макроэргов в скелетной мускулатуре лабораторных мышей, подвергнутых физической нагрузке, оказалось выше аналогичного параметра, фиксируемого при использовании отвара паду́ба парагвайского, на 21,2 %, содержание креатинфосфата – на 20 %, достоверных различий между концентрацией глюкозы в крови не установлено. С другой стороны, применение отвара кофе в указанных условиях не позволяло стабилизировать энергетические параметры, значения которых, за исключением общего содержания макроэргов, достоверно не отличались от соответствующего контроля.



Необходимо заметить, что представленное в табл. 1 снижение уровня макроэргов и глюкозы у интактных мышей после приема отвара кофе и энергетического напитка неслучайно и может быть связано с повышением у них двигательной активности в форме интенсивного груминга, продолжавшегося на всем протяжении наблюдения. Пероральное же введение отвара падуба парагвайского интактным мышам в отсутствие физической нагрузки не сопровождалось изменениями поведенческих реакций, равно как и достоверными изменениями анализируемых показателей углеводного и энергетического обмена (см. табл. 1), что отвечает первому требованию, предъявляемому к препаратам адаптогенного действия, указывающему на возможность действия адаптогена только на соответствующем фоне, с минимальными сдвигами в нормальных условиях или без них [27].

Таким образом, в условиях повышенной физической нагрузки отвар падуба парагвайского обеспечивает адаптацию путем более экономного расходования энергетических субстратов, при этом лишь немного уступая в эффективности исследованному энергетическому напитку. Примечательно, что наблюдаемый эффект реализовался уже после первого приема отвара, подобное характерно для немногих растительных адаптогенов (например, для железницы крымской, рододендрона Адамса, клитории тройчатой) [28; 29].

Таблица 1

Значение параметров углеводного и энергетического обмена у лабораторных мышей, подвергнутых физической нагрузке, при использовании энергетического напитка «Wild Jaguar», отвара падуба парагвайского и кофе «Lavazza»

Table 1

The value of the carbohydrate and energy metabolism parameters of laboratory mice subjected to physical activity when using energy drink «Wild Jaguar», *I. paraguariensis* and *C. arabica* («Lavazza») decoctions

Серия эксперимента	Содержание макроэргов в мышцах, мкмоль/г	Содержание креатинфосфата в мышцах, мкмоль/г	Содержание пирувата, мкг/мл	Концентрация глюкозы, моль/л
Интактные мыши	0,34 ± 0,05 (100,0 %)	1,13 ± 0,17 (100,0 %)	1,64 ± 0,19 (100,0 %)	8,30 ± 1,53 (100,0 %)
Мыши, подвергнутые физической нагрузке	0,13 ± 0,02 (39,2 %)*	0,64 ± 0,07 (56,4 %)*	5,90 ± 0,25 (362,1 %)*	1,50 ± 0,19 (17,7 %)*
Отвар падуба парагвайского	0,31 ± 0,02 (91,2 %)	0,94 ± 0,05 (83,7 %)	1,82 ± 0,07 (111,2 %)	8,73 ± 0,51 (105,2 %)
Отвар падуба на фоне физической нагрузки	0,21 ± 0,04 (60,3 %)* ^a	0,68 ± 0,09 (59,9 %)	2,41 ± 0,19 (147,2 %)* ^a	7,43 ± 0,17 (89,5 %)* ^a
Энергетик «Wild Jaguar»	0,26 ± 0,02 (75,4 %)*	0,92 ± 0,11 (81,9 %)*	1,85 ± 0,12 (113,0 %)	12,70 ± 0,96 (147,1 %)*
Энергетик «Wild Jaguar» на фоне физической нагрузки	0,28 ± 0,03 (81,5 %)* ^a	0,91 ± 0,07 (80,3 %)* ^a	2,75 ± 0,19 (167,5 %)* ^a	6,97 ± 0,18 (79,4 %)* ^a
Отвар кофе	0,27 ± 0,02 (79,0 %)*	1,03 ± 0,03 (90,9 %)	2,39 ± 0,09 (146,0 %)*	2,52 ± 0,20 (30,4 %)*
Отвар кофе на фоне физической нагрузки	0,07 ± 0,02 (20,0 %)* ^a	0,69 ± 0,08 (60,9 %)	6,17 ± 0,14 (376,0 %)	1,63 ± 0,20 (19,6 %)

Примечание. Данные представлены в виде $X \pm S_x$. *, *^a – результаты достоверны при $p \leq 0,05$ ($n = 5$ для каждой серии). Достоверность влияния физической нагрузки, энергетика «Wild Jaguar» и отваров падуба парагвайского и кофе рассчитана по отношению к значениям анализируемых маркеров интактных мышей (*), а эффектов исследуемых препаратов при физической нагрузке – к показателям интактных животных, подвергнутых 10-минутному плаванию (*^a).

Следующий этап работы был посвящен определению гепатопротекторной активности падуба парагвайского в экспериментальной модели алкогольного поражения печени. Основанием для постановки этой серии эксперимента послужил тот факт, что водные экстракты листьев изучаемого растения чрезвычайно богаты биофлавоноидами и органическими кислотами, обладающими антиоксидантными свойствами. В то же время, согласно данным литературы, под действием алкогольдегидрогеназы и цитохрома P₄₅₀ 2E1 алкоголь метаболизируется в ацетальдегид, способный опосредованно активировать перекисное окисление липидов (ПОЛ), что связано с его способностью снижать в гепатоцитах содержание восстановленного глутатиона, который абсолютно необходим для функционирования глутатионпероксидазы,



участвующей в катаболизме H_2O_2 [30]. Накопление активных форм кислорода, в свою очередь, приводит к нарушению структуры липидного бислоя мембран клеток печени, что предопределяет возможность развития острого алкогольного гепатита и цирроза печени у алкоголиков [31]. Ввиду того что алкогольная болезнь печени в настоящее время остается важнейшей медико-социальной проблемой, подобного рода исследования имеют не только фундаментальное, но и прикладное значение.

Как свидетельствуют данные, представленные в табл. 2, хроническое 6-недельное спаивание крыс этанолом приводит к нарушению целостности и функционирования гепатоцитов, что сопровождалось повышением активности щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови подопытных крыс на 181,8 %, ростом содержания общего билирубина на 150,0 %, снижением уровня альбумина на 60 %. Фиксировалось увеличение содержания ТБК-активных продуктов в печени крыс на 197 % и активности каталазы на 75,1 %, что хорошо согласуется как с первоначальной гипотезой, так и с данными литературы [31; 32].

Таблица 2

**Влияние отвара падуба парагвайского
и расторопши пятнистой на сывороточные маркеры
поражения печени и интенсивность ПОЛ в печени интактных крыс
и животных с экспериментальной алкогольной интоксикацией**

Table 2

**The effect of *I. paraguariensis* and *S. marianum* decoction
on the liver serum damage markers and on the indicators of lipid peroxidation
in liver of intact rats and animals with experimental alcohol intoxication**

Серия эксперимента	Содержание альбумина, г/л	Активность ЩФ, мкмоль/л	Содержание общего билирубина, мкмоль/л	Содержание ТБК-активных продуктов, мкмоль/л	Активность каталазы, ммоль H_2O_2 на 1 мг белка в минуту
Интактные крысы	29,2 ± 1,9 (100,0 %)	8,8 ± 0,4 (100,0 %)	1,6 ± 0,5 (100,0 %)	0,15 ± 0,10 (100,0 %)	0,96 ± 0,20 (100,0 %)
Алкогольное поражение печени	10,8 ± 0,4 (40,0 %)*	24,8 ± 1,2 (281,8 %)*	4,0 ± 1,0 (250,0 %)*	0,42 ± 0,05 (297,0 %)*	1,68 ± 0,11 (175,1 %)*
Расторопша пятнистая (7 сут)	32,7 ± 0,9 (111,9 %)	7,2 ± 1,5 (81,8 %)	1,3 ± 0,2 (81,3 %)	0,17 ± 0,10 (113,3 %)	1,18 ± 0,30 (123,3 %)*
Отвар падуба парагвайского (7 сут)	31,2 ± 1,1 (106,9 %)	4,6 ± 0,9 (52,3 %)*	1,8 ± 0,2 (115,0 %)	0,15 ± 0,20 (100,0 %)	1,15 ± 0,20 (120,7 %)*
Расторопша на фоне алкогольного поражения печени	32,2 ± 2,2 (110,3 %)* ^a	10,0 ± 0,9 (113,6 %)* ^a	2,6 ± 0,3 (162,5 %)* ^a	0,19 ± 0,10 (132,1 %)* ^a	1,36 ± 0,17 (142,2 %)* ^a
Отвар падуба на фоне алкогольного поражения печени	30,8 ± 0,6 (105,5 %)* ^a	10,1 ± 0,9 (114,7 %)* ^a	1,3 ± 0,1 (78,8 %)* ^a	0,15 ± 0,30 (100,0 %)* ^a	1,01 ± 0,30 (105,1 %)* ^a

Примечание. Данные представлены в виде $\bar{X} \pm S_x$. * – результаты достоверны при $p \leq 0,05$ ($n = 5$ для каждой серии). Достоверность эффектов этанола, расторопши пятнистой и отвара падуба парагвайского оценивалась по отношению к показателям интактной серии (*), а эффектов растительных препаратов, вводимых крысам с экспериментальным поражением печени, – по отношению к показателям животных с данной патологией, не получавших изучаемый препарат (*^a).

На следующем этапе работы крысам с хроническим алкогольным поражением печени в рацион вводили широко используемый в медицинской практике гепатопротектор растительного происхождения – шрот расторопши пятнистой (*S. marianum*). Находящиеся в составе данного препарата биофлавоноиды обеспечили проявление выраженного антиоксидантного эффекта и способствовали частичному восстановлению функций гепатоцитов крыс, подвергшихся хроническому алкогольному воздействию (см. табл. 2). Так, установлено, что после ежедневного его применения на протяжении 7 сут в экспериментальной модели хронического алкогольного воздействия активность ЩФ снизилась на 168,2 %, содержание общего билирубина – на 87,5 %, а уровень альбумина достиг уровня интактных животных. Описанные изменения сопровождалось уменьшением содержания ТБК-активных продуктов в гомогенате печени крыс на 164,9 % и активности каталазы на 32,9 % по сравнению с показателями животных с хроническим поражением печени этанолом, не получавших препарат. Полного восстановления биохимических параметров состояния печени тем не менее не наблюдалось. Это может быть связано с тем, что образующийся при биотрансформации этанола ацетальдегид способен к неферментативному ацетилированию



SH-, NH₂-групп белков и других соединений в клетке, которое приводит к нарушению их функции, возникновению «сшивок» в структуре молекул и иных негативных эффектов [31].

На заключительном этапе работы животным с хроническим поражением печени и интактным крысам предоставлялся для питья анализируемый отвар падуба парагвайского вместо воды в течение 7 сут. Установлено, что ежедневное потребление анализируемого отвара интактными крысами на протяжении 7 сут не сопровождалось изменением величин биохимических показателей поражения печени, фиксировалось лишь некоторое повышение активности каталазы (см. табл. 2). Как было сказано выше, подобное явление характерно для адаптогенов, кроме того, это подтверждает отсутствие у исследуемого отвара гепатотропных свойств.

В то же время анализ показателей крыс с алкогольным поражением печени, ежедневно употреблявших отвар падуба парагвайского, демонстрирует проявление им защитного действия. Так, ежедневный его прием подопытными крысами сопровождался снижением активности ЩФ на 167,1 % и уровня общего билирубина до значений, близких к норме, а также стабилизацией протеинсинтезирующей функции печени, что нашло отражение в повышении уровня альбумина в сыворотке крови на 65 % (см. табл. 2). С гепатопротекторной активностью коррелировали и антиоксидантные свойства данного отвара: содержание ТБК-активных продуктов и активность каталазы в печени крыс, получавших отвар, снизились до значений, характерных для интактных животных. Указанный эффект может быть реализован благодаря высокому содержанию в водных экстрактах падуба флавоноидов, аскорбиновой и хлорогеновой кислот [4; 9; 10; 19].

Таким образом, способность падуба парагвайского подавлять интенсивность ПОЛ, описанная в литературе [9; 10; 19], была продемонстрирована нами и на модели хронического поражения печени алкоголем. Необходимо отметить, что действие отвара падуба парагвайского оказалось сопоставимо с аналогичными эффектами расторопши пятнистой.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что отвар падуба парагвайского оказывает антиоксидантное и гепатопротекторное действие на крыс с алкогольным поражением печени, сопоставимое с действием классического растительного гепатопротектора – расторопши пятнистой. Кроме того, он проявляет стимулирующий и адаптогенный эффекты в условиях физической нагрузки, незначительно уступающие таковым энергетического напитка «Wild Jaguar», но превосходящие действие кофе торговой марки «Lavazza». Указанные свойства отвара падуба парагвайского могут быть обусловлены наличием в составе данного растения флавоноидов, аскорбиновой и хлорогеновой кислот, проявляющих антиоксидантный эффект, а также кофеина, способного, как известно, стимулировать работу центральной нервной и сердечно-сосудистой систем.

Библиографические ссылки

1. Булаев ВМ, Ших ЕВ, Сычев ДА. *Современная фитотерапия*. Москва: МЕДпресс-информ; 2011. 144 с.
2. Буданцев ЛЮ. Семейство падубовые (Aquifoliaceae). В: Тахтаджян АЛ, редактор. *Жизнь растений*. Том 5. Часть 2. Москва: Просвещение; 1981. с. 311–313.
3. Souza AHP, Corrêa RCG, Barros L, Calhella RC, Santos-Buelga C, Peralta RM, et al. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: an *in vitro* comparative study between the whole plant, leaves and stems. *Food Research International*. 2015;78:286–294. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.09.032.
4. Fernandes CEF, Scapinello J, Bohn A, Boligon AA, Athayde ML, Magro JD, et al. Phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from erva-mate (*Ilex paraguariensis*) fruit using compressed propane and supercritical CO₂. *Journal of Food Science and Technology*. 2017;54(1):98–104. DOI: 10.1007/s13197-016-2440-4.
5. Reginatto FH, Athayde ML, Gosmann G, Schenkel EP. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species – caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 1999;10(6):443–446. DOI: 10.1590/S0103-50531999000600004.
6. Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;136(3):378–384. DOI: 10.1016/j.jep.2010.06.032.
7. de Moraes EC, Stefanuto A, Klein GA, Boaventura BCB, de Andrade F, Wazlawik E, et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(18):8316–8324. DOI: 10.1021/jf901660g.
8. Martins F, Noso TM, Porto VB, Curiel A, Gambero A, Bastos DHM, et al. Maté tea inhibits *in vitro* pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice. *Obesity*. 2010;18(1):42–47. DOI: 10.1038/oby.2009.189.
9. Vieira MA, Maraschin M, Pagliosa CM, Podestá R, De Simas KN, Rockenbach II, et al. Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of maté (*Ilex paraguariensis*) residue. *Journal of Food Science*. 2010;75(3):C280–C285. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01548.x.
10. Furgeri C, Nunes TCF, Fanaro GB, Souza MFF, Bastos DHM, Villavicencio ALCH. Evaluation of phenolic compounds in maté (*Ilex paraguariensis*) processed by gamma radiation. *Radiation Physics and Chemistry*. 2009;78(7–8):639–641. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2009.03.056.



11. Yimam M, Jiao P, Hong M, Brownell L, Lee Y-C, Kim H-J, et al. A botanical composition from *Morus alba*, *Ilex paraguariensis*, and *Rosmarinus officinalis* for body weight management. *Journal of Medicinal Food*. 2017;20(11):1100–1112. DOI: 10.1089/jmf.2017.0002.
12. Luz ABG, da Silva CHB, Nascimento MVPS, de Campos Facchin BM, Baratto B, Fröde TS, et al. The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate) in a murine model of pleurisy. *International Immunopharmacology*. 2016;36:165–172. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.04.027.
13. Ludka FK, Tandler LF, Kuminek G, Olescowicz G, Jacobsen J, Molz S. *Ilex paraguariensis* hydroalcoholic extract exerts antidepressant-like and neuroprotective effects: involvement of the NMDA receptor and the L-arginine-NO pathway. *Behavioural Pharmacology*. 2016;27(4):384–392. DOI: 10.1097/FBP.0000000000000211.
14. de Carvalho EF, de Oliveira SK, Nardi VK, Gelinski TC, Bortoluzzi MC, Maraschin M, et al. *Ilex paraguariensis* promotes orofacial pain relief after formalin injection: involvement of noradrenergic pathway. *Pharmacognosy Research*. 2016;8(suppl. 1):31–37. DOI: 10.4103/0974-8490.178643.
15. Heck CI, De Mejia EG. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*. 2007;72(9):R138–R151. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x.
16. Klein GA, Stefanuto A, Boaventura BCB, de Morais EC, da S Cavalcante L, de Andrade F, et al. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 diabetes and pre-diabetes individuals: a pilot study. *Journal of the American College of Nutrition*. 2011;30(5):320–332. DOI: 10.1080/07315724.2011.10719975.
17. Alkhatib A, Atcheson R. Yerba maté (*Ilex paraguariensis*) metabolic, satiety, and mood state effects at rest and during prolonged exercise. *Nutrients*. 2017;9(8):882. DOI: 10.3390/nu9080882.
18. Branco CS, Scola G, Rodrigues AD, Cesio V, Heinzen H, Godoy A, et al. Organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) improves metabolic redox status of liver and serum in Wistar rats. *Antioxidants*. 2013;2(3):100–109. DOI: 10.3390/antiox2030100.
19. Dabulici CM, Sârbu I, Vamanu E. The bioactive potential of functional products and bioavailability of phenolic compounds. *Foods*. 2020;9(7):953. DOI: 10.3390/foods9070953.
20. Lutomski P, Goździewska M, Florek-Luszczki M. Health properties of yerba mate. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2020;27(2):310–313. DOI: 10.26444/aem/119994.
21. Gebara KS, Gasparotto A Junior, Palozi RAC, Morand C, Bonetti CI, Gozzi PT, et al. A randomized crossover intervention study on the effect a standardized maté extract (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) in men predisposed to cardiovascular risk. *Nutrients*. 2021;13(1):14. DOI: 10.3390/nu13010014.
22. Машковский МД. *Лекарственные средства*. 16-е издание. Москва: Новая волна; 2020. 1216 с.
23. Колб ВГ, Камышников ВС. *Справочник по клинической химии*. 2-е издание. Минск: Беларусь; 1982. 368 с.
24. Губич ОИ, составитель. *Биоэнергетика. Практикум*. Минск: БГУ; 2016. 87 с.
25. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. 1984;105:121–126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
26. Северин СЕ, Соловьева ГА, редакторы. *Практикум по биохимии*. 2-е издание. Москва: Издательство Московского университета; 1989. 509 с.
27. Яременко КВ. Учение Н. В. Лазарева о СНПС и адаптогенах как базовая теория профилактической медицины. *Психофармакология и биологическая наркология*. 2005;5(4):1086–1092.
28. Губич ОИ, Пучкова КВ, Залеская НА, Крючкова НВ. Исследование адаптогенных свойств рододендрона Адамса (*Rhododendron adamsii* Rehder.) на экспериментальных моделях *in vivo*. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2018;1:60–68.
29. Николаеня ЕВ, Губич ОИ. Влияние препарата железницы крымской (*Sideritis scandica*) на показатели углеводного обмена сыворотки крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом. В: *Материалы VI Всеукраинской научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Біологічні дослідження – 2015»; 10–11 марта 2015 г.; Житомир, Украина*. Житомир: Рута; 2015. с. 414–415.
30. Walsh K, Alexander G. Alcoholic liver disease. *Postgraduate Medical Journal*. 2000;76(895):280–286. DOI: 10.1136/pmj.76.895.280.
31. Ковалев ГА, Петренко АЮ. Экспериментальная модель алкогольного поражения печени у самок крыс. *Вестник Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Серия: Медицина*. 2004;8:15–18.
32. Губич ОИ, Дашкова ЯЮ, Кривленя ИИ. Сравнительная оценка гепатопротекторных свойств растительных адаптогенов на экспериментальной модели хронического алкогольного поражения печени *in vivo*. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;1:54–62.

References

1. Bulaev VM, Shikh EV, Sychev DA. *Sovremennaya fitoterapiya* [Modern phytotherapy]. Moscow: MEDpress-inform; 2011. 144 p. Russian.
2. Budantsev LYU. [Holly family (Aquifoliaceae)]. In: Takhtadzhyan AL, editor. *Zhizn' rastenii. Tom 5. Chast' 2* [The plant life. Volume 5. Part 2]. Moscow: Prosveshchenie; 1981. p. 311–313. Russian.
3. Souza AHP, Corrêa RCG, Barros L, Calhêla RC, Santos-Buelga C, Peralta RM, et al. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: an *in vitro* comparative study between the whole plant, leaves and stems. *Food Research International*. 2015;78:286–294. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.09.032.
4. Fernandes CEF, Scapinello J, Bohn A, Boligon AA, Athayde ML, Magro JD, et al. Phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from erva-mate (*Ilex paraguariensis*) fruit using compressed propane and supercritical CO₂. *Journal of Food Science and Technology*. 2017;54(1):98–104. DOI: 10.1007/s13197-016-2440-4.
5. Reginatto FH, Athayde ML, Gosmann G, Schenkel EP. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species – caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 1999;10(6):443–446. DOI: 10.1590/S0103-50531999000600004.
6. Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;136(3):378–384. DOI: 10.1016/j.jep.2010.06.032.



7. de Moraes EC, Stefanuto A, Klein GA, Boaventura BCB, de Andrade F, Wazlawik E, et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(18):8316–8324. DOI: 10.1021/jf901660g.
8. Martins F, Noso TM, Porto VB, Curiel A, Gambero A, Bastos DHM, et al. Maté tea inhibits *in vitro* pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice. *Obesity*. 2010;18(1):42–47. DOI: 10.1038/oby.2009.189.
9. Vieira MA, Maraschin M, Pagliosa CM, Podestá R, De Simas KN, Rockenbach II, et al. Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of maté (*Ilex paraguariensis*) residue. *Journal of Food Science*. 2010;75(3):C280–C285. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01548.x.
10. Furgeri C, Nunes TCF, Fanaro GB, Souza MFF, Bastos DHM, Villavicencio ALCH. Evaluation of phenolic compounds in maté (*Ilex paraguariensis*) processed by gamma radiation. *Radiation Physics and Chemistry*. 2009;78(7–8):639–641. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2009.03.056.
11. Yimam M, Jiao P, Hong M, Brownell L, Lee Y-C, Kim H-J, et al. A botanical composition from *Morus alba*, *Ilex paraguariensis*, and *Rosmarinus officinalis* for body weight management. *Journal of Medicinal Food*. 2017;20(11):1100–1112. DOI: 10.1089/jmf.2017.0002.
12. Luz ABG, da Silva CHB, Nascimento MVPS, de Campos Facchin BM, Baratto B, Fröde TS, et al. The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate) in a murine model of pleurisy. *International Immunopharmacology*. 2016;36:165–172. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.04.027.
13. Ludka FK, Tandler LF, Kuminek G, Olescowicz G, Jacobsen J, Molz S. *Ilex paraguariensis* hydroalcoholic extract exerts antidepressant-like and neuroprotective effects: involvement of the NMDA receptor and the L-arginine-NO pathway. *Behavioural Pharmacology*. 2016;27(4):384–392. DOI: 10.1097/FBP.0000000000000211.
14. de Carvalho EF, de Oliveira SK, Nardi VK, Gelinski TC, Bortoluzzi MC, Maraschin M, et al. *Ilex paraguariensis* promotes orofacial pain relief after formalin injection: involvement of noradrenergic pathway. *Pharmacognosy Research*. 2016;8(suppl. 1):31–37. DOI: 10.4103/0974-8490.178643.
15. Heck CI, De Mejia EG. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*. 2007;72(9):R138–R151. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x.
16. Klein GA, Stefanuto A, Boaventura BCB, de Moraes EC, da S Cavalcante L, de Andrade F, et al. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 diabetes and pre-diabetes individuals: a pilot study. *Journal of the American College of Nutrition*. 2011;30(5):320–332. DOI: 10.1080/07315724.2011.10719975.
17. Alkhatib A, Atcheson R. Yerba maté (*Ilex paraguariensis*) metabolic, satiety, and mood state effects at rest and during prolonged exercise. *Nutrients*. 2017;9(8):882. DOI: 10.3390/nu9080882.
18. Branco CS, Scola G, Rodrigues AD, Cesio V, Heinzen H, Godoy A, et al. Organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) improves metabolic redox status of liver and serum in Wistar rats. *Antioxidants*. 2013;2(3):100–109. DOI: 10.3390/antiox2030100.
19. Dabulici CM, Sárbu I, Vamanu E. The bioactive potential of functional products and bioavailability of phenolic compounds. *Foods*. 2020;9(7):953. DOI: 10.3390/foods9070953.
20. Lutowski P, Goździewska M, Florek-Luszczki M. Health properties of yerba mate. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2020;27(2):310–313. DOI: 10.26444/aaem/119994.
21. Gebara KS, Gasparotto A Junior, Palozi RAC, Morand C, Bonetti CI, Gozzi PT, et al. A randomized crossover intervention study on the effect a standardized maté extract (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) in men predisposed to cardiovascular risk. *Nutrients*. 2021;13(1):14. DOI: 10.3390/nu13010014.
22. Mashkovskii MD. *Lekarstvennye sredstva* [Medicines]. 16th edition. Moscow: Novaya volna; 2020. 1216 p. Russian.
23. Kolb VG, Kamyshnikov VS. *Spravochnik po klinicheskoi khimii* [Handbook of clinical and biochemical diagnostics]. 2nd edition. Minsk: Belarus'; 1982. 368 p. Russian.
24. Gubich OI, compiler. *Bioenergetika. Praktikum* [Bioenergetics. Workshop]. Minsk: Belarusian State University; 2016. 87 p. Russian.
25. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. 1984;105:121–126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
26. Severin SE, Solov'eva GA, editors. *Praktikum po biokhimii* [Workshop on biochemistry]. 2nd edition. Moscow: Izdatel'stvo Moskovskogo universiteta; 1989. 509 p. Russian.
27. Jaremenko KV. The N. V. Lazarev's theory of state unspecific increased resistance (SUIR) and adaptogens as a basis of preventive medicine. *Psychopharmacology and Biological Narcology*. 2005;5(4):1086–1092. Russian.
28. Hubich AI, Puchkova KV, Zalesskaya NA, Kryuchkova NV. The investigation of the adaptogenic properties of *Rhododendron adamsii* Rehder. on experimental models *in vivo*. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;1:60–68. Russian.
29. Nikalaenya AV, Hubich AI. [Influence of the preparation of *Sideritis scandica* on the parameters of carbohydrate metabolism of blood serum of rats with experimental diabetes mellitus]. In: *Materialy VI Vseukrainskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii molodykh uchenykh i studentov «Biologichni doslidzhennja – 2015»; 10–11 marta 2015 g.; Zhitomir, Ukraina* [Proceedings of the 6th All-Ukrainian scientific and practical conference of young scientists and students «Biological investigations – 2015»; 2015 March 10–11; Zhitomir, Ukraine]. Zhitomir: Ruta; 2015. p. 414–415. Russian.
30. Walsh K, Alexander G. Alcoholic liver disease. *Postgraduate Medical Journal*. 2000;76(895):280–286. DOI: 10.1136/pmj.76.895.280.
31. Kovalyov GA, Petrenko AYU. An experimental model of alcohol induced hepatic injury at female rats. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series: Medicine*. 2004;8:15–18. Russian.
32. Hubich AI, Dashkova YaYu, Krivlenya IN. The comparative evaluation of plant adaptogenes' hepatoprotective properties on the experimental model of rat liver chronic alcohol damage *in vivo*. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;1:54–62. Russian.

Получена 27.11.2020 / исправлена 23.02.2021 / принята 03.05.2021.
Received 27.11.2020 / revised 23.02.2021 / accepted 03.05.2021.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 579.253.43

УВЕЛИЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM* S-1 В РЕЗУЛЬТАТЕ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНОВ *lysR3* И *mtfA*

А. А. МУРАТОВА¹⁾, М. Н. МАНДРИК-ЛИТВИНКОВИЧ¹⁾, Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ^{1), 2)}

¹⁾Институт микробиологии НАН Беларуси,

ул. Академика В. Ф. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Беларусь

²⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Проведена направленная безмаркерная инактивация генов *lysR3* и *mtfA* у бактерий *Pseudomonas brassicacearum* S-1. Показано, что у штаммов *P. brassicacearum* S-1-*lysR3*, *P. brassicacearum* S-1-*mtfA* и *P. brassicacearum* S-1-*lysR3*-*mtfA* антагонистическая активность в отношении ряда фитопатогенов в 1,2–1,6 раза выше, чем у исходного штамма. Полученные мутантные варианты в модельном эксперименте не оказывали фитотоксического действия на рост и развитие растений томата, огурца и петрушки. При обработке семян томата и огурца раствором культуральной жидкости штамма *P. brassicacearum* S-1-*lysR3*-*mtfA* длина корней проростков увеличивалась в 1,4 раза в сравнении с длиной корней при воздействии исходного штамма. Также было показано, что исследованные штаммы способны выживать в почвенном микробном консорциуме.

Ключевые слова: мутагенез; рекомбинерия; антимикробная активность; *Pseudomonas brassicacearum*; ростостимуляция.

Образец цитирования:

Муратова АА, Мандрик-Литвинкович МН, Валентович ЛН. Увеличение антимикробной активности бактерий *Pseudomonas brassicacearum* S-1 в результате инактивации генов *lysR3* и *mtfA*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;2:52–63.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-52-63>

For citation:

Muratova AA, Mandryk-Litvinkovich MN, Valentovich LN. Increasing the antimicrobial activity of *Pseudomonas brassicacearum* S-1 by inactivation of *lysR3* and *mtfA* genes. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2021;2:52–63. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-52-63>

Авторы:

Анна Алексеевна Муратова – младший научный сотрудник лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований».

Марина Николаевна Мандрик-Литвинкович – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией молекулярной диагностики и биологического контроля фитопатогенных микроорганизмов отдела биотехнологии средств биологического контроля.

Леонид Николаевич Валентович – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией «Центр аналитических и генно-инженерных исследований»¹⁾, старший преподаватель кафедры молекулярной биологии биологического факультета²⁾.

Authors:

Anna A. Muratova, junior researcher at laboratory «Centre of analytical and genetic engineering research».
anya.muratova.93@mail.ru

Maryna N. Mandryk-Litvinkovich, PhD (biology), docent; head of the laboratory of molecular diagnostics and biological control of phytopathogenic microorganisms, department of biotechnology of biological control agents.
biocontrol@mbio.bas-net.by

Leonid N. Valentovich, PhD (biology), docent; head of the laboratory «Centre of analytical and genetic engineering research»^a and senior lecturer at the department of molecular biology, faculty of biology^b.
valentovich@mbio.bas-net.by



INCREASING THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM* S-1 BY INACTIVATION OF *lysR3* AND *mtfA* GENES

A. A. MURATOVA^a, M. N. MANDRYK-LITVINKOVICH^a, L. N. VALENTOVICH^{a, b}

^aInstitute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus,

2 Academician V. F. Kupreviča Street, Minsk 220141, Belarus

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

Corresponding author: A. A. Muratova (anya.muratova.93@mail.ru)

Site-specific markerless inactivation of genes *lysR3* and *mtfA* of bacteria *Pseudomonas brassicacearum* S-1 was carried out. It was shown that strains *P. brassicacearum* S-1-*lysR3*, *P. brassicacearum* S-1-*mtfA* and *P. brassicacearum* S-1-*lysR3*-*mtfA* demonstrate increased antagonistic activity against a number of phytopathogens 1.2–1.6 times higher compared with the original strain. In the laboratory experiment, mutant variants did not affect growth and development of tomato, cucumber and parsley plants. Treating tomato and cucumber seeds with a solution of the culture of the strain *P. brassicacearum* S-1-*lysR3*-*mtfA* led to the increase of seedlings roots length by 1.4 times compared with the original strain. We also determined that the examined strains were able to survive in the soil microbial consortium.

Keywords: mutagenesis; recombineering; antimicrobial activity; *Pseudomonas brassicacearum*; growth stimulation.

Введение

Важным фактором для получения высокой урожайности в современных системах земледелия является защита сельскохозяйственных культур от фитопатогенов. Для этого используются высокоэффективные химические средства защиты растений [1]. Однако существует ряд значительных недостатков применения пестицидов: подавление роста полезных почвенных микроорганизмов, умеренная фитотоксичность, загрязнение окружающей среды и т. д. [2]. Альтернативой пестицидам являются биопрепараты на основе живых штаммов ризобактерий [3]. Для создания таких средств защиты растений, в частности, используются бактерии рода *Pseudomonas*, продуцирующие во внешнюю среду широкий спектр биологически активных соединений с антимикробным и ростостимулирующим действием [4].

В настоящее время ведутся работы по созданию улучшенных препаратов нового поколения с комбинированными свойствами или более высокими показателями антагонистической и ростостимулирующей активности [5; 6]. Однако без информации о регуляторных и структурных элементах геномов, связанных с хозяйственно значимыми признаками, это довольно затруднительно. Ранее нами была определена нуклеотидная последовательность генома штамма *P. brassicacearum* S-1 (код доступа в базе данных GenBank – CP045701) [7], который является основой биопрепарата «Экогрин», разработанного на базе Института микробиологии НАН Беларуси. Данный препарат используется для защиты огурцов, томатов и зеленных культур от корневых и прикорневых гнилей [8]. Таким образом, стало возможным проведение детального молекулярно-генетического анализа в целях изучения механизмов синтеза первичных и вторичных метаболитов и последующего создания штаммов с улучшенными свойствами для практического использования. В частности, без внесения дополнительных генетических детерминант можно повысить антимикробную и ростостимулирующую активность штаммов за счет направленного изменения отдельных генов [9]. Также нами проведен транспозонный мутагенез для выявления генов, которые способны определять антагонистическую активность штамма *P. brassicacearum* S-1, но не входят в состав описанных в литературе кластеров. В результате анализа 100 мутантов были отобраны два штамма, у которых увеличивалась антагонистическая активность в отношении ряда фитопатогенов в сравнении с контролем. У отобранных мутантов определено место инсерции транспозона mini-Tn5xylE. Установлено, что вставка произошла в кодирующие белок последовательности GFU70_00385 и GFU70_25165, которые мы назвали *lysR3* и *mtfA* соответственно, так как они, предположительно, ответственны за синтез транскрипционного фактора семейства LysR и металлопептидазы семейства M90 [10; 11]. Однако полученные данные не позволили нам однозначно интерпретировать фенотипический эффект мутаций: с одной стороны, в результате редкого события множественной транспозиции mini-Tn5xylE мог встроиться в несколько точек в геноме, с другой стороны, так как в составе транспозона mini-Tn5xylE присутствует конститутивный промотор, наблюдаемые эффекты могут быть вызваны не инактивацией тех генов, в которые непосредственно встроился транспозон, а изменением экспрессии нижележащих генов. Таким образом, только при направленной безмаркерной инактивации генов *lysR3* и *mtfA* можно сделать точное заключение о роли данных кодирующих белок последовательностей в изменении антимикробных свойств штамма *P. brassicacearum* S-1.



Целью настоящего исследования являлись молекулярно-генетический анализ генов *lysR3* и *mtfA*, вероятно кодирующих синтез транскрипционного фактора семейства LysR и металлопептидазы семейства M90 соответственно, и определение их роли в проявлении антагонистической и ростостимулирующей активности у бактерий *P. brassicacearum* S-1.

Материалы и методы исследования

Использованные в работе штаммы бактерий и плазмиды перечислены в табл. 1. Объектом исследования являлись бактерии *P. brassicacearum* S-1 – антагонисты фитопатогенов сельскохозяйственных культур. Глубинное культивирование псевдомонад и пектобактерий осуществляли на питательной среде LB (лизогенный бульон) [12] или Мейнелла [13] с перемешиванием при 200 об/мин и температуре 28–30 °С. Продолжительность культивирования составляла 24–48 ч. Бактерии *Escherichia coli* выращивали при 37 °С в жидкой LB-среде в течение 12–14 ч с перемешиванием при 120–160 об/мин. Грибные патогены культивировали в картофельном бульоне с перемешиванием при 120–160 об/мин и температуре 22 °С.

Таблица 1

Характеристика штаммов микроорганизмов и плазмид, использованных в работе

Table 1

Characteristics of strains and plasmids used in this work

Штаммы, плазмиды	Характеристика	Источник
Микроорганизмы		
<i>Alternaria alternata</i> БИМ В-462	Возбудитель альтернариоза огурца	Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов
<i>Pseudomonas syringae</i> БИМ В-280	Возбудитель бактериального ожога сои	
<i>Pectobacterium carotovorum</i> БИМ В-662	Возбудитель мокрых гнилей овощных культур	
<i>Colletotrichum lupini</i> БИМ F-397	Возбудитель антракноза люпина	
<i>Fusarium oxysporum</i> БИМ F-798	Возбудитель корневой гнили томата	
<i>E. coli</i>		
S17-1	<i>thi</i> <i>rspL</i> (Str ^R) <i>endA</i> <i>sbCB15</i> <i>sbC</i> <i>hsdR</i> (r _k ⁻ m _k ⁻) Δ (<i>lac-proAB</i>) [F' <i>traD36</i> <i>lacI</i> ^q Δ(<i>lacZ</i>) <i>M15</i> <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺] λ <i>pir</i> ⁺	[14]
XL1-Blue	F' <i>proAB</i> <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Tn10(Tet ^r)/ <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> (Nal ^r) <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i>	[15]
<i>P. brassicacearum</i>		
S-1 (БИМ В-446)	Ery ^R , содержит спонтанную хромосомную мутацию, определяющую устойчивость к эритромицину, получен из штамма <i>P. brassicacearum</i> S	Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов
S-1-lysR3	Ery ^R , в хромосоме <i>P. brassicacearum</i> S-1 делеция в гене <i>lysR3</i> с 286 по 522 п. н.	Получены в данной работе
S-1-mtfA	Ery ^R , в хромосоме <i>P. brassicacearum</i> S-1 делеция в гене <i>mtfA</i> с 60 по 547 п. н.	
S-1-lysR3-mtfA	Ery ^R , в хромосоме <i>P. brassicacearum</i> S-1 делеция в генах <i>lysR3</i> с 286 по 522 п. н. и <i>mtfA</i> с 60 по 547 п. н.	
Плазмиды		
pJET1.2	Ap ^R , P _{lacUV5} , <i>eco47IR</i> , oriV _{ColE1}	Официальный сайт фирмы-изготовителя ¹
pJQ200KS	Gm ^R , <i>lacZa</i> , <i>sacB</i> , <i>mob</i> , oriV _{p15A}	[16]

¹CloneJET PCR Cloning Kit [Electronic resource]. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231> (date of access: 18.02.2021).



Окончание табл. 1
Ending table 1

Штаммы, плазмиды	Характеристика	Источник
pLS1648	Ap ^R , Km ^R , кассета loxP- <i>neo</i> -loxP, oriV _{R6K}	[17]
pLS3063	Tc ^R , <i>xyIS</i> , Pm – λ Red (Gam, Beta, Exo), <i>sacB</i> , <i>mekR</i> , P _{MekA} – cre, oriV _{RK2}	
pJET::lysR3	pJET со вставкой гена <i>lysR3</i> с фланкирующими генами	Получены в данной работе
pJET::mtfA	pJET со вставкой гена <i>mtfA</i> с фланкирующими генами	
pJET::lysR3-loxP- <i>neo</i> -loxP	pJET со вставкой локуса генов <i>lysR3-loxP-neo-loxP</i> по сайту Eco32I	
pJET::mtfA-loxP- <i>neo</i> -loxP	pJET со вставкой локуса генов <i>mtfA-loxP-neo-loxP</i> по сайту Eco32I	
pJQ200KS::lysR3-loxP- <i>neo</i> -loxP	pJQ200KS со вставкой локуса генов <i>lysR3-loxP-neo-loxP</i> по сайту SmaI	
pJQ200KS::mtfA-loxP- <i>neo</i> -loxP	pJQ200KS со вставкой локуса генов <i>mtfA-loxP-neo-loxP</i> по сайту SmaI	

Для ферментативного разрезания молекул ДНК использовали следующие эндонуклеазы рестрикции: SmaI, Eco32I, EcoO109I, KpnI. Для лигирования ДНК применяли ДНК-лигазу T4 (все ферменты производства компании *Thermo Fisher Scientific* (США)), придерживаясь рекомендаций фирмы-изготовителя.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием реактивов ООО «АртБиоТех» (Беларусь). Реакционная смесь (50 мкл) содержала 100 нг ДНК-матрицы, дНТФ (нуклеозидтрифосфаты, по 0,2 ммоль/л каждого нуклеотида), 1,5 ммоль/л MgCl₂, 0,2 мкмоль/л каждого праймера, Flash ДНК-полимеразу (1,25 ед.) и АМ-буфер (кратность ×1). Проверка на наличие шпильчатых структур в пределах праймеров и определение температуры отжига выполнялись с помощью ресурса Primer-BLAST и онлайн-олигокалькулятора². Перечень и характеристика праймеров, режимы ПЦР приведены в табл. 2.

Таблица 2

Характеристика использованных в работе праймеров и режимов ПЦР

Table 2

Characteristics of primers used in this work and PCR programs

Праймер	Последовательность (5' → 3')	Режим ПЦР	Мишень
pJET-F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	96 °C – 3 мин (1 цикл); 96 °C – 15 с, 53 °C – 15 с, 72 °C – 1 мин 30 с (30 циклов); 72 °C – 3 мин (1 цикл)	Вставка в плазмиде pJET1.2
pJET-R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG		
lysR3-F	AGTACGTGGAGCGCACATTG	98 °C – 3 мин (1 цикл); 98 °C – 15 с, 53 °C – 15 с, 72 °C – 1 мин (30 циклов); 72 °C – 3 мин (1 цикл)	Ген <i>lysR3</i> с фланкирующими генами
lysR3-R	TTCGTAGCCGTGCAACTGGT		
mtfA-F	AGGTCGGTGTATTCCTTCAC	98 °C – 3 мин (1 цикл); 98 °C – 15 с, 60 °C – 15 с, 72 °C – 1 мин (30 циклов); 72 °C – 3 мин (1 цикл)	Ген <i>mtfA</i> с фланкирующими генами
mtfA-R	ATCTACGCCATCCTGTTCCT		
loxP-F	CCGAAGTTCCTATTCTCTAG	96 °C – 3 мин (1 цикл); 96 °C – 15 с, 53 °C – 15 с, 72 °C – 40 с (30 циклов); 72 °C – 3 мин (1 цикл)	Конструкция loxP- <i>neo</i> -loxP на плазмиде pLS1648
loxP-R	CGAAAAGTGCCACCTGCATCG		

²Олиго Кальк: программа для расчета свойств олигонуклеотидов (праймеров) [Электронный ресурс]. URL: <http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html> (дата обращения: 19.02.2021).



Окончание табл. 2
Ending table 2

Праймер	Последовательность (5' → 3')	Режим ПЦР	Мишень
cre-F	ACGAGTGATGAGGTTTCGC	96 °C – 3 мин (1 цикл); 96 °C – 15 с, 54 °C – 15 с, 72 °C – 1 мин 30 с (30 циклов); 72 °C – 3 мин (1 цикл)	Ген, кодирующий Cre-рекомбиназу, на плазмиде pLS3063
trfA-R	CGAAGAGTTGCGAGGCAGC		

Электротрансформацию бактерий *E. coli* проводили согласно методическим рекомендациям, изложенным в руководстве [18].

Плазмидную ДНК из бактерий выделяли с использованием набора GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (каталожный номер – K0502) производства *Thermo Fisher Scientific*.

Для направленного мутагенеза применяли сочетание λ -Red-зависимой рекомбинации и сайт-специфической рекомбинации Cre-loxP. Совокупность данных методов позволяет без внесения дополнительных генетических детерминант инактивировать целевые гены, а также проводить множественные нокауты генов в составе хромосомы исследуемого штамма. Мутагенез выполняли согласно модифицированной методике, изложенной в статье С. В. Буйницкой с соавторами [19].

Конъюгацию осуществляли следующим образом: клетки донора *E. coli* S17-1, содержащие плазмидные конструкции pJQ200KS::lysR3-loxP-neo-loxP, pJQ200KS::mtfA-loxP-neo-loxP, а также клетки реципиента *P. brassicacearum* S-1 [pLS3063], находящиеся в стационарной фазе роста, сгущали в 5 раз, смешивали в соотношении 1 : 1 и наносили полученную смесь на стерильные мембранные фильтры Synpro 6 (размер пор – 0,45 мкм), помещенные на поверхность полноценной агаризованной среды в чашках Петри. Скрещиваемые бактерии инкубировали в течение 48 ч при 30 °C, после чего клетки смывали физиологическим раствором и высевали на селективные среды.

Определение антимикробной активности проводили в трехкратной повторности с помощью метода отсроченного антагонизма [20], расчеты выполняли с учетом стандартного отклонения³. Достоверность различий средних величин устанавливали с помощью *t*-критерия Стьюдента⁴. В качестве тест-культур использовали штаммы фитопатогенных микроорганизмов, приведенные в табл. 1.

Способность штаммов *P. brassicacearum* S-1, *P. brassicacearum* S-1-lysR3, *P. brassicacearum* S-1-mtfA и *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA стимулировать рост и развитие растений томата сорта Загадка, огурца сорта Крак F1 и петрушки сорта Листовая обычная определяли следующим образом: семена в течение 30 мин замачивали в растворе культуральных жидкостей (КЖ) бактерий ((1,4–2,2) · 10⁸ КОЕ/мл) или воде (отрицательный контроль), после чего раскладывали на увлажненные бумажные фильтры в чашки Петри. Через 3–6 сут определяли всхожесть, а через 11–14 сут измеряли длину корней и гипокотили у проростков в опытном и контрольном вариантах.

Для проверки жизне- и конкурентоспособности штаммов *P. brassicacearum* S-1, *P. brassicacearum* S-1-lysR3, *P. brassicacearum* S-1-mtfA и *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA осуществляли моделирование почвенного микробного консорциума, для которого использовали почвогрунт *Terra Vita* (ООО «Норд Палп», Россия). В подготовленную почву высаживали растения томата, огурца и петрушки, которые предварительно были пророщены на смоченных в воде фильтрах в чашках Петри. Через 2 сут после высадки проростков в качестве полива растений вносили по 20 мл растворов КЖ исследуемых штаммов ((3,2–4,4) · 10⁹ КОЕ/мл) на 150 г почвы. Через 15 и 31 сут после внесения в почву исследуемых штаммов осуществляли отбор 1 г почвы, готовили серии разведений, из которых проводили высева на селективные среды, содержащие антибиотики – эритромицин и ампициллин – в концентрациях 50 и 100 мкг/мл соответственно. Подсчет числа КОЕ выполняли согласно методическим рекомендациям, изложенным в руководстве [21].

Визуализацию карт плазмидных векторов и генетических локусов осуществляли с помощью программы *SnapGene Viewer 5.2*. Сравнение аминокислотных и нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакета программ *Blast* [22] и баз данных, расположенных на ресурсе NCBI [23].

Результаты и их обсуждение

Согласно литературным данным не было описано влияние генов *lysR3* (GFU70_00385), *mtfA* (GFU70_25165) или их ортологов на хозяйственно ценные свойства бактерий рода *Pseudomonas*, которые

³Calculating standard deviation step by step [Electronic resource]. URL: <https://www.khanacademy.org/math/statistics-probability/summarizing-quantitative-data/variance-standard-deviation-population/a/calculating-standard-deviation-step-by-step> (date of access: 24.02.2021).

⁴Расчет *t*-критерия Стьюдента при сравнении средних величин (онлайн-калькулятор) [Электронный ресурс]. URL: <https://medstatistic.ru/calculators/averagstudent.html> (дата обращения: 06.04.2021).



являются основой биопрепаратов для защиты сельскохозяйственных растений от болезней. Таким образом, чтобы определить изменение фенотипических свойств штамма *P. brassicacearum* S-1, связанных с инактивацией генов *lysR3*, *mtfA*, проведен молекулярно-генетический анализ исследуемых генетических детерминант.

Ген *lysR3* кодирует белок размером 315 аминокислотных остатков (а. о.) (pI 5,78). Было установлено, что белок LysR имеет наибольшее сходство с белками LysR из *Pseudomonas* sp. SWRI179 (WP_186728495.1, идентичность 96,52 %) и *Pseudomonas* sp. Root401 (WP_057449273.1, идентичность 96,20 %). Он содержит домен chol_sulf_TF (8–297 а. о., TIGR03418), который характерен для транскрипционных факторов, обеспечивающих регуляцию экспрессии генов, ответственных за транспорт холина и синтез холинсульфата. Считается, что холин и его производные в бактериях являются предшественниками глицинбетаина, который действует как эффективный осмопротектор [24].

Ген *mtfA* определяет синтез белка размером 270 а. о. (pI 4,75). Как показал анализ, наибольшее сходство исследуемый белок имеет с белками из *P. fluorescens* (WP_064107071.1, идентичность 98,89 %) и *P. kilonensis* (WP_024619870.1, идентичность 98,15 %). Белок MtfA содержит домен Peptidase_M90 (4–249 а. о., pfam06167), который хорошо охарактеризован для бактерий *E. coli* [25]. Считается, что белок MtfA может инактивировать репрессор Mlc, который играет одну из ключевых ролей в регуляции работы глюкозофосфотрансферазной системы бактерий.

Было установлено, что гены *lysR3* и *mtfA* присутствуют в геномах не только всех изученных штаммов *P. brassicacearum*, но и других представителей рода *Pseudomonas*. Это говорит о важности выполняемых данными генами функций для клетки.

Далее для изучения влияния генов *lysR3* и *mtfA* на антимикробные свойства исследуемого штамма проводили направленный безмаркерный нокаут генов в несколько этапов. Для этого были амплифицированы генетические локусы, состоящие из генов *lysR3* и *mtfA* с фланкирующими генами. Для сохранности полученных ампликонов выполняли лигирование ПЦР-продуктов с вектором pJET1.2 по сайту Eco32I. Отбор рекомбинантных генетических конструкций осуществляли в клетках *E. coli* XL1-Blue. Затем выделяли плазмиды pJET::*lysR3*, pJET::*mtfA* и обрабатывали их парами рестриктаз Eco32I/SmaI и EcoO109I/KpnI соответственно для удаления большей части нуклеотидной последовательности целевых генов. В результате рамка считывания генов *lysR3* и *mtfA* была нарушена, оставались лишь области для гомологичной рекомбинации ниже и выше от генов *lysR3* и *mtfA* размером 669 и 859 п. н., а также 531 и 831 п. н. соответственно.

На следующем этапе проводили амплификацию фрагмента loxP-neo-loxP из плазмиды pLS1648, который лигировали с фрагментами плазмид pJET::*lysR3* и pJET::*mtfA*. Гибридные конструкции отбирали в клетках *E. coli* XL1-Blue. Затем выделяли полученные плазмиды pJET::*lysR3*-loxP-neo-loxP, pJET::*mtfA*-loxP-neo-loxP, выполняли амплификацию кассет *lysR3*'-loxP-neo-loxP-'*lysR3* и *mtfA*'-loxP-neo-loxP-'*mtfA* с использованием пар праймеров *lysR3*-F/*lysR3*-R и *mtfA*-F/*mtfA*-R. Полученные ПЦР-фрагменты лигировали с конъюгативным вектором pJQ200KS, предварительно обработанным рестриктазой SmaI. Схема получения конъюгативных векторов pJQ200KS::*lysR3*-loxP-neo-loxP и pJQ200KS::*mtfA*-loxP-neo-loxP представлена на рис. 1.

Векторные конструкции pJQ200KS::*lysR3*-loxP-neo-loxP, pJQ200KS::*mtfA*-loxP-neo-loxP вводили в клетки конъюгативного штамма *E. coli* S17-1 методом электропорации. Также была проведена электропорация клеток-реципиентов *P. brassicacearum* S-1 плазмидой pLS3063. Далее осуществляли конъюгацию на фильтрах штаммов-доноров *E. coli* S17-1 [pJQ200KS::*lysR3*-loxP-neo-loxP], *E. coli* S17-1 [pJQ200KS::*mtfA*-loxP-neo-loxP] и штамма-реципиента *P. brassicacearum* S-1 [pLS3063].

В результате гомологичной рекомбинации удалось отобрать варианты, несущие дефектные гены *lysR3* и *mtfA*. В составе данных генов после рекомбинации находились кассеты loxP-neo-loxP, для удаления которых осуществляли индукцию экспрессии гена (в составе плазмиды pLS3063), кодирующего Cre-рекомбиназу. Cre-рекомбиназа удаляла кассеты loxP-neo-loxP из состава хромосомы отобранных штаммов, что было подтверждено с помощью ПЦР: получены ампликоны дефектных генов размером 1646 п. н. для *lysR3* и 1480 п. н. для *mtfA* (рис. 2).

Далее проводили элиминацию плазмиды pLS3063 из мутантных вариантов путем посева штаммов на среду с сахарозой, в результате чего происходила экспрессия гена *sacB* (находился в составе плазмиды pLS3063) и образование фермента левансахаразы, который обеспечивает превращение сахарозы в токсичное для грамотрицательных бактерий соединение – леван. Выживали только те клетки, которые утратили плазмиду pLS3063. Отсутствие данной плазмиды в клетках проверено с помощью ПЦР со специфическими праймерами cre-F/trfA-R. В результате отобранные варианты бактерий *P. brassicacearum* S-1 с дефектными генами *lysR3* и *mtfA*. Аналогичным способом был получен штамм, несущий мутации по двум генам одновременно, при этом инактивированные гены не имеют в своем составе дополнительных генетических детерминант.

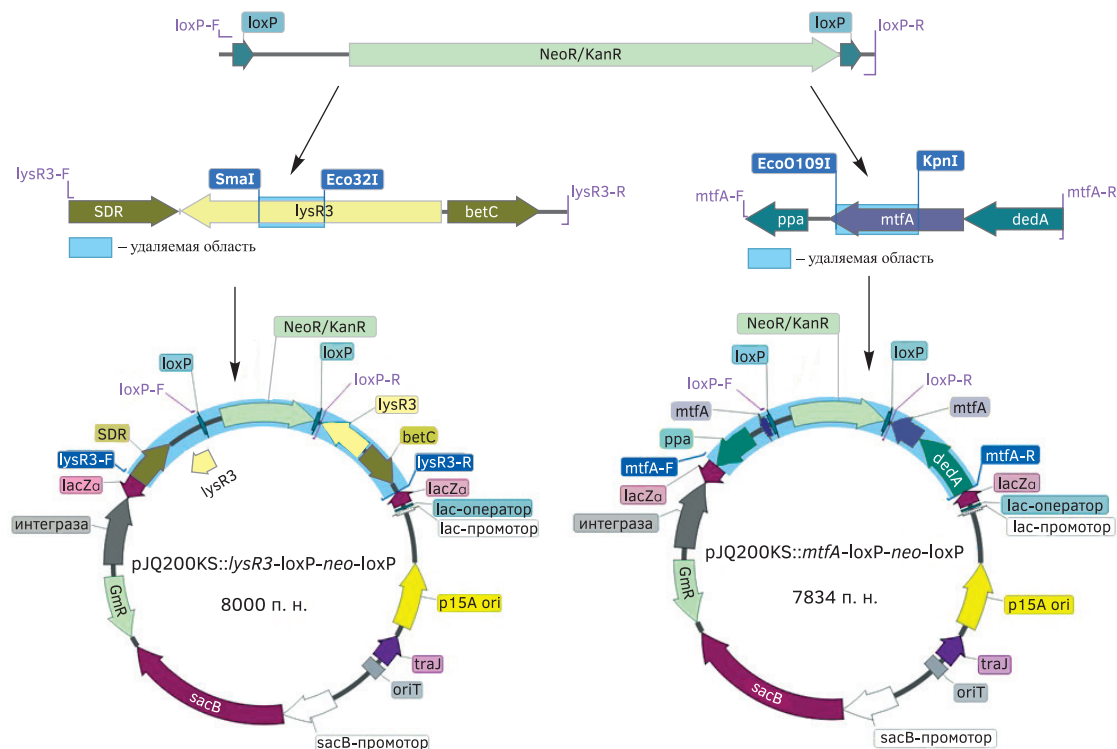


Рис. 1. Схема получения генетических конструкций pJQ200KS::lysR3-loxP-neo-loxP и pJQ200KS::mtfA-loxP-neo-loxP

Fig. 1. Design of genetic constructs pJQ200KS::lysR3-loxP-neo-loxP and pJQ200KS::mtfA-loxP-neo-loxP

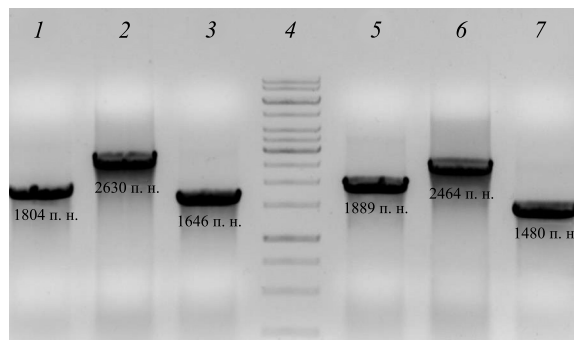


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР:

1 – исходный локус *lysR3*; 2 – *lysR3* со вставкой loxP-neo-loxP; 3 – *lysR3* после делеции;
4 – маркер молекулярной массы ДНК (GeneRuler 1 kb DNA Ladder); 5 – исходный локус *mtfA*;
6 – *mtfA* со вставкой loxP-neo-loxP; 7 – *mtfA* после делеции

Fig. 2. Electrophoregram of PCR products:

1 – original *lysR3* locus; 2 – *lysR3* with insertion loxP-neo-loxP; 3 – *lysR3* after deletion;
4 – molecular weight marker of DNA (GeneRuler 1 kb DNA Ladder); 5 – original *mtfA* locus;
6 – *mtfA* with insertion loxP-neo-loxP; 7 – *mtfA* after deletion

Для определения антимикробной активности штаммы *P. brassicacearum* S-1-lysR3, *P. brassicacearum* S-1-mtfA и *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA проверяли на способность ингибировать рост ряда патогенов сельскохозяйственных культур (табл. 3).

Как видно из данных, представленных в табл. 3, антагонистическая активность штаммов *P. brassicacearum* S-1-lysR3 и *P. brassicacearum* S-1-mtfA в отношении бактерий *P. syringae* и *P. carotovorum* возрастала примерно в 1,2 раза в сравнении с антагонистической активностью исходного штамма. У варианта *P. brassicacearum* S-1-mtfA также наблюдалось увеличение способности подавлять рост грибов *F. oxysporum* и *C. lupini* в 1,3–1,4 раза. Штамм *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA проявлял повышенную в 1,4–1,6 раза активность при подавлении роста всех исследованных патогенов в сравнении с исходным штаммом.



Таблица 3

Результат сравнения
антагонистической активности исследуемых штаммов

Table 3

The result of comparing
of antagonistic activity of the studied strains

Патоген	Зона задержки роста, мм			
	<i>P. brassicacearum</i> S-1-lysR3	<i>P. brassicacearum</i> S-1-mtfA	<i>P. brassicacearum</i> S-1-lysR3-mtfA	<i>P. brassicacearum</i> S-1
<i>P. syringae</i>	27,0 ± 2,6	26,0 ± 1,8	31,0 ± 2,0*	22,3 ± 1,6
<i>P. carotovorum</i>	27,0 ± 2,8	28,3 ± 3,2	32,3 ± 2,5*	23,0 ± 2,0
<i>A. alternata</i>	20,0 ± 2,0	22,0 ± 2,8	26,0 ± 1,4*	19,0 ± 1,4
<i>F. oxysporum</i>	20,0 ± 1,4	24,3 ± 2,8	25,0 ± 1,8*	17,0 ± 1,4
<i>C. lupini</i>	21,0 ± 2,8	25,0 ± 1,0*	30,0 ± 2,0*	19,0 ± 1,0

*Статистически значимые по *t*-критерию Стьюдента различия с контролем при $p < 0,05$.

В ходе первого этапа работы было подтверждено, что наблюдаемые ранее эффекты, связанные с увеличением антимикробной активности у транспозонных мутантов штамма *P. brassicacearum* S-1, являются результатом направленной инактивации генов *lysR3* и *mtfA*. Таким образом, на основании полученных данных можно предположить, что мутация в гене транскрипционного фактора семейства LysR приводит к нарушению осморегуляции или нетипичному ответу на осмотический стресс, что, в свою очередь, положительно влияет на синтез одного или нескольких вторичных метаболитов, определяющих антагонистические свойства штамма *P. brassicacearum* S-1 [26]. Металлопептидаза семейства M90, предположительно, способна влиять на работу фосфотрансферазной системы, что может глобально изменять регуляторные каскады в клетке. Не исключено, что белок MtfA может иметь еще несколько мишеней, помимо репрессора Mlc, и либо непосредственно, либо через каскад реакций регулировать работу белков-синтаз, которые определяют синтез вторичных метаболитов. В литературе есть достаточно примеров специфической деградации регуляторных белков рядом протеаз, в результате чего меняются фенотипические характеристики штаммов [27; 28]. В частности, протеаза Lon у бактерий *P. syringae* pv. *tomato* является негативным регулятором синтеза белков жгутикового аппарата и экзополисахаридов [29]. Поскольку высказаны лишь предположения относительно роли продуктов генов *lysR3* и *mtfA* в механизмах регуляции синтеза антимикробных метаболитов, данный вопрос требует дальнейшего изучения.

Так как нами были внесены направленные мутации в гены *lysR3* и *mtfA*, то, помимо наблюдаемых эффектов увеличенной антагонистической активности, могли измениться и другие свойства, значимые для биотехнологического штамма. Также в результате делеций в генах *lysR3* и *mtfA* нельзя исключать возможности того, что полученные штаммы будут демонстрировать пониженную конкурентоспособность и выживаемость в природном почвенном консорциуме микроорганизмов. Для проверки данных предположений были проведены лабораторные эксперименты по изучению влияния штаммов *P. brassicacearum* S-1-lysR3, *P. brassicacearum* S-1-mtfA и *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA на рост и развитие ряда сельскохозяйственных растений.

Было показано, что при обработке семян томата, огурца и петрушки растворами КЖ в течение 30 мин исследуемые штаммы не оказывают фитотоксического действия на семена. Также отмечено, что штамм *P. brassicacearum* S-1-mtfA проявляет ростостимулирующий эффект в отношении семян томата, а штамм *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA – в отношении семян томата и огурца. В частности, наблюдалось увеличение в 1,4 раза длины корней в сравнении с их длиной после воздействия исходного штамма (табл. 4).

Кроме того, оценивали жизне- и конкурентоспособность изучаемых штаммов в модельном почвенном консорциуме микроорганизмов путем посева образцов земли на селективные среды (табл. 5). В качестве контролей на селективные среды с антибиотиками и без них высевали пробы земли, в которые не были внесены штаммы исследуемых бактерий. На контрольных чашках с антибиотиками формирование бактериальных колоний не наблюдалось, тогда как на чашках, содержащих среду без добавления антибиотиков, отмечался рост в виде сплошного газона.

Таблица 4

Результат сравнения длин гипокотилей и корней проростков растений после обработки растворами КЖ исследуемых штаммов

Table 4

The result of comparing of length of hypocotyls and roots of plant seedlings after treatment with solutions of the studied strains

Штамм	Длина гипокотилия / длина корня, мм		
	Томат	Огурец	Петрушка
<i>P. brassicacearum</i> S-1-lysR3	24,0 ± 2,3 / 101,0 ± 12,5	35,0 ± 2,3 / 88,0 ± 8,4	9,0 ± 0,8 / 34,0 ± 3,4
<i>P. brassicacearum</i> S-1-mtfA	25,0 ± 2,6 / 121,0 ± 10,2*	33,0 ± 1,9 / 81,0 ± 5,9	8,0 ± 1,0 / 28,0 ± 3,5
<i>P. brassicacearum</i> S-1-lysR3-mtfA	26,0 ± 1,4 / 120,0 ± 11,0*	38,0 ± 1,9 / 122,0 ± 8,0*	9,0 ± 1,0 / 31,0 ± 4,8
<i>P. brassicacearum</i> S-1	24,0 ± 1,4 / 86,0 ± 9,1	36,0 ± 2,6 / 86,0 ± 7,5	9,0 ± 0,8 / 34,0 ± 1,9
Вода	21,0 ± 1,6 / 116,0 ± 9,3	25,0 ± 1,9 / 82,0 ± 8,7	10,0 ± 1,0 / 29,0 ± 3,2

*Статистически значимые по *t*-критерию Стьюдента различия с контролем при *p* < 0,05.

Таблица 5

Значения КОЕ исследуемых штаммов в образцах почвы с растениями томата, огурца, петрушки

Table 5

Values of CFU of the studied strains in soil samples with tomato, cucumber, parsley plants

Штамм	Титр, КОЕ/г					
	Томат		Огурец		Петрушка	
	Через 15 сут	Через 31 сут	Через 15 сут	Через 31 сут	Через 15 сут	Через 31 сут
<i>P. brassicacearum</i> S-1-lysR3	$(7,8 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(8,3 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(9,7 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^4$
<i>P. brassicacearum</i> S-1-mtfA	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(7,4 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(5,5 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(7,2 \pm 0,3) \cdot 10^3$	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(5,2 \pm 0,2) \cdot 10^3$
<i>P. brassicacearum</i> S-1-lysR3-mtfA	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(7,1 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(5,7 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(8,9 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(9,4 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^4$
<i>P. brassicacearum</i> S-1	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(4,7 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(6,5 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(8,5 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(8,2 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(9,1 \pm 0,1) \cdot 10^3$



В ходе отбора образцов почвы и высевов на селективные среды по истечении 31 сут после внесения исследуемых штаммов в почву к растениям были выявлены штаммы *P. brassicacearum* S-1-lysR3, *P. brassicacearum* S-1-mtfA, *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA с титром не ниже $(5,2 \pm 0,2) \cdot 10^3$ КОЕ/г, что свидетельствует о выживаемости исследуемых штаммов в почвенном микробном консорциуме. Также не было зафиксировано фитотоксических эффектов на рост и развитие растений томата, огурца и петрушки в результате полива растений растворами КЖ исследованных штаммов.

Заключение

В результате проведения безмаркерного мутагенеза получены штаммы *P. brassicacearum* S-1-lysR3, *P. brassicacearum* S-1-mtfA, *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA, которые несут как одиночные мутации генов *lysR3* и *mtfA*, так и мутации двух генов одновременно. У исследуемых вариантов наблюдалось повышение антагонистической активности по отношению к ряду бактериальных и грибных патогенов сельскохозяйственных культур в 1,3–1,6 раза в сравнении с активностью исходного штамма. Впервые была установлена роль генов *lysR3* и *mtfA* в антимикробной активности штамма S-1.

Показано, что полученные штаммы не оказывают фитотоксического действия на прорастание и развитие семян растений томата сорта Загадка, огурца сорта Крак F1 и петрушки сорта Листовая обычная в лабораторных условиях. Также при обработке семян огурца и томата КЖ штамма *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA отмечалось увеличение длины корней проростков в 1,4 раза в сравнении с их длиной после воздействия исходного штамма.

Установлено, что при внесении штаммов *P. brassicacearum* S-1-lysR3, *P. brassicacearum* S-1-mtfA, *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA в почву через 31 сут титр был не ниже $(5,2 \pm 0,2) \cdot 10^3$ КОЕ/г, что свидетельствует об успешной интеграции исследованных штаммов в почвенный консорциум. Полученные данные могут быть использованы при разработке бактериальных препаратов нового поколения для защиты сельскохозяйственных растений от болезней.

Библиографические ссылки

1. Maksimov IV, Abizgil'dina RR, Pusenkov LI. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011;47(4):333–345. DOI: 10.1134/S0003683811040090.
2. Labite H, Butler F, Cummins E. A review and evaluation of plant protection product ranking tools used in agriculture. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 2011;17(2):300–327. DOI: 10.1080/10807039.2011.552392.
3. Stockwell VO, Stack JP. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. *Phytopathology*. 2007;97(2):244–249. DOI: 10.1094/PHYTO-97-2-0244.
4. Nelkner J, Torres Tejerizo G, Hassa J, Lin TW, Witte J, Verwaaijen B, et al. Genetic potential of the biocontrol agent *Pseudomonas brassicacearum* (formerly *P. trivialis*) 3Re2-7 unraveled by genome sequencing and mining, comparative genomics and transcriptomics. *Genes*. 2019;10(8):601. DOI: 10.3390/genes10080601.
5. Pylak M, Oszust K, Frac M. Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2019;18(3):597–616. DOI: 10.1007/s11157-019-09500-5.
6. de Souza R, Ambrosini A, Passaglia LMP. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*. 2015;38(4):401–419. DOI: 10.1590/S1415-475738420150053.
7. Валентович ЛН, Муратова АА, Шавела ЮВ, Сиколенко МА, Охремчук АЭ. Секвенирование и анализ геномов бактерий, используемых для защиты растений и животных от болезней. В: Тихонович ИА, редактор. *Материалы 2-й Международной научной конференции PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего»; 5–9 октября 2020 г.; Саратов, Россия = Abstract book of the 2nd International scientific conference «Plants and microbes: the future of biotechnology» PLAMIC2020; 2020 October 5–9; Saratov, Russia*. Саратов: Ассоциация «Аграрное образование и наука»; 2020. с. 264.
8. Коломиец ЭИ, Купцов ВН, Сверчкова НВ, Евсегнеева НВ, Мандрик-Литвинкович МН, Мишин ЛТ и др. Бактерии *Pseudomonas aurantiaca* БИМ В-446 – основа биопрепарата «Экогрин» для защиты овощных и зеленных культур от болезней в условиях малообъемной гидропоники. В: *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Том 4*. Минск: Беларуская навука; 2012. с. 98–107.
9. Jing X, Cui Q, Li X, Yin J, Ravichandran V, Pan D, et al. Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 to improve its antifungal activity and nitrogen fixation. *Microbial Biotechnology*. 2020;13(1):118–133. DOI: 10.1111/1751-7915.13335.
10. Муратова АА, Мандрик-Литвинкович МН, Носонова ТЛ, Валентович ЛН, Коломиец ЭИ, Титок МА. Молекулярно-генетический анализ детерминант, определяющих антимикробные свойства бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 2016;3:81–84.
11. Муратова АА, Мандрик-Литвинкович МН, Валентович ЛН, Коломиец ЭИ. Молекулярно-генетический анализ генома бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446, стимулирующих рост и развитие сельскохозяйственных растений. В: *Материалы Международной научно-практической конференции «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Становление и перспективы развития органического земледелия в Российской Федерации»; 11–13 сентября 2018 г.; Краснодар, Россия = Proceedings of the International conference «Biological plant protection is the basis of agroecosystems stabilization. Formation and prospects of the development of organic agriculture in the Russian Federation»; 2018 September 11–13; Krasnodar, Russia*. Краснодар: Гранат; 2018. с. 56–59.



12. Bertani G. Studies on lysogenesis I: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1951; 62(3):293–300. DOI: 10.1128/JB.62.3.293-300.1951.
13. Мейнелл Дж, Мейнелл Э. *Экспериментальная микробиология (Теория и практика)*. Меклер ЛБ, переводчик. Москва: Мир; 1967. 347 с.
14. Metcalf WW, Jiang W, Wanner BL. Use of the *rep* technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6Kλ origin plasmids at different copy numbers. *Gene*. 1994;138(1–2):1–7. DOI: 10.1016/0378-1119(94)90776-5.
15. Pridmore RD. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene*. 1987;56(2–3):309–312. DOI: 10.1016/0378-1119(87)90149-1.
16. Quandt J, Hynes MF. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene*. 1993;127(1):15–21. DOI: 10.1016/0378-1119(93)90611-6.
17. Luo Xi, Yang Y, Ling W, Zhuang H, Li Q, Shang G. *Pseudomonas putida* KT2440 markerless gene deletion using a combination of λ Red recombineering and Cre/loxP site-specific recombination. *FEMS Microbiology Letters*. 2016;363(4):fnw014. DOI: 10.1093/femsle/fnw014.
18. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 3 volumes.
19. Буйницкая СВ, Пилипенко НН, Валентович ЛН. Оптимизация метода рекомбинерии для направленного мутагенеза бактерий *Pseudomonas corrugata* 3'. В: *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Том II*. Минск: Беларуская навука; 2019. с. 45–61.
20. Сэги Й. *Методы почвенной микробиологии*. Куренный ИФ, переводчик; Муромцев ГС, редактор. Москва: Колос; 1983. 296 с.
21. Зенова ГМ, Степанов АЛ, Лихачева АА, Манучарова НА. *Практикум по биологии почв*. Москва: Издательство Московского университета; 2002. 120 с.
22. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990; 215(3):403–410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
23. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(14):6614–6624. DOI: 10.1093/nar/gkw569.
24. Wargo MJ. Homeostasis and catabolism of choline and glycine betaine: lessons from *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;79(7):2112–2120. DOI: 10.1128/AEM.03565-12.
25. Göhler A-K, Staab A, Gabor E, Homann K, Klang E, Kosfeld A, et al. Characterization of MtfA, a novel regulatory output signal protein of the glucose-phosphotransferase system in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 2012;194(5):1024–1035. DOI: 10.1128/JB.06387-11.
26. Pan X, Sun C, Tang Mi, You J, Osire T, Zhao Y, et al. LysR-type transcriptional regulator MetR controls prodigiosin production, methionine biosynthesis, cell motility, H₂O₂ tolerance, heat tolerance, and exopolysaccharide synthesis in *Serratia marcescens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2020;86(4):e02241-19. DOI: 10.1128/AEM.02241-19.
27. Li Y, Yamazaki A, Zou L, Biddle E, Zeng Q, Wang Y, et al. ClpXP protease regulates the type III secretion system of *Dickeya dadantii* 3937 and is essential for the bacterial virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2010;23(7):871–878. DOI: 10.1094/MPMI-23-7-0871.
28. Ades SE, Connolly LE, Alba BM, Gross CA. The *Escherichia coli* σE-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-σ factor. *Genes & Development*. 1999;13(18):2449–2461. DOI: 10.1101/gad.13.18.2449.
29. Figaj D, Ambrozziak P, Przepiora T, Skorko-Glonek J. The role of proteases in the virulence of plant pathogenic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(3):672. DOI: 10.3390/ijms20030672.

References

1. Maksimov IV, Abizgil'dina RR, Pusenkova LI. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011;47(4):333–345. DOI: 10.1134/S0003683811040090.
2. Labite H, Butler F, Cummins E. A review and evaluation of plant protection product ranking tools used in agriculture. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 2011;17(2):300–327. DOI: 10.1080/10807039.2011.552392.
3. Stockwell VO, Stack JP. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. *Phytopathology*. 2007;97(2):244–249. DOI: 10.1094/PHYTO-97-2-0244.
4. Nelkner J, Torres Tejerizo G, Hassa J, Lin TW, Witte J, Verwaaijen B, et al. Genetic potential of the biocontrol agent *Pseudomonas brassicacearum* (formerly *P. trivialis*) 3Re2-7 unraveled by genome sequencing and mining, comparative genomics and transcriptomics. *Genes*. 2019;10(8):601. DOI: 10.3390/genes10080601.
5. Pylak M, Oszust K, Frac M. Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2019;18(3):597–616. DOI: 10.1007/s11157-019-09500-5.
6. de Souza R, Ambrosini A, Passaglia LMP. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*. 2015;38(4):401–419. DOI: 10.1590/S1415-475738420150053.
7. Valentovich LN, Muratova AA, Shavela YuV, Sikolenko MA, Akhremchuk AE. Sequencing and analysis of genomes of bacteria used to protect plants and animals from diseases. In: Tikhonovich IA, editor. *Abstract book of the 2nd International scientific conference «Plants and microbes: the future of biotechnology» PLAMIC2020; 2020 October 5–9; Saratov, Russia*. Saratov: Association «Agrarian Education and Science»; 2020. p. 264. Russian.
8. Kolomiets EI, Kuptsov VN, Sverchkova NV, Evsegneeveva NV, Mandrik-Litvinkovich MN, Mishin LT, et al. [Bacteria *Pseudomonas aurantiaca* BIM B-446 – the basis of biopesticide ecogreen intended for control of vegetable and green crop pathogens in low-scale hydroponics]. In: *Mikrobnye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty. Tom 4* [Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects. Volume 4]. Minsk: Belaruskaja navuka; 2012. p. 98–107. Russian.
9. Jing X, Cui Q, Li X, Yin J, Ravichandran V, Pan D, et al. Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 to improve its antifungal activity and nitrogen fixation. *Microbial Biotechnology*. 2020;13(1):118–133. DOI: 10.1111/1751-7915.13335.



10. Muratova AA, Mandryk-Litvinkovich MN, Nasonova TL, Valentovich LN, Kolomiets EI, Titok MA. Molecular genetic analysis of the determinants associated of antimicrobial properties of bacteria *Pseudomonas brassicacearum* BIM B-446. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2016;3:81–84. Russian.
11. Muratova AA, Mandrik-Litvinkovich MN, Valentovich LN, Kolomiets EI. Molecular genetic analysis of the genome of bacteria *Pseudomonas brassicacearum* BIM B-446, stimulating the growth and development of agricultural plants. In: *Proceedings of the International conference «Biological plant protection is the basis of agroecosystems stabilization. Formation and prospects of the development of organic agriculture in the Russian Federation»; 2018 September 11–13; Krasnodar, Russia*. Krasnodar: Granat; 2018. p. 56–59. Russian.
12. Bertani G. Studies on lysogenesis I: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1951; 62(3):293–300. DOI: 10.1128/JB.62.3.293-300.1951.
13. Meynell GG, Meynell E. *Theory and practice in experimental bacteriology*. New York: Cambridge University Press; 1965. 274 p.
Russian edition: Meynell G, Meynell E. *Экспериментальная микробиология (Теория и практика)*. Moscow: Mir; 1967. 347 p.
14. Metcalf WW, Jiang W, Wanner BL. Use of the *rep* technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6Kλ origin plasmids at different copy numbers. *Gene*. 1994;138(1–2):1–7. DOI: 10.1016/0378-1119(94)90776-5.
15. Pridmore RD. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene*. 1987;56(2–3):309–312. DOI: 10.1016/0378-1119(87)90149-1.
16. Quandt J, Hynes MF. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene*. 1993;127(1):15–21. DOI: 10.1016/0378-1119(93)90611-6.
17. Luo Xi, Yang Y, Ling W, Zhuang H, Li Q, Shang G. *Pseudomonas putida* KT2440 markerless gene deletion using a combination of λ Red recombineering and Cre/loxP site-specific recombination. *FEMS Microbiology Letters*. 2016;363(4):fnw014. DOI: 10.1093/femsle/fnw014.
18. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 3 volumes.
19. Buinitskaya SV, Pilipenok NN, Valentovich LN. Optimization of recombineering for directed mutagenesis of bacteria *Pseudomonas corrugata* 3'. In: *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Том 11* [Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects. Volume 11]. Minsk: Belaruskaja navuka; 2019. p. 45–61. Russian.
20. Szegi J. *Talajmikrobiológiai vizsgálati módszerek*. Budapest: Mezogazdasági kiadó; 1979. 310 p.
Russian edition: Szegi J. *Методы почвенной микробиологии*. Kurennyi IF, translator; Muromtsev GS, editor. Moscow: Kolos; 1983. 296 p.
21. Zenova GM, Stepanov AL, Likhacheva AA, Manucharova NA. *Практикум по биологии почвы* [Workshop on soil biology]. Moscow: Izdatel'stvo Moskovskogo universiteta; 2002. 120 p. Russian.
22. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990; 215(3):403–410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
23. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(14):6614–6624. DOI: 10.1093/nar/gkw569.
24. Wargo MJ. Homeostasis and catabolism of choline and glycine betaine: lessons from *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;79(7):2112–2120. DOI: 10.1128/AEM.03565-12.
25. Göhler A-K, Staab A, Gabor E, Homann K, Klang E, Kosfeld A, et al. Characterization of MtfA, a novel regulatory output signal protein of the glucose-phosphotransferase system in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 2012;194(5):1024–1035. DOI: 10.1128/JB.06387-11.
26. Pan X, Sun C, Tang Mi, You J, Osire T, Zhao Y, et al. LysR-type transcriptional regulator MetR controls prodigiosin production, methionine biosynthesis, cell motility, H₂O₂ tolerance, heat tolerance, and exopolysaccharide synthesis in *Serratia marcescens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2020;86(4):e02241-19. DOI: 10.1128/AEM.02241-19.
27. Li Y, Yamazaki A, Zou L, Biddle E, Zeng Q, Wang Y, et al. ClpXP protease regulates the type III secretion system of *Dickeya dadantii* 3937 and is essential for the bacterial virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2010;23(7):871–878. DOI: 10.1094/MPMI-23-7-0871.
28. Ades SE, Connolly LE, Alba BM, Gross CA. The *Escherichia coli* σE-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-σ factor. *Genes & Development*. 1999;13(18):2449–2461. DOI: 10.1101/gad.13.18.2449.
29. Figaj D, Ambroziak P, Przepiora T, Skorko-Glonek J. The role of proteases in the virulence of plant pathogenic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(3):672. DOI: 10.3390/ijms20030672.

Получена 16.03.2021 / исправлена 06.04.2021 / принята 03.05.2021.
Received 16.03.2021 / revised 06.04.2021 / accepted 03.05.2021.



АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФАКТОРОВ ЭЛЕКТРОТРАНСФОРМАЦИИ КЛЕТОК *BACILLUS SUBTILIS* ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА *aroK* ПУТЕМ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ

Ю. ЧАО¹⁾, А. В. ЛАГОДИЧ¹⁾

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

Оптимизирован метод гиперосмотической электротрансформации для штамма *Bacillus subtilis*. В состав гиперосмотической среды для электропорации и среды для восстановления были введены сорбит и маннит. Эффективность трансформации штамма *B. subtilis* 5434 (не трансформируемого химическими методами) возросла в 430 раз, ее максимальное значение составило $8,6 \cdot 10^5$ КОЕ/мкг интегративной плазмидной ДНК. При сохранении параметров 25 мкФ, 23 кВ/см, 200 Ом метод был оптимизирован следующим образом: а) бактериальную культуру при культивировании выращивали до достижения значений оптической плотности OD_{600} около 1,2, что существенно повысило выживаемость бактерий и количество жизнеспособных клеток *B. subtilis* 5434 после электропорации; б) число элюирований промывочным раствором (гиперосмотической средой для электропорации) электрокомпетентных клеток увеличено с 3 до 5 раз, что привело к значительному снижению электропроводимости гиперосмотической электропорационной среды, содержащей компетентные клетки (электрокомпетентной культуры), и эффективному увеличению времени истечения импульса при той же напряженности электрического поля; в) повышено количество интегративной плазмидной ДНК, вносимой в гиперосмотическую электрокомпетентную культуру. Полученные результаты свидетельствуют, что увеличение числа жизнеспособных клеток *B. subtilis* 5434 и уменьшение количества ионов металлов в смеси растворов для электропорации (интегративная плазмидная ДНК, компетентные клетки *B. subtilis* 5434, среда для электропорации) были успешным решением для повышения эффективности трансформации штамма *B. subtilis* 5434.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*; гомологичная рекомбинация; гиперосмотическая электротрансформация; шикимат.

Благодарность. Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук Е. О. Корик за помощь в проведении исследования методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Образец цитирования:

ЧАО Ю, Лагодич АВ. Анализ эффективности факторов электротрансформации клеток *Bacillus subtilis* для инактивации гена *aroK* путем гомологичной рекомбинации. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021; 2:64–73 (на англ.).
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-64-73>

For citation:

Chao Y, Lahodzich AV. Analysis of the efficiency factors of electrotransformation of *Bacillus subtilis* to inactivate the *aroK* gene by the method of homologous recombination. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2021;2:64–73.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-64-73>

Авторы:

Юй Чао – аспирант кафедры генетики биологического факультета. Научный руководитель – А. В. Лагодич.
Алексей Викторович Лагодич – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:

Yui Chao, postgraduate student at the department of genetics, faculty of biology.
cygoodluck1989@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-1647-3377>
Aleksei V. Lahodzich, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.
lagodichav@bsu.by
<https://orcid.org/0000-0002-6837-2439>





ANALYSIS OF THE EFFICIENCY FACTORS OF ELECTROTRANSFORMATION OF *BACILLUS SUBTILIS* TO INACTIVATE THE *aroK* GENE BY THE METHOD OF HOMOLOGOUS RECOMBINATION

Y. CHAO^a, A. V. LAHODZICH^a

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

Corresponding authors: A. V. Lahodzich (lagodichav@bsu.by)

A hyper-osmotic electrotransformation method was developed for strain *Bacillus subtilis*. Sorbitol and mannitol are included in the hyper-osmotic electroporation medium and recovery medium. In this study, the hyper-osmotic electroporation method was optimised to increase the transformation efficiency of *B. subtilis* strain 5434 (non-transformable by chemical methods) by 430 fold, with a maximum value of $8.6 \cdot 10^5$ CFU/ μ g of integrative plasmid DNA. With the electroporation setted 25 μ F, 23 kV/cm, 200 Ω , the method was optimised as follows: a) the OD₆₀₀ value of the bacterial culture solution was increased to about 1.2, which significantly enhanced survival of bacteria and quantity of viable *B. subtilis* strain 5434 cells after electroporation; b) the elution frequency of washing solution (hyper-osmotic electroporation medium) for complement cells was increased from 3 to 5 times, resulted in significantly reducing the conductivity of the hyper-osmotic electroporation medium with competent cells (electrocompetent culture), and effectively extending the pulse time under the same electric field strength; c) quantity of integrative plasmid DNA added to hyper-osmotic electrocompetent culture was optimised. These results indicate that increasing the number of viable *B. subtilis* strain 5434 cells and reducing the number of metal ions in the electroporation solution mix (integrative plasmid DNA, competent cells of *B. subtilis* strain 5434, electroporation medium) are useful approach to improve transformation efficiency of *B. subtilis* strain 5434. Concentration of shikimic acid in the fermentation medium was quantified by high performance liquid chromatography. Quantification of shikimic acid revealed that *B. subtilis* strain 5434p4SA produced 403.98 ± 9.1 μ g/mL of shikimic acid.

Keywords: *Bacillus subtilis*; homologous recombination; hyper-osmotic electrotransformation; shikimate.

Acknowledgements. We thank PhD E. O. Korik for helping us with HPLC analysis.

Introduction

Bacillus subtilis has been widely used as a model organism for converting exogenous DNA in the past decades. Genetic transformation with exogenous genes allows the improvement of important industrial microorganisms. Exogenous genes could be integrated into microorganisms by this technology [1; 2]. Generally, *E. coli* as a gram-negative bacterium has a higher transformation efficiency than *B. subtilis*. This is due to the influence of the cell wall of *B. subtilis* as a gram-positive bacterium *B. subtilis* has a strong ability to secrete proteins without endotoxin, thus, carbohydrase and protease enzyme preparations from *B. subtilis* are GRAS (GRAS is an acronym for the phrase «generally recognised as safe») for use as direct food ingredient [3]. Therefore, it is more suitable to choose *B. subtilis* as genetically engineered bacteria. And it is necessary to select the most effective transformation method for *B. subtilis* and optimise it. The low competence exhibited by several strains of *B. subtilis* [2; 4] has led to the development of several strategies, including biochemical transformation [5], phage transduction [6], protoplast fusion [7] and electrotransformation [8]. Compared with other transformation methods, electrotransformation can significantly improve the transformation efficiency of gram-positive bacteria. This is due to the temporary weakening of the cell wall and cytoplasmic membrane that requires electro-transformation, so that DNA can effectively penetrate bacterial cells [1]. Therefore, electroporation a more commonly used method is widely accepted and conducted for the transformation of gram-positive bacteria. However, electroporation can permanently damage the cells, resulting in a low transformation efficiency [9]. The *B. subtilis* strain 5434 is characterised by low physiological competence, thus, the most acceptable method is the introduction of exogenous DNA into the cell by electroporation.

For the chemical and pharmaceutical industries, shikimic acid (SA) is an essential raw material. In specific, SA is an intermediate for the anti-viral influenza synthesis of Oseltamivir (Tamiflu®). In 2009, Tamiflu® sales is estimated at 3.5 bln US dollars, with a manufacturing potential of up to 33 mln treatments per month and 400 mln packages per year [10]. Although current commercial production is mostly accomplished extracted from the *Illicium* plant, the isolation method is tedious and expensive [11]. Microbial fermentation from inexpensive carbon sources such as glucose [12] or glycerol [13] for the shikimate production as an alternative method has gained more and more interest. Moreover, shikimic acid is one of the products in the metabolic pathway of *B. subtilis*. Therefore, the gene of shikimate kinase *aroK* (SA was metabolised by shikimate kinase) can be inactivated, allowing SA to be accumulated in the fermentation medium from *B. subtilis*.

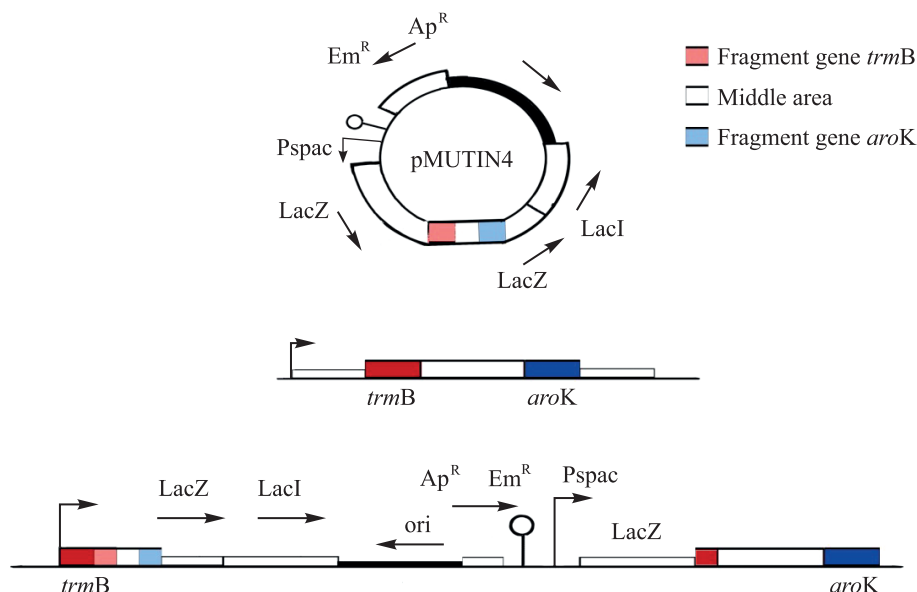


Fig. 1. Design of the integrational vector pMUTIN4 with the homologous sequence (*trmB-aroK*) inserted into the bacterial chromosome

In this work, by increasing the number of living competent cells and decreasing the concentration of metal ions in the electroporation solution mix, electroporation efficiency was significantly increased. So optimal method makes it possible to screen viable transformants obtained by homologous recombination. The shikimate kinase gene was inactivated by homologous recombination, which SA was allowed to accumulate and secreted into the medium. The integrational vector pMUTIN4 Δ *aroK* containing homologous sequence (*trmB-aroK*) was integrated into the strain *B. subtilis* chromosomal DNA by the method electrotransformation and homologous recombination, in order to inactivate the shikimate kinase gene (*aroK*) to accumulate SA in the fermentation medium. Pspac promoter regulated by IPTG was on the integrational vector pMUTIN4 Δ *aroK*. The *aroK* was found to be located downstream of the Pspac promoter, which could be blocked in the fermentation medium without IPTG (fig. 1). Thus, those *B. subtilis* cells had a capacity to accumulate SA via modification on this specific metabolic pathway [14].

Materials and methods

Bacterial strains and plasmids. *E. coli* XL1-Blue was used to amplify all the vectors in this study. *B. subtilis* strain 5434 obtained from the collection of VKMB (Moscow), high-yield tryptophan, Cm^R; *B. subtilis* strain 168wt (wild type).

Plasmid vector pMTL21C was used for cloning the homologous sequences (*trmB-aroK*) in *E. coli* XL1-Blue.

Plasmid vector pMUTIN4 is unable to be replicated in *B. subtilis*, containing the Pspac inducible promoter induced by IPTG, which was used as an integrational vector to inactivate the *aroK* gene by the method of homologous recombination [14]. To construct the integrational plasmid pMUTIN4 Δ *aroK*, the homologous sequences *trmB-aroK* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into the pMUTIN4 vector. The resulting plasmid was subsequently linearised using NotI and SacI and then the amplification products with the NotI and SacI cohesive end were ligated into the pMUTIN4 vector.

B. subtilis strain 5434p4SA (Em^R, Cm^R) is a *B. subtilis* strain 5434 derivative containing the *aroK* gene under the control of the Pspac promoter by insertion of integrational vector pMUTIN4 Δ *aroK* (with Pspac promoter) in front of *aroK*. *B. subtilis* strain 5434p4SA was constructed by introduction integrational vector pMUTIN4 Δ *aroK* into *B. subtilis* strain 5434 cells and resulted in the inactivation of the *aroK* via homologous recombination.

Vector pMTL7-1 [15] is able to be replicated in *B. subtilis*, so when confirming the effectiveness of transformation, pMTL7-1 was used as a positive control of transformation in this study. The vector pMTL7-1 with chloramphenicol resistance could be able to use for screening transformants.

Construction of the vector pMTL21C Δ *aroK* containing homologous sequence (*trmB-aroK*) – TA clone. The homologous sequences (target gene sequence *trmB-aroK*) was obtained as described in the paper [16]



with modifications. For PCR using primers F1-EcoR1 (G GAA TTC CGG TAT GTA TCT GTC AGA GAA G (5'–3')) and R1-SacI (C CCG CGG AAC GGT TAT GCA GTA CAG GGC (5'–3')) with Taq polymerase (*Thermo Scientific*, Lithuania). PCR were carried out with the conditions described by the manufacturer using the following program:

- 1) denaturation: 5 min at 94 °C;
- 2) annealing: 10 cycles of 30 s at 94 °C, 10 s at 55 °C, 25 s at 54 °C and then 1.5 min at 68 °C;
- 3) extension: 25 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, 1.5 min at 68 °C, 5 min at 72 °C.

The PCR product was amplified by Taq polymerase. Therefore, the 3' end of the PCR product carrying the base adenine A. The vector pMTL21C was digested by restriction enzymes *Sma*I (*Thermo Scientific*), then a smooth end was formed. Then digestion products with smooth ends was treated with Taq polymerase and dTTP, 3' ends of the digested product formed a sticky end with a base thymine T. The fragment of vector pMTL21C after digestion by restriction enzymes *Sma*I with the end base thymine T and the fragment PCR product with the end base adenine A were ligated by the T4 DNA ligase (*Thermo Scientific*). The PCR product (homologous sequence *trmB-aroK*) was cloned in the *Sma*I site of the vector pMTL21C.

Construction of the vector pMUTIN4ΔaroK containing homologous sequence (*trmB-aroK*). The vector pMTL21CΔaroK containing homologous sequence (*trmB-aroK*) were digested by restriction enzymes *Not*I and *Sac*I (*Thermo Scientific*), and then cloned into the same digested vector pMUTIN4 by T4 DNA ligase (*Thermo Scientific*) and PEG4000 solution (vector: insert ratio 1 : 5, 10 °C, 18 h). Restriction enzymes, T4 DNA ligase and other DNA manipulating enzymes were used according to their manufacturer's instructions. 5 μL ligation products were used for transformation competent cells *E. coli* XL1-Blue in order to replicate the integrational plasmid pMUTIN4ΔaroK. Then the transformed *E. coli* XL1-Blue strains were selected on LB plates containing 100 μg/mL ampicillin. The recombinant plasmids DNA were extracted using the TIANprep Mini Plasmid Kit for introduction into the *B. subtilis* strain 5434 cells by electrotransformation method. All plasmids constructed in this study (pMTL21CΔaroK and pMUTIN4ΔaroK) were verified by DNA sequencing.

Transformation of *B. subtilis* strain 5434. An overnight *B. subtilis* strain 5434 in medium LB (tryptone 10g/L, yeast extract 5g/L, NaCl 10g/L) [17] was diluted in growth medium LBS (LB containing 0.5 mol/L sorbitol) to a final OD₆₀₀ of 0.01 and shaken at 37 °C, 200 r/min with an OD₆₀₀ of 0.5. The cells were cooled for 10 min on ice and then centrifuged for 10 min at 5000g. After four washes in the ice-cold hyper-osmotic electroporation medium SMG (1 mol/L sorbitol, 0.5 mol/L mannitol and 1.5 % v/v glycerol), the cells were suspended in the electroporation medium 1/80 (v/v). If it is necessary, the competent cells were stored at –80 °C for future use. 60 μL of the competent cells were combined with 1 μL vector DNA (60 ng/μL) for electroporation and then moved to an ice-cold electroporation cuvette (1 mm electrode gap). After incubation for 5 min, the cells were exposed to a single electrical pulse using a *GenePulser Xcell*TM (*Bio-Rad*, the USA) set at 23 kV/cm, 25 μF and 200 Ω, 1 mL of recovery medium (LB containing 0.5 mol/L sorbitol and 0.38 mol/L mannitol) was then directly applied to the cells, resulting in a pulse duration of 4.0–5.5 ms. After incubation for 6 h at 37 °C, the cells were placed on an LB plate with 5 μg/mL of the antibiotic erythromycin and preserved overnight at 37 °C. Then positive transformants were chosen [1; 8; 18–20].

Preparation of SA solution for HPLC analysis. Overnight cultures of *B. subtilis* strains 5434 and 5434p4SA were separately inoculated (5 % v/v) into fermentation medium: 4 mL Spizizen minimal medium (0.5 % glucose, 1.4 % K₂HPO₄, 0.6 % KH₂PO₄, 0.072 % anhydrous MgSO₄, 0.2 % (NH₄)₂SO₄, 0.19 % Na citrate, 0.02 % acid-hydrolysed casein) [5; 21] with 10 μL glutamic acid (5 mg/mL), 10 μL tryptophan (5 mg/mL), 10 μL phenylalanine (5 mg/mL), 100 μL 20 % glucose, and then shaken at 37 °C and 200 r/min for 72 h. At the end of cultivation, the culture was centrifuged at 13 000g for 10 min on *Thermo Scientific*® *Heraeus Fresco 21 centrifuge* to remove bacterial precipitation. Supernatants contained SA were passed the *CHROMAFIL*® *Xtra PES-45/25* 0.45 μm filter (*Macherey-Nagel*, Germany). The injection volume was 5 μL, triplicate injections were performed.

Preparation of SA standards solution for HPLC analysis. Sample of SA standards, dissolved in methanol to achieve 2 mg/mL concentrations. Syringe filters with a pore size of 0.45 μm were used to filter the solutions. There have been triplicate injections of 5 μL [22; 23].

Quantitative analysis by HPLC. *LCMS-2020 liquid chromatography* (*Shimadzu*, Japan) was used to detect SA. Absorption spectra were recorded in a flow using a detector based on the *SPD-M20A photodiode array* detector (*Shimadzu*).

The supernatants were analysed by HPLC (C18 Allure column, 4.6 × 150 mm, 5 μm), the column temperature was 40 °C. The HPLC was run with mixture of methanol and formic acid at a flow rate of 0.5 mL/min, the running time was 20 min. SA was detected at 210 nm by the *SPD-M20A photodiode array* detector. The following gradient was described in the table 1 [22–24].



Table 1

The condition of following gradient

Time, min	H ₂ O, %	Methanol, %	1 % formic acid, %
0–12	88–80	2–10	10
12–13	80–0	10–90	10
13–15	0	90	10
15–20	88	2	10

Results and discussion

Optimisation of growth conditions. The optimal growth conditions for preparation of electrocompetent cells of *B. subtilis* were determined by the growth phase (OD_{600} is equal 0.2 (lag-phase), 0.6 (exponential-phase) and 1.6 (stationary-phase)), before washing steps. The cells were grown in LBS medium until $OD_{600} = 0.2–1.6$. Some reports confirmed that an effective electrotransformation protocol also depends on the quantity of viable cells to be transformed [25]. Different phases of culture (lag-, exponential- and stationary-phase) were measured and noticed that cells grown in SLB until $OD_{600} = 1.0–1.6$ produced around $9 \cdot 10^9–9.4 \cdot 10^{10}$ cells/mL strain with the highest number of viable cells.

The highest transformation efficiency was observed at $OD_{600} = 1.2$ (fig. 2). A moderate improvement one was attributable to $OD_{600} = 0.8–1.4$. The hyper-osmotic electroporation medium with glycine supplementation was proved to be the best combination for electrotransformation [1]. The most living cells of *B. subtilis* strain 5434 could achieve $4 \cdot 10^5$ CFU/ μ g of plasmid DNA. The transformation efficiency at the $OD_{600} = 1.2$ was 50 fold higher than that at $OD_{600} = 0.2$.

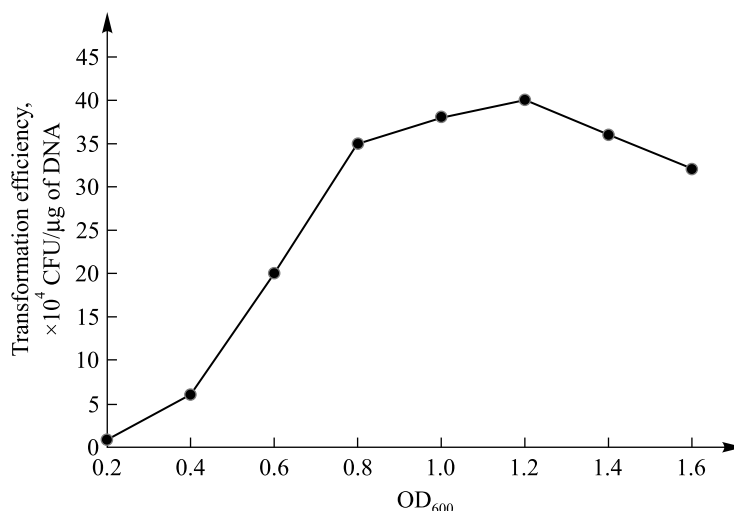


Fig. 2. Effect of growth phase on the electroporation efficiency of *B. subtilis* strain 5434 using the high osmolarity method. The values shown the means of several transformations.

The transformation efficiency at different growth phases of *B. subtilis* strain 5434.

Cells were grown in LBS medium to various OD_{600} densities for the electrocompetent cell preparation, using SMG solution as the electroporation buffer. 60 ng plasmid pMTL7-1 as a positive control of transformation were used for electroporation with the settings 25 μ F, 23 kV/cm, 200 Ω

Improvements in transformation efficiency of *B. subtilis* by increasing the elution frequency. In study [1], mainly by adding trehalose to the electroporation media for improving the survival rate of competent cells, to achieve the purpose of increasing the electrotransformation efficiency. But by the method described in the study [1], couldn't obtain the transformant of *B. subtilis* strain 5434 via homologous recombination (because usually the probability of successfully obtained homologous recombination is generally only one ten thousandth of the transformation efficiency). Therefore, the electrotransformation efficiency by the method described in the study [1] is still lower for obtaining transformants via homologous recombination, and this method is not sufficient to successfully obtain transformants via homologous recombination. So it is necessary to optimise the method described in the study [1]. «An important factor in achieving high transformation



efficiency is to wash competent cells thoroughly to reduce conductivity» was noted in the study [8]. Inspired by this, in our study, the purpose of reducing the conductivity of the electroporation media was achieved by increasing the elution frequency.

Figure 3 indicated that under the same electric field strength, the longer pulse time is due to increase the elution times of competent cells with the electroporation medium for washing. The reason was deduced, because the conductivity was reduced by reducing the number of metal ions in the electrocompetent culture. According to research, have validated that for the electrocompetent culture, the optimum field strength is 23 kV/cm for transformation of *B. subtilis* [1; 8]. Therefore, it is not proper to increase the electric field strength for increasing the pulse time, because higher electric field strength will markedly reduce the cell survivability [26]. To a great extent, exogenous DNA could penetrate through the cell wall when using a longer pulse time, resulting in better transformation and homologous recombination efficiency.

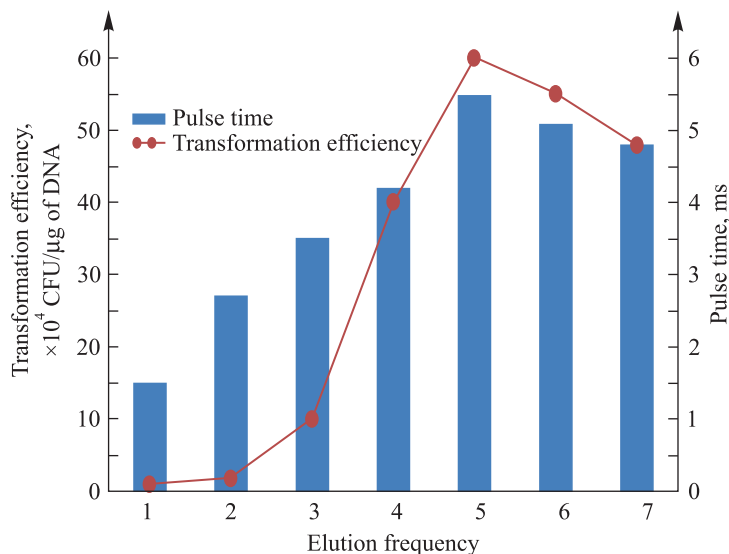


Fig. 3. Effects of elution frequency on the transformation efficiency of *B. subtilis* strain 5434 using the high osmolarity method. The data demonstrated the means of three transformations. The optimised protocol of high osmolarity defined in section «Materials and methods» was followed. Also 60 ng of plasmid pMTL7-1 as a positive control of transformation were used in the transformation with the settings 25 μF, 23 kV/cm, 200 Ω

Although, efficiency transformation could be significantly improved by increasing the elution frequency within a certain range. It is worth noting that the more elution frequency, the fewer living competent cells, resulting in a low transformation efficiency. Under the condition of $OD_{600} = 1.2$, the highest transformation efficiency was observed at the 5th time elution (see fig. 3). At this moment, a distinct equilibrium between the elution frequency and the number of living competent cells was attained with $6.0 \cdot 10^5$ CFU/μg of plasmid DNA.

This factor was founded that increasing the elution frequency from 1 to 5 times resulted in a 300 fold increase in the transformation efficiency of *B. subtilis* strain 5434. Therefore, this is a useful approach to improve the transformation efficiency of *B. subtilis* by increasing the elution frequency to reduce the conductivity of electrocompetent culture under the condition of ensuring a higher cell survivability and by effectively extending the pulse time under the same electric field strength.

The conclusion could be derived from fig. 3: the pulse time is inversely proportional to the conductivity of electrocompetent culture. Under the same electric field strength, the pulse time is directly proportional to the transformation efficiency. Therefore, the conductivity of electrocompetent culture can be reduced by increasing the elution frequency, thereby achieving the purpose of increasing the transformation efficiency. Increase of elution frequency as a novel applied methodology could significantly improve the efficiency transformation.

Quantity of integrative plasmid DNA. Significant amounts of plasmid DNA are usually used in protocols to acquire transformants of *B. subtilis* and other gram-positive bacteria [25; 27]. To evaluate the optimum concentration of plasmid DNA for *B. subtilis* transformation in the electroporation solution mix, a dose-dependency for plasmid DNA ranging from 1 to 140 ng was conducted (fig. 4). Among of them, 65 ng of plasmid DNA was necessary to obtain the most living transformation strain (fig. 5). However, the highest transformation efficiency could be achieved when 20 ng of plasmid DNA applied under $OD_{600} = 1.2$. Competent cells were washed 5 times



by the electroporation medium, reaching $8.6 \cdot 10^5$ CFU/ μ g of plasmid DNA. A 2.2 fold reduction in the transformation efficiency of *B. subtilis* strain 5434 was observed in this study by increasing the quantity of plasmid pMTL7-1 from 20 to 140 ng ($3.9 \cdot 10^5$ CFU/ μ g of DNA at 140 ng integrational plasmid vs $8.6 \cdot 10^5$ CFU/ μ g of DNA at 20 ng of plasmid pMTL7-1). Transformation efficiency was inversely proportional to the quantity of plasmid DNA [26; 28].

The reason can be explained that plasmid pMTL7-1 as a positive control of transformation was extracted from *E. coli* XL1-Blue with metal ions, this situation is unavoidable. Therefore, if the plasmid pMTL7-1 was excessively added to the hyper-osmotic electrocompetent culture, the metal ions in electroporation solution mix and the conductivity of electroporation solution mix were increased, resulting in shorter pulse time and reduced electroporation efficiency. Obviously, the concentration of metal ions introduced to the electroporation solution mix is directly proportional to the concentration of plasmid DNA.

When comparing the efficiency of transformation of *B. subtilis* strain 5434 on the amount of introduced DNA and the total number of obtained transformants (see fig. 5), the following regularities were revealed.

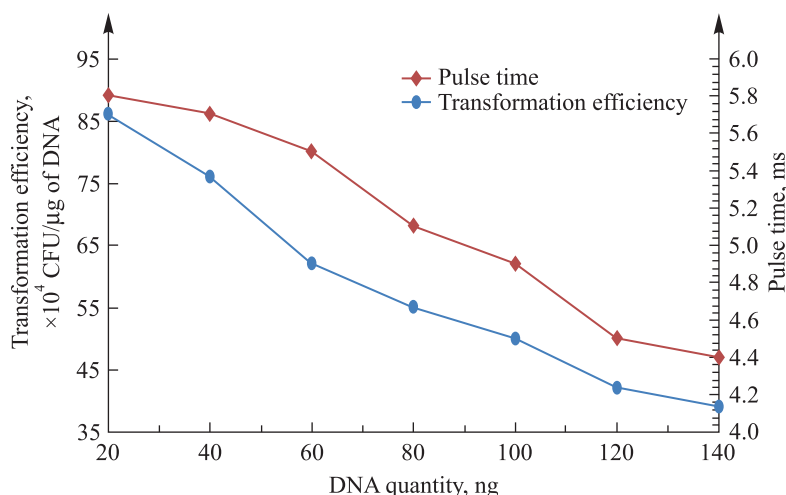


Fig. 4. Effects of plasmid pMTL7-1 quantity on the pulse time and transformation efficiency of *B. subtilis* strain 5434 using the high osmolarity method. The data demonstrated the means of three transformations. The optimised protocol of high osmolarity defined in section «Materials and methods» was followed. Also 20–140 ng of plasmid pMTL7-1 as a positive control of transformation were used in the transformation with the settings 25 μ F, 23 kV/cm, 200 Ω

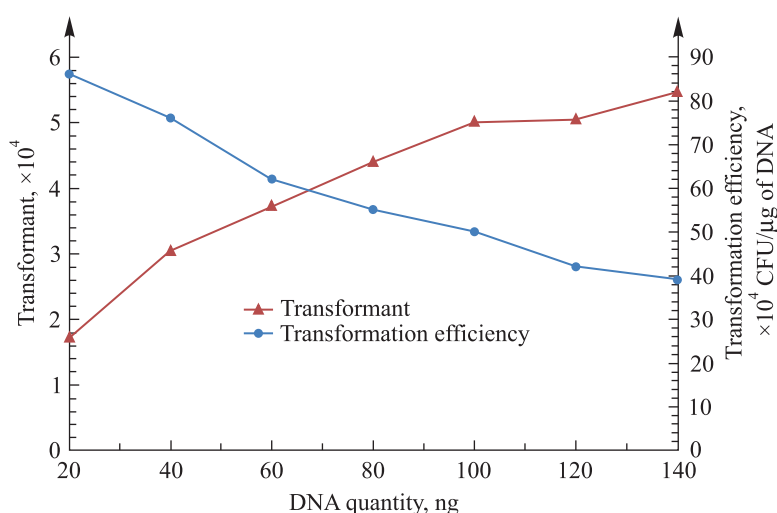


Fig. 5. Effects of plasmid pMTL7-1 quantity on the number of transformants and transformation efficiency of *B. subtilis* strain 5434 using the high osmolarity method. The data demonstrated the means of three transformations. The optimised protocol of high osmolarity defined in section «Materials and methods» was followed. Also 20–140 ng of plasmid pMTL7-1 as a positive control of transformation were used in the transformation with the settings 25 μ F, 23 kV/cm, 200 Ω



Low concentrations of DNA (1.083 ng/ μ L of electrocompetent culture or 65 ng of vector DNA per 60 μ L of electrocompetent cells) are optimal for efficient transformation of *B. subtilis* strain 5434. Decreasing concentration of plasmid DNA in the electrocompetent culture leads to a significant increase of the transformation efficiency and a sharp decrease in the total number of transformants (presumably due to the deficiency of introduced DNA). The increase in the amount of introduced DNA (concentration more than 1.083 ng/ μ L of electrocompetent culture) leads to an increase in the total number of transformed cells and a strong decrease of transformation efficiency. For further work, as the most optimal quantity of plasmid DNA, the concentration of 1.083 ng/ μ L electrocompetent cells or 65 ng vector DNA per 60 μ L electrocompetent cells was chosen as suggested [1]. It should be noted that the key point was not the total amount of plasmid DNA in the electroporation solution mix, but the equivalent ratios between the number of vectors DNA and the number of electrocompetent cells. For different sizes of vectors, this value may be differential. This assumption required a further investigation.

Application of the method for construction of *B. subtilis* strain 5434 to increase the yield of SA from *B. subtilis* strain 5434 and determination of SA concentration by method HPLC. In this study, the *B. subtilis* strain 5434 was successfully transformed with the higher transformation efficiency of $8.6 \cdot 10^5$ CFU/ μ g of DNA by integrative vector pMUTIN4 Δ aroK (65 ng) with the method described above. In result, via the inactivation of *aroK* by homologous recombination strain designated as *B. subtilis* strain 5434p4SA was obtained. The fig. 6 shows the elution of SA was detected at 210 nm, resulting in a retention time of 2.9 min.

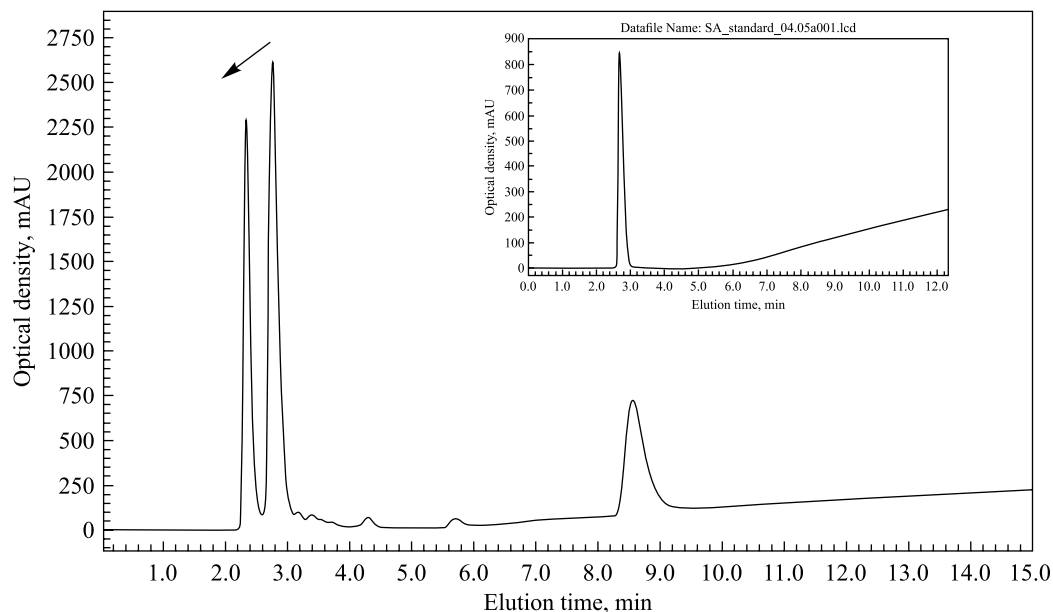


Fig. 6. HPLC chromatograms of the SA production in fermentation liquor. The peak of SA was indicated by the arrow and the inset is HPLC chromatograms of the SA standards solution (the concentrations of SA standards solution was 2 mg/mL)

Quantification of SA revealed (table 2) that *B. subtilis* strain 5434p4SA produced 403.98 ± 9.1 μ g/mL of SA. This indicates that the method is also appropriate for other *B. subtilis* strains genetic transformation.

The supernatants were assayed and quantified by HPLC, and the values shown for the production of SA are means $\pm$ SD of three experiments.

Table 2

Concentration of SA in the fermentation medium
was quantified by HPLC

<i>B. subtilis</i> strain	Concentration of SA $\pm$ SD, μ g/mL
5434	Not detected
5434p4SA	403.98 ± 9.10



Conclusions

We have established a reliable and highly efficient electrotransformation method for *B. subtilis*. On the basis of the approach mentioned in our work, *B. subtilis* strain 5434 was successfully designed to achieve higher levels yield SA. We expect that this approach would be wide used in the transformations of some gram-positive bacterial species which are able to grow in a high osmolarity medium.

References

1. Guoqiang Cao, Xiaohui Zhang, Lei Zhong, Zhaoxin Lu. A modified electro-transformation method for *Bacillus subtilis* and its application in the production of antimicrobial lipopeptides. *Biotechnology Letters*. 2011;33(5):1047–1051. DOI: 10.1007/s10529-011-0531-x.
2. Kai Chen, Jie Dou, Shirui Tang, Yishun Yang, Hui Wang, Hongqing Fang, et al. Deletion of the *aroK* gene is essential for high shikimic acid accumulation through the shikimate pathway in *E. coli*. *Bioresource Technology*. 2012;119:141–147. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.05.100.
3. US Food and Drug Administration. Carbohydrase and protease enzyme preparations derived from *Bacillus subtilis* or *Bacillus amyloliquefaciens*. Affirmation of GRAS Status as direct food ingredients. *Federal register*. 1999;64(78):19887–19895.
4. Duitman EH, Wyczawski D, Boven LG, Venema G, Kuipers OP, Hamoen LW. Novel methods for genetic transformation of natural *Bacillus subtilis* isolates used to study the regulation of the mycosubtilin and surfactin synthetases. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(11):3490–3496. DOI: 10.1128/AEM.02751-06.
5. Spizizen J. Transfomtion of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1958;44(10):1072–1078. DOI: 10.1073/pnas.44.10.1072.
6. Yasbin RE, Young FE. Transduction in *Bacillus subtilis* by bacteriophage. *Journal of Virology*. 1974;14(6):1343–1348.
7. Vehmaanperä J. Electro-transformation of *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis*. In: Harwood CR, Cutting SM, editors. *Molecular biological methods for Bacillus*. New York: John Wiley; 1990. p. 156–157.
8. Xue GP, Johnson JS, Dalrymple BP. High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Journal of Microbiological Methods*. 1999;34(3):183–191. DOI: 10.1016/S0167-7012(98)00087-6.
9. Dunny GM, Lee LN, LeBlanc DJ. Improved electroporation and cloning vector system for gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991;57(4):1194–1201. DOI: 10.1128/AEM.57.4.1194-1201.1991.
10. Martínez JA, Bolívar F, Escalante A. Shikimic acid production in *Escherichia coli*: from classical metabolic engineering strategies to omics applied to improve its production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2015;3:145. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00145.
11. Herrmann KM, Weaver LM. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1999; 50:473–503. DOI: 10.1146/annurev.arplant.50.1.473.
12. Jian Yi, Draths KM, Kai Li, Frost JW. Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnology Progress*. 2003;19(5):1450–1459. DOI: 10.1021/bp0340584.
13. Ming-Yi Lee, Wen-Pin Hung, Shu-Hsien Tsai. Improvement of shikimic acid production in *Escherichia coli* with growth phase-dependent regulation in the biosynthetic pathway from glycerol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017;33(2):25. DOI: 10.1007/s11274-016-2192-3.
14. Vagner V, Dervyn E, Ehrlich DS. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. 1998;144(11): 3097–3104. DOI: 10.1099/00221287-144-11-3097.
15. Lagodich AV, Cherva EA, Shtanjuk YaV, Prokulevich VA, Fomichev YuK, Prozorov AA, et al. Construction of a vector system for molecular cloning in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Molecular Biology*. 2005;39(2):345–348. Russian. DOI: 10.1007/s11008-005-0043-7.
16. Chao Yu, Shonina MY, Lahodzich AV. Design of the general concept of regulated inactivation of the gene shikimatkinase for modification of the shikimat way in bacteria *Bacillus subtilis*. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2017;3:45–53. Russian.
17. Guérout-Fleury AM, Shazand K, Frandsen N, Straiger P. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*. 1995;167(1–2): 335–336. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00652-4.
18. Yanglei Yi, Kuipers OP. Development of an efficient electroporation method for rhizobacterial *Bacillus mycoides* strains. *Journal of Microbiological Methods*. 2017;133:82–86. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.12.022.
19. Dorella FA, Estevam EM, Cardoso PG, Savassi BM, Oliveira SC, Azevedo V, et al. An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Veterinary Microbiology*. 2006;114(3–4):298–303. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.12.010.
20. Miyagi T, Kaneichi K, Fukumura M, Karita S, Sakka K, Shimada K. Electro-transformation of *Bacillus subtilis* for expressing a ruminococcus albus cellulase gene. *Nihon Chikusan Gakkaiho*. 1993;65(5):407–415. DOI: 10.2508/chikusan.65.407.
21. Kenneth FB, Gary AW. Development of competence in the *Bacillus subtilis* transformation system. *Journal of Bacteriology*. 1967;94(3):562–570.
22. Fengli Chen, Kexin Hou, Shuangyang Li, Yuangang Zu, Lei Yang. Extraction and chromatographic determination of shikimic acid in Chinese conifer needles with 1-benzyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid aqueous solutions. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2014;2014:256473. DOI: 10.1155/2014/256473.
23. Çiğdem A, Burçin EÖ, Mehmet LA. Quantification of shikimic acid in the methanolic extracts of three alnus taxons growing in Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;13(1):71–76.



24. Dong-Feng Liu, Guo-Min Ai, Qing-Xiang Zheng, Chang Liu, Cheng-Ying Jiang, Li-Xia Liu, et al. Metabolic flux responses to genetic modification for shikimic acid production by *Bacillus subtilis* strains. *Microbial Cell Factories*. 2014;13(1):40. DOI: 10.1186/1475-2859-13-40.
25. van der Rest ME, Lange C, Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999;52(4):541–545. DOI: 10.1007/s002530051557.
26. Zhi Zhang, Zhong-Tao Ding, Dan Shu, Di Luo, Hong Tan. Development of an efficient electroporation method for Iturin A-producing *Bacillus subtilis* ZK. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(4):7334–7351. DOI: 10.3390/ijms16047334.
27. Bonamy C, Guyonvarch A, Reyes O, David F, Leblon G. Interspecies electro-transformation in *Corynebacteria*. *FEMS Microbiology Letters*. 1990;66(1–3):263–269. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1990.tb04008.x.
28. Songer JG, Hilwig RW, Leeming MN, Iandolo JJ, Libby SJ. Transformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by eletroporation. *American Journal of Veterinary Research*. 1991;52(8):1258–1261.

Received 21.03.2021 / revised 20.04.2021 / accepted 03.05.2021.

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 575.174.015.3

МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ МАРКЕРЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ПОЛИМОРФИЗМА ПОРОД СВИНЬИ ДОМАШНЕЙ (*SUS SCROFA DOMESTICUS*)

**А. О. РЯБЦЕВА¹⁾, С. А. КОТОВА²⁾, А. Е. ГРЕБЕНЧУК²⁾,
А. И. ГАНДЖА³⁾, Н. В. ЖУРИНА³⁾, И. С. ЦЫБОВСКИЙ^{2), 4)}**

¹⁾Государственный комитет судебных экспертиз Республики Беларусь,
ул. Кальварийская, 43, 220073, г. Минск, Беларусь

²⁾Научно-практический центр Государственного комитета судебных
экспертиз Республики Беларусь, ул. Филимонова, 25, 220114, г. Минск, Беларусь

³⁾Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству,
ул. Фрунзе, 11, 222160, г. Жодино, Беларусь

⁴⁾БелЮрОбеспечение, пр. Дзержинского, 1Б, 220069, г. Минск, Беларусь

С использованием 13 тетрануклеотидных и 7 динуклеотидных микросателлитов исследован полиморфизм 6 пород свиней, разводимых в Беларуси, – белорусской мясной (БМ), белорусской крупной белой (БКБ), белорусской черно-пестрой (БЧП), ландрас (ЛР), йоркшир (ИР) и дюрок (ДР). Для названных пород, за исключением ДР, отмечен высокий уровень генетического разнообразия. Все исследованные породы характеризуются низким уровнем инбридинга. В их генофондах выявлены аллели, свойственные только данным породам, что подтверждает важность сохранения локальных пород для поддержания полиморфизма свиньи домашней в целом. Оценка генетических расстояний показала значительный вклад общемировых пород ЛР и ИР, тем не менее эволюционные пути 3 отечественных пород различаются.

Ключевые слова: генетический полиморфизм; микросателлиты; свинья домашняя; породы.

Образец цитирования:

Рябцева АО, Котова СА, Гребенчук АЕ, Ганджа АИ, Журина НВ, Цыбовский ИС. Микросателлитные маркеры в исследовании полиморфизма пород свиньи домашней (*Sus scrofa domestica*). Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;2:74–83.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-74-83>

For citation:

Rabtsava AA, Kotava SA, Hrebianchuk AY, Gandzha AI, Zhuryna NV, Tsybovsky IS. Microsatellite markers in the study of polymorphism of domestic pig breeds (*Sus scrofa domestica*). Journal of the Belarusian State University. Biology. 2021; 2:74–83. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-74-83>

Сведения об авторах см. на с. 83.

Information about the authors see p. 83.



MICROSATELLITE MARKERS IN THE STUDY OF POLYMORPHISM OF DOMESTIC PIG BREEDS (*SUS SCROFA DOMESTICUS*)

A. A. RABTSAVA^a, S. A. KOTAVA^b, A. Ya. HREBIANCHUK^b,
A. I. GANDZHA^c, N. V. ZHURYN^c, I. S. TSYBOVSKY^{b, d}

^aState Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus,
43 Kalvaryjskaja Street, Minsk 220073, Belarus

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

^cScientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus
on Animal Husbandry, 11 Frunze Street, Žodzina 222160, Belarus

^dBelJurZabespjachjenne, 1B Dziaržynskaha Avenue, Minsk 220069, Belarus

Corresponding author: A. A. Rabtsava (alunchik_90@mail.ru)

Using 13 tetranucleotide and 7 dinucleotide microsatellites, we studied the polymorphism of 6 breeds of pigs – Belarusian large white (BLW), Belarusian meat (BM), Belarusian black motley (BBM), Landrace (LR), Yorkshire (YR) and Duroc (DR), which are bred in Belarus. A high level of genetic polymorphism is shown for all breeds, with the exception of the DR breed. For 6 breeds, a low level of inbreeding is shown. Alleles peculiar only to these breeds were found in the gene pools of all the studied breeds. This fact confirms the importance of preserving local breeds for maintaining polymorphism in domestic pigs as a whole. Estimation of genetic distances reveals a significant contribution of the commercial European breeds of LR and YR, however, the evolutionary paths of all 3 native breeds differ.

Keywords: genetic polymorphism; microsatellites; domestic pig; breeds.

Введение

Свинья домашняя (*Sus scrofa domesticus*) относится к числу наиболее распространенных сельскохозяйственных животных в мире. В Республике Беларусь свиноводство – это традиционная и вторая по значимости отрасль животноводства. По состоянию на 2012 г. Беларусь занимала 10-е место в мире по производству мяса свиней на душу населения [1, с. 164]. Согласно статистическим данным в стране насчитывается 2,9 млн голов свиней, осуществляется разведение домашних свиней высококачественных пород. На долю племенных хозяйств приходится 290 тыс. голов. Общее поголовье свиньи домашней в Республике Беларусь представлено следующим образом: породы отечественной селекции – белорусская крупная белая (около 92 %), белорусская черно-пестрая (2 %), белорусская мясная (5 %); импортные породы – ландрас, дюрок, эстонская беконная, йоркшир, пьетрен и гемпшир (суммарно составляют не более 1 % и используются главным образом в селекционном процессе) [2, с. 127].

В последнее десятилетие генофонды общемировых и локальных пород домашних свиней активно исследуются на основе полиморфизма микросателлитных локусов [3–8], поскольку знание генетической структуры популяций как источника межпородной и внутripородной изменчивости позволяет оценить генетический потенциал конкретной породы, что имеет важное значение для определения стратегий и приоритетов сохранения генетического разнообразия [9; 10]. Генетическая структура современных пород свиней из России, Беларуси, Казахстана и Украины, которые представляют разнообразные географические и климатические зоны в Евразии, остается в значительной степени неизвестной [11].

Активная интеграция в селекционный процесс лучших общемировых пород вызывает серьезную озабоченность генетиков и селекционеров, поскольку приводит к постепенной элиминации локальных пород, что провоцирует снижение генетического разнообразия свиньи домашней в мировом масштабе. Следствием этого стали научные исследования, посвященные изучению генетического разнообразия локальных пород свиньи домашней в различных регионах земного шара [4; 11–16].

Целью настоящей работы было исследование генетического полиморфизма свиньи домашней на основе 20 видоспецифичных микросателлитных маркеров для дальнейшего использования в судебно-экспертной идентификации по делам о правонарушениях в отношении объектов животного мира.

Материалы и методы исследования

Проведено исследование STR-полиморфизма 304 образцов ДНК наиболее распространенных пород домашних свиней, разводимых в Беларуси, – белорусской мясной (БМ, $n = 53$), белорусской крупной белой (БКБ, $n = 50$), белорусской черно-пестрой (БЧП, $n = 20$), йоркшир (ИР, $n = 55$), ландрас (ЛР, $n = 54$) и дюрок (ДР, $n = 72$). Коллекция ДНК предоставлена Научно-практическим центром НАН Беларуси по животноводству.



Для генотипирования образцов использовали 20 микросателлитных (STR) локусов, из которых локусы SW240, SW857, S0101, S0005, S0355, SW951 (из перечня ISAG) и S0710 были с динуклеотидными повторами, а локусы FH2148, FH1727, FH1701, FH2709, FH2478, FH1733, FH3637, FH1900, FH1696, FH1589, FH4219, NLRIP0001, S0766 – с тетрануклеотидной структурой тандема [17–21]. Условия амплификации всех локусов аналогичны приведенным в работе [22].

Идентификацию аллелей проводили путем электрофоретического разделения продуктов ПЦР в генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, США). Размеры выявленных аллелей (в парах нуклеотидов (п. н.)) в исследуемых локусах определяли с использованием внутреннего стандарта размера GeneScan™ – 600 LIZ™ Size Standard v2.0 (*Applied Biosystems*) на основе специализированной программы *GeneMapper ID-X* (*Applied Biosystems*).

Статистическую обработку результатов генотипирования проводили с помощью программных средств *Arlequin v. 3.5.1.3*, *Cervus v. 3.0.7*, *Gen Glass 2*, *Genetix*, *BioNJ* и *GenAlex 6.5* [23–27].

Результаты и их обсуждение

Ранее нами описан генетический полиморфизм дикого кабана, в том числе в контексте дифференциации от свиньи домашней, на основе 16 видоспецифичных микросателлитных маркеров [22; 28]. В настоящей работе приведены результаты исследования межпородного полиморфизма свиньи домашней в Беларуси.

В ходе молекулярно-генетического исследования полиморфизма 20 микросателлитных маркеров у 6 пород домашних свиней (суммарно 304 образца) в совокупности идентифицировано 238 аллелей (табл. 1). При этом максимальное число аллелей (162; 159 и 160 соответственно) выявлено у пород БМ, БКБ и ЛР, минимальное – у пород БЧП (125) и ДР (127). У породы ИР обнаружено 149 аллелей.

Таблица 1

Аллельный полиморфизм микросателлитных локусов у свиньи домашней

Table 1

Allelic polymorphism of microsatellite loci in domestic pig

Локус	Хромосомная локализация	Тип повтора	N	Диапазон аллелей (п. н.)	Породы, уникальные аллели (п. н.) и их частоты
FH1589	3	GAAA	19	136–204	БЧП (136 – 0,0148; 140 – 0,0016; 204 – 0,0033); ЛР (148 – 0,0016; 190 – 0,0033)
FH1696	1	GAAA	12	345–393	ДР (357 – 0,0082)
FH1701	5	GATA	15	175–231	ДР (175 – 0,0033); БКБ (179 – 0,0016)
FH1733	11	GATA	9	274–310	–
FH1900	1	GATA	7	239–279	–
FH2148	1	GAAA	18	244–376	ДР (244 – 0,0181); ИР (288 – 0,0082); БКБ (360 – 0,0016); ЛР (364 – 0,0066)
FH2478	12	GATA	8	276–304	БМ (292 – 0,0016)
FH2709	2	GAAA	13	114–186	ДР (160 – 0,0099)
FH3637	11	GAAA	14	137–323	ДР (165 – 0,0016; 181 – 0,0016); ИР (213 – 0,0033); БМ (267 – 0,0016); БКБ (303 – 0,0099)
NLRIP0001	17	GAAA	10	337–381	БМ (361 – 0,0094); ЛР (369 – 0,0033; 381 – 0,0033)
S0005	5	AC	26	203–269	ИР (219 – 0,0016; 253 – 0,0033); БЧП (223 – 0,0016); ДР (255 – 0,0016; 261 – 0,0016; 263 – 0,0082; 267 – 0,0197; 269 – 0,0016); БКБ (257 – 0,0016)
S0101	7	GT	8	193–217	ИР (195 – 0,0033); БМ (217 – 0,0016)
S0766	6	GAAA/CA	9	434–464	ИР (440 – 0,0082)



Окончание табл. 1
Ending table 1

Локус	Хромосомная локализация	Тип повтора	N	Диапазон аллелей (п. н.)	Породы, уникальные аллели (п. н.) и их частоты
SW240	2	TG	14	93–127	ЛР (93 – 0,001 6); ИР (103 – 0,001 6); ДР (105 – 0,001 6)
SW857	14	AC	11	136–160	БЧП (160 – 0,003 3)
FH4219	1	GAAA	5	71–95	ИР (75 – 0,006 6)
S0355	15	AC	14	235–271	ЛР (241 – 0,001 6); ДР (247 – 0,033); ИР (253 – 0,001 6); БКБ (255 – 0,006 6; 267 – 0,001 6); БМ (261 – 0,006 6)
SW951	10	TG	7	118–134	ИР (122 – 0,019 7); ДР (132 – 0,003 3)
S0710	16	GT	11	334–390	ИР (360 – 0,004 9); ЛР (374 – 0,003 3); БМ (384 – 0,003 3); ДР (390 – 0,011 5)
FH1727	15	GATA	8	210–246	ДР (246 – 0,001 6)

Примечание. N – общее количество аллелей.

Следует отметить, что 12 из 20 микросателлитных локусов характеризовались наличием 10 и более аллелей. Количество аллелей значительно варьировало между локусами: от 5 в локусе FH4219 до 26 в локусе S0005 (см. табл. 1). Среднее число аллелей на локус в обобщенной выборке составило 12. Установлено, что у отдельных пород домашних свиней могут различаться как мажорные аллели в локусах, так и характер распределения аллельных признаков в целом.

Во всех локусах, за исключением FH1733 и FH1900, были выявлены аллели, которые встречались только у одной исследуемой породы (см. табл. 1). Коммерческие породы ДР, ИР и ЛР имели максимальное количество частных аллелей – 16 (12,6 % от общего числа аллелей, выявленных у данной породы), 11 (7,4 %) и 8 (5 %) соответственно, что указывает на специфичность генофонда локальных пород свиней. В большинстве случаев частные аллели встречались с низкими частотами (<0,001 6). В исследовании локальных украинских пород [15] значительное число частных аллелей, как и в настоящем исследовании, показано у местной выборки породы ДР.

В группе автохтонных белорусских пород частные аллели были обнаружены в 11 локусах (наибольшее количество (6 аллелей) – у породы БМ). Вместе с тем максимальные значения частот частных аллелей местных пород находятся на уровне 2–3 %, в связи с чем данные аллели не могут быть маркерами отдельных пород. Небольшое количество частных аллелей у местных пород показано также в исследовании автохтонных украинских пород (за исключением украинской мясной) [15].

При исследовании домашних свиней все 20 изученных локусов были полиморфны у каждой из 6 пород. В совокупной выборке свиной домашней для 19 из 20 локусов значения показателя информационного полиморфизма (*PIC*) находились в пределах от 0,504 5 (S0710) до 0,919 4 (S0005). Согласно работе [29] это соответствует высокому уровню информативности локусов, задействованных в исследовании, что позволяет использовать предложенную панель локусов в качестве инструмента при решении идентификационных задач в судебно-экспертных исследованиях.

Выборка домашних свиней в целом продемонстрировала статистически высокие значения ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности в исследованных локусах (для локусов FH1900 и S0710 эти показатели были ниже) (табл. 2). При анализе средних значений параметров полиморфизма следует учитывать, что локусы S0710, FH4219 и SW951 в проведенных нами исследованиях генетического полиморфизма дикого кабана (неопубликованные данные) проявляют себя как мономорфные (частоты доминирующего аллеля составляют 1,0; 0,997 и 0,984 соответственно). Последнее обстоятельство указывает на перспективность использования данных локусов в первую очередь для дифференциации, а не для идентификации исследуемых образцов.

Анализ *locus by locus*, выполненный в программе *Arlequin v. 3.5.1.3*, показал, что все тестируемые STR-локусы эффективны для выявления генетической дифференциации особей различных пород со значениями F_{ST} , варьирующими от 0,050 7 для локуса S0005 до 0,233 0 для локуса FH4219 (см. табл. 2), среднее значение F_{ST} составило 0,112 95. Примечательно, что 5 локусов с наибольшим дифференцирующим вкладом представлены тетра nukлеотидными, а не динуклеотидными микросателлитами. Значение мультилокусного критерия F_{ST} демонстрирует, что около 11,3 % общего генетического разнообразия объясняются межпопуляционными (межпородными) различиями, а оставшиеся 88,7 % соответствуют различиям между особями внутри отдельных пород. Практически такое же значение ($F_{ST} = 0,122$) получено и при исследовании 12 STR-локусов 5 локальных украинских пород [15].



Таблица 2

Параметры генетического разнообразия микросателлитных локусов

Table 2

Parameters of genetic diversity of microsatellite loci

Локус	F_{ST}	H_e	H_o	PIC
S0005	0,050 7*	0,924 25	0,901 32	0,919 42
SW240	0,059 29*	0,815 35	0,805 92	0,795 43
SW857	0,073 11*	0,843 13	0,805 92	0,824 89
FH1727	0,076 02*	0,734 07	0,694 08	0,695 17
S0355	0,076 93*	0,650 36	0,585 53	0,625 25
FH2709	0,080 52*	0,855 05	0,812 50	0,839 73
NLRIP0001	0,080 69*	0,715 82	0,661 18	0,680 05
FH2478	0,087 98*	0,766 75	0,700 66	0,727 84
FH1733	0,094 15*	0,856 35	0,782 89	0,840 89
S0710	0,101 40*	0,542 86	0,486 84	0,504 53
FH2148	0,102 96*	0,811 03	0,710 53	0,798 29
S0101	0,106 95*	0,652 51	0,595 39	0,611 16
SW951	0,112 72*	0,652 66	0,555 92	0,589 01
S0766	0,126 33*	0,784 64	0,667 76	0,755 50
FH1589	0,129 15*	0,871 96	0,805 92	0,859 20
FH1696	0,156 04*	0,866 97	0,736 84	0,852 40
FH1701	0,159 11*	0,856 13	0,717 11	0,839 85
FH1900	0,161 44*	0,559 24	0,467 11	0,461 71
FH3637	0,190 32*	0,724 56	0,605 26	0,684 34
FH4219	0,233 23*	0,642 99	0,411 18	0,575 50
Среднее значение	0,112 95	0,756 33	0,679 19	0,724 01

Примечание. H_e – ожидаемая гетерозиготность; H_o – наблюдаемая гетерозиготность;
* – p -value < 0,000 001.

Параметры межпородной изменчивости исследованных пород домашних свиней приведены в табл. 3. Для каждой из 6 пород установлены высокие показатели наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности. Среднее количество аллелей на локус между породами варьировало незначительно: от 6 у БЧП и ДР до 8 у БКБ, ЛР, ИР (см. табл. 3). Среднее число выявляемых аллелей на локус у отдельных пород было несколько ниже, чем в обобщенной выборке животных.

Таблица 3

Породные параметры генетического разнообразия свиней

Table 3

Breed parameters of genetic diversity of pigs

Параметры	БМ	БКБ	БЧП	ЛР	ИР	ДР
Среднее количество наблюдаемых генотипов на локус	17,75	17,05	10,0	17,15	15,5	10,7
Число полиморфных локусов*	20	20	20	20	20	20
Среднее количество аллелей на локус во всех локусах	7	8	6	8	8	6



Окончание табл. 3
Ending table 3

Параметры	БМ	БКБ	БЧП	ЛР	ИР	ДР
Эффективное число аллелей	3,83	3,92	3,29	3,72	3,41	2,26
PIC	0,696	0,703	0,638	0,686	0,664	0,513
Средняя ожидаемая гетерозиготность	0,739	0,745	0,696	0,731	0,707	0,558
Средняя наблюдаемая гетерозиготность	0,723	0,729	0,658	0,730	0,692	0,553
Количество локусов, отклоняющихся от равновесия Харди – Вайнберга	2	4	2	3	2	8
Количество локусов, отклоняющихся от равновесия Харди – Вайнберга после поправки Бонферрони	0	1	0	0	2	6
F_{IS}/p (rand $F_{IS} \geq \text{obs } F_{IS}$)	0,024/0,113	0,022/0,156	0,057/0,033	0,002/0,466	0,022/0,14	0,009/0,336

*Частота мажорных аллелей составляла менее 0,95.

Автохтонные белорусские породы БЧП, БМ и БКБ демонстрируют такой же уровень полиморфизма, как и разводимые в стране европейские породы ИР и ЛР (0,696–0,745 и 0,707–0,731 соответственно). Показатели генетического полиморфизма белорусского поголовья пород ЛР и ИР сопоставимы со значениями, полученными в исследованиях вьетнамских стад ЛР и ИР, а также поголовья породы ЛР из Германии [30]. Для всех исследованных пород белорусской и зарубежной селекции получены низкие значения коэффициента инбридинга F_{IS} (0,009–0,024) (см. табл. 3), что может объясняться как комплектованием выборок животными из различных хозяйств, так и грамотным выстраиванием стратегий поддержания пород в хозяйствах. Для сравнения: 3 украинские породы – украинская пятнистая степная, украинская мясная и украинская белая степная – также демонстрируют умеренные коэффициенты инбридинга (0,027–0,089), в то время как 2 породы – полтавская мясная и миргородская – имеют более высокие значения (0,184 и 0,178) [15]. Автохтонные хорватские породы черная славонская и турополье характеризуются коэффициентами инбридинга 0,116 и 0,105 соответственно [14].

Специфика судебно-экспертной работы заключается в необходимости исследования биологических образцов неизвестного происхождения. Первоочередным является установление источника происхождения биологического образца (от дикого кабана или свиньи домашней), после чего следует идентификация образца (от данной особи или другой). Достоверность идентификационных исследований рассчитывается на основе частот аллелей в обобщенной выборке домашних свиней, поскольку информация о породной принадлежности образца отсутствует.

В обобщенной выборке домашних свиней 18 из 20 исследованных локусов не соответствовали равновесию Харди – Вайнберга, при этом для 16 из них неравновесное состояние сохранялось после введения поправки Бонферрони. Однако внутривидовой анализ домашних свиней на равновесие Харди – Вайнберга фактически не выявил отклонений: с поправкой Бонферрони у 3 автохтонных пород не соответствовал равновесию только 1 локус у породы БКБ. При наименьшей выборке (20 образцов) порода БЧП удовлетворяла всем критериям генетического полиморфизма. В выборке пород зарубежной селекции отклонялись от равновесия 2 локуса у породы ИР и 6 локусов у породы ДР. Неравновесное состояние 8 из 12 локусов показано также для украинской популяции породы ДР [15].

Генетическое разнообразие породы ДР ($n = 72$) является самым низким среди изученных (гетерозиготность – 0,553; эффективное число аллелей – 2,26), однако соответствует результатам, полученным для домашних свиней другими исследователями [31; 32]. У этой породы 6 из 20 локусов отклоняются от равновесия Харди – Вайнберга. Сниженное генетическое разнообразие породы ДР может быть особенностью ограниченного в размерах белорусского стада, но такие же тенденции установлены и для



украинского поголовья данной породы (при коэффициенте инбридинга F_{IS} , равном 0,111) [15], что может указывать на принадлежность белорусского и украинского поголовья к одной линии породы ДР либо на схожие направления селекционной работы с породой.

Филогенетические отношения между породами оценивали на основе генетических расстояний (D_A) по методу Нея (1972) [33]. Значения D_A между каждой парой пород свиней приведены в табл. 4.

Таблица 4

Генетические расстояния (D_A),
установленные между породами свиней

Table 4

Genetic distances (D_A) established between pig breeds

Порода	Порода					
	БМ	БКБ	БЧП	ЛР	ИР	ДР
БМ	0	0,165	0,262	0,076	0,286	0,355
БКБ		0	0,213	0,226	0,101	0,561
БЧП			0	0,275	0,314	0,445
ЛР				0	0,337	0,341
ИР					0	0,673
ДР						0

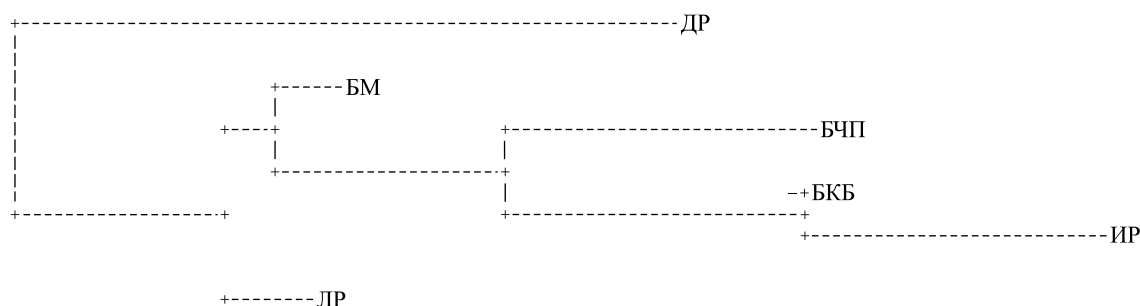
Наибольшее значение D_A по Нею было установлено между породами ИР и ДР (0,673). В целом порода ДР показала самые большие расстояния по сравнению со всеми белорусскими локальными и коммерческими европейскими породами свиней. Минимальные значения D_A установлены для пород БМ и ЛР (0,076), а также БКБ и ИР (0,101). В то же время порода БЧП дистанцируется от обеих коммерческих европейских пород значительно сильнее, что может быть обусловлено периодом народной селекции на первоначальном этапе ее формирования.

На рисунке представлена дендрограмма, построенная методом попарного внутригруппового невзвешенного среднего (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*, UPGMA) из матрицы D_A (см. табл. 4). Эволюционный анализ проводился в программе *BioNJ* [34].

На дендрограмме европейские породы – коммерческие и локальные – образуют единый кластер. Порода ДР имеет североамериканское происхождение, в связи с чем заметно дистанцируется от всех европейских пород. Среди автохтонных пород БЧП генетически ближе к БКБ, чем к БМ, а БКБ проявляет высокий уровень сходства с европейской породой ИР.

Многоуровневая структура дендрограммы, на наш взгляд, определяется тем, что современные отечественные породы свиней имеют сходные предковые популяции – выборки из послевоенных помесей. При этом в данных выборках в разной степени уже присутствовал генетический вклад европейской крупной белой и (или) других европейских пород. Известно, что местные состоятельные земледельцы завозили в свои поместья иностранные породы из Англии и Германии уже со второй половины XIX в. и даже скрещивали их с аборигенными свиньями в крестьянских хозяйствах [35, с. 46]. Интенсивная племенная работа по улучшению аборигенного свиноводства с использованием европейской крупной белой породы проводилась также до Второй мировой войны [2, с. 126].

----- 0,05 -----



Филогенетический анализ пород домашних свиней, разводимых на территории Беларуси

Phylogenetic analysis of domestic pig breeds bred on the territory of Belarus



Таким образом, оценка генетических расстояний показала, что в формировании отечественных пород свиньи домашней выявляется генетический вклад европейских пород ЛР и крупной белой (ИР), тем не менее эволюционные пути 3 отечественных пород различаются. В настоящее время белорусские породы БМ, БКБ и БЧП имеют собственные генетические характеристики.

Заключение

Анализ массивов генотипов, полученных генотипированием 20 микросателлитов, показал, что генофонды всех исследованных пород свиней различаются между собой практически во всех локусах. В генофондах автохтонных белорусских пород выявлены аллели, свойственные только данным породам, как это показано для других локальных пород [13–15; 29], что подтверждает важность сохранения разнообразия пород для поддержания полиморфизма свиньи домашней в целом. В отличие от дикого кабана у всех пород домашних свиней локусы S0710, FH4219 и SW951 являются полиморфными.

Автохтонные и европейские импортные породы свиней, разводимые в Беларуси, обладают сопоставимым уровнем генетического полиморфизма. У американской породы ДР отмечено самое низкое генетическое разнообразие. Высокое генетическое разнообразие местных пород в сочетании с низкими уровнями инбридинга может быть следствием сложной истории скрещивания, в котором участвовало множество пород-основателей [11] в связи с тем, что в послевоенные годы свиноводство Беларуси характеризовалось многопородностью, обусловленной вынужденным завозом племенных животных из всевозможных источников, включая репарационные поставки из Германии [35, с. 47].

Экспериментально установлено, что на основе полиморфизма STR-локусов возможно формирование панелей локусов для дифференциации пород свиньи домашней.

Библиографические ссылки

1. Данкверт СА, Холманов АМ, Осадчая ОЮ. *Производство мяса в мире*. Москва: Экономика; 2016. 495 с. (Животноводство стран мира).
2. Шейко ИП, Смирнов ВС, Шейко РИ. *Свиноводство*. Минск: ИВЦ Минфина; 2013. 375 с.
3. SanCristobal M, Chevalet C, Haley CS, Joosten R, Rattink AP, Harlizius B, et al. Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. *Animal Genetics*. 2006;37(3):189–198. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2005.01385.x.
4. Kim TH, Kim KS, Choi BH, Yoon DH, Jang GW, Lee KT, et al. Genetic structure of pig breeds from Korea and China using microsatellite loci analysis. *Journal of Animal Science*. 2005;83(10):2255–2263. DOI: 10.2527/2005.83102255x.
5. Nidup K, Moran C. Genetic diversity of domestic pigs as revealed by microsatellites: a mini review. *Genomics and Quantitative Genetics*. 2011;2:5–18.
6. Ollivier L. European pig genetic diversity: a minireview. *Animal*. 2009;3(7):915–924. DOI: 10.1017/S1751731109004297.
7. Hulsegge I, Calus M, Hoving-Bolink R, Lopes M, Megens H-J, Oldenbroek K. Impact of merging commercial breeding lines on the genetic diversity of Landrace pigs. *Genetics Selection Evolution*. 2019;51:60. DOI: 10.1186/s12711-019-0502-6.
8. Šalamon D, Margeta P, Klišanić V, Menčík S, Karolyi D, Mahnet Ž, et al. Genetic diversity of the Banija spotted pig breed using microsatellite markers. *Journal of Central European Agriculture*. 2019;20(1):36–42. DOI: 10.5513/JCEA01/20.1.2467.
9. Caballero A, Toro MA. Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conservation Genetics*. 2002;3(3):289–299. DOI: 10.1023/A:1019956205473.
10. Столповский ЮА, Захаров-Гезехус ИА. Проблема сохранения генофондов domesticiрованных животных. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(4):477–486. DOI: 10.18699/VJ17.266.
11. Traspoz A, Wenjiang Deng, Kostyunina O, Jiuxiu Ji, Shatokhin K, Lugovoy S, et al. Population structure and genome characterization of local pig breeds in Russia, Belorussia, Kazakhstan and Ukraine. *Genetics Selection Evolution*. 2016;48:16. DOI: 10.1186/s12711-016-0196-y.
12. Qiao R, Li X, Han X, Wang K, Lv G, Ren G, et al. Population structure and genetic diversity of four Henan pig populations. *Animal Genetics*. 2019;50(3):262–265. DOI: 10.1111/age.12775.
13. Vrtková I, Stehlík L, Putnová L, Kratochvilová L, Falková L. Genetic structure in three breeds of pigs populations using microsatellite markers in the Czech Republic. *Research in Pig Breeding*. 2012;6(2):83–87.
14. Gvozdanović K, Margeta V, Margeta P, Djurkin Kušec I, Galović D, Dovč P, et al. Genetic diversity of autochthonous pig breeds analyzed by microsatellite markers and mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism. *Animal Biotechnology*. 2019;30(3):242–251. DOI: 10.1080/10495398.2018.1478847.
15. Kramarenko SS, Lugovoy SI, Kharzinova VR, Lykhach VY, Kramarenko AS, Lykhach AV. Genetic diversity of Ukrainian local pig breeds based on microsatellite markers. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2018;9(2):177–182. DOI: 10.15421/021826.
16. Cherel P, Glénisson J, Pires J. Tetranucleotide microsatellites contribute to a highly discriminating parentage test panel in pig. *Animal Genetics*. 2011;42(6):659–661. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2011.02187.x.
17. Rohrer GA, Alexander LJ, Keele JW, Smith TP, Beattie CW. A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics*. 1994;136(1):231–245.
18. Yaemmeeklin W, Jirasupphachok J, Koykul W, Suwattana D. Efficacy of microsatellite markers in parentage control in swine. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 2009;39(3):259–265.
19. Chen K, Knorr C, Bornemann-Kolatzki K, Ren J, Huang L, Rohrer GA, et al. Targeted oligonucleotide-mediated microsatellite identification (TOMMI) from large-insert library clones. *BMC Genetics*. 2005;6:54. DOI: 10.1186/1471-2156-6-54.
20. Robic A, Dalens M, Woloszyn N, Milan D, Riquet J, Gellin J. Isolation of 28 new porcine microsatellites revealing polymorphism. *Mammalian Genome*. 1994;5(9):580–583. DOI: 10.1007/BF00354935.
21. Alexander LJ, Troyer DL, Rohrer GA, Smith TPL, Schook LB, Beattie CW. Physical assignments of 68 porcine cosmid and lambda clones containing polymorphic microsatellites. *Mammalian Genome*. 1996;7(5):368–372. DOI: 10.1007/s003359900106.



22. Rębała K, Rabtsava AA, Kotova SA, Kipen VN, Zhurina NV, Gandzha AI, et al. STR profiling for discrimination between wild and domestic swine specimens and between main breeds of domestic pigs reared in Belarus. *Plos One*. 2016;11(11):e0166563. DOI: 10.1371/journal.pone.0166563.
23. Schneider S, Roessli D, Excoffier L. *ARLEQUIN ver. 2.000: a software for population genetics data analysis*. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology and Ecology, University of Geneva; 2000. 111 p.
24. Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. 1998;7(5):639–655. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x.
25. Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A. GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*. 2004;95(6):536–539. DOI: 10.1093/jhered/esh074.
26. Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. *GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Montpellier: Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II; 2004.
27. Peakall R, Smouse PE. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*. 2006;6(1):288–295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
28. Рябцева АО, Цыбовский ИС, Котова СА. Микросателлитные маркеры в исследовании полиморфизма дикого кабана (*Sus scrofa*) и свиньи домашней (*Sus scrofa domesticus*), обитающих на территории Республики Беларусь. *Молекулярная и прикладная генетика*. 2018;25:56–66.
29. Takezaki N, Nei M. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*. 1996;144(1):389–399.
30. Thuy NTD, Melchinger-Wild E, Kuss AW, Cuong NV, Bartenschlager H, Geldermann H. Comparison of Vietnamese and European pig breeds using microsatellites. *Journal of Animal Science*. 2006;84(10):2601–2608. DOI: 10.2527/jas.2005-641.
31. Fan B, Wang Z-G, Li Y-J, Zhao X-L, Liu B, Zhao S-H, et al. Genetic variation analysis within and among Chinese indigenous swine populations using microsatellite markers. *Animal Genetics*. 2002;33(6):422–427. DOI: 10.1046/j.1365-2052.2002.00898.x.
32. Chang WH, Chu HP, Jiang YN, Li SH, Wang Y, Chen CH, et al. Genetic variation and phylogenetics of Lanyu and exotic pig breeds in Taiwan analyzed by nineteen microsatellite markers. *Journal of Animal Science*. 2009;87(1):1–8. DOI: 10.2527/jas.2007-0562.
33. Nei M. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*. 1972;106(949):283–292.
34. Gascuel O. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution*. 1997;14(7):685–695. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025808.
35. Гильман ЗД. *Свиноводство и технология производства свинины*. Минск: Ураджай; 1995. 367 с.

References

1. Dankvert SA, Kholmanov AM, Osadchaya OYu. *Proizvodstvo myasa v mire* [World meat production]. Moscow: Ekonomika; 2016. 495 p. (Zhivotnovodstvo stran mira). Russian.
2. Sheiko IP, Smirnov VS, Sheiko RI. *Svinovodstvo* [Pig breeding]. Minsk: Information and Computing Center of the Ministry of Finance of the Republic of Belarus; 2013. 375 p. Russian.
3. SanCristobal M, Chevalet C, Haley CS, Joosten R, Rattink AP, Harlizius B, et al. Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. *Animal Genetics*. 2006;37(3):189–198. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2005.01385.x.
4. Kim TH, Kim KS, Choi BH, Yoon DH, Jang GW, Lee KT, et al. Genetic structure of pig breeds from Korea and China using microsatellite loci analysis. *Journal of Animal Science*. 2005;83(10):2255–2263. DOI: 10.2527/2005.83102255x.
5. Nidup K, Moran C. Genetic diversity of domestic pigs as revealed by microsatellites: a mini review. *Genomics and Quantitative Genetics*. 2011;2:5–18.
6. Ollivier L. European pig genetic diversity: a minireview. *Animal*. 2009;3(7):915–924. DOI: 10.1017/S1751731109004297.
7. Hulsege I, Calus M, Hoving-Bolink R, Lopes M, Megens H-J, Oldenbroek K. Impact of merging commercial breeding lines on the genetic diversity of Landrace pigs. *Genetics Selection Evolution*. 2019;51:60. DOI: 10.1186/s12711-019-0502-6.
8. Salamon D, Margeta P, Klišanić V, Menčík S, Karolyi D, Mahnet Ž, et al. Genetic diversity of the Banja spotted pig breed using microsatellite markers. *Journal of Central European Agriculture*. 2019;20(1):36–42. DOI: 10.5513/JCEA01/20.1.2467.
9. Caballero A, Toro MA. Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conservation Genetics*. 2002;3(3):289–299. DOI: 10.1023/A:1019956205473.
10. Stolpovskiy YuA, Zakharov-Gezekhus IA. The problem of conservation of gene pools of domesticated animals. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(4):477–486. DOI: 10.18699/VJ17.266. Russian.
11. Traspov A, Wenjiang Deng, Kostyunina O, Jiuxiu Ji, Shatkhin K, Lugovoy S, et al. Population structure and genome characterization of local pig breeds in Russia, Belorussia, Kazakhstan and Ukraine. *Genetics Selection Evolution*. 2016;48:16. DOI: 10.1186/s12711-016-0196-y.
12. Qiao R, Li X, Han X, Wang K, Lv G, Ren G, et al. Population structure and genetic diversity of four Henan pig populations. *Animal Genetics*. 2019;50(3):262–265. DOI: 10.1111/age.12775.
13. Vrtková I, Stehlík L, Putnová L, Kratochvílová L, Falková L. Genetic structure in three breeds of pigs populations using microsatellite markers in the Czech Republic. *Research in Pig Breeding*. 2012;6(2):83–87.
14. Gvozdanović K, Margeta V, Margeta P, Djurkin Kušec I, Galović D, Dovč P, et al. Genetic diversity of autochthonous pig breeds analyzed by microsatellite markers and mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism. *Animal Biotechnology*. 2019;30(3):242–251. DOI: 10.1080/10495398.2018.1478847.
15. Kramarenko SS, Lugovoy SI, Kharzinova VR, Lykhach VY, Kramarenko AS, Lykhach AV. Genetic diversity of Ukrainian local pig breeds based on microsatellite markers. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2018;9(2):177–182. DOI: 10.15421/021826.
16. Cherel P, Glénisson J, Pires J. Tetranucleotide microsatellites contribute to a highly discriminating parentage test panel in pig. *Animal Genetics*. 2011;42(6):659–661. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2011.02187.x.
17. Rohrer GA, Alexander LJ, Keele JW, Smith TP, Beattie CW. A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics*. 1994;136(1):231–245.
18. Yaemmeklin W, Jirasupphachok J, Koykul W, Suwattana D. Efficacy of microsatellite markers in parentage control in swine. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 2009;39(3):259–265.
19. Chen K, Knorr C, Bornemann-Kolatzki K, Ren J, Huang L, Rohrer GA, et al. Targeted oligonucleotide-mediated microsatellite identification (TOMMI) from large-insert library clones. *BMC Genetics*. 2005;6:54. DOI: 10.1186/1471-2156-6-54.



20. Robic A, Dalens M, Woloszyn N, Milan D, Riquet J, Gellin J. Isolation of 28 new porcine microsatellites revealing polymorphism. *Mammalian Genome*. 1994;5(9):580–583. DOI: 10.1007/BF00354935.
21. Alexander LJ, Troyer DL, Rohrer GA, Smith TPL, Schook LB, Beattie CW. Physical assignments of 68 porcine cosmid and lambda clones containing polymorphic microsatellites. *Mammalian Genome*. 1996;7(5):368–372. DOI: 10.1007/s003359900106.
22. Rębała K, Rabtsava AA, Kotova SA, Kipen VN, Zhurina NV, Gandzha AI, et al. STR profiling for discrimination between wild and domestic swine specimens and between main breeds of domestic pigs reared in Belarus. *Plos One*. 2016;11(11):e0166563. DOI: 10.1371/journal.pone.0166563.
23. Schneider S, Roessli D, Excoffier L. *ARLEQUIN ver. 2.000: a software for population genetics data analysis*. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology and Ecology, University of Geneva; 2000. 111 p.
24. Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. 1998;7(5):639–655. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x.
25. Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A. GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*. 2004;95(6):536–539. DOI: 10.1093/jhered/esh074.
26. Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. *GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Montpellier: Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II; 2004.
27. Peakall R, Smouse PE. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*. 2006;6(1):288–295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
28. Rabtsava AA, Tsybovsky IS, Kotova SA. Microsatellite markers in the study of polymorphism of the wild boar (*Sus scrofa*) and domestic pig (*Sus scrofa domesticus*), inhabiting the territory of the Republic of Belarus. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika*. 2018;25:56–66. Russian.
29. Takezaki N, Nei M. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*. 1996;144(1):389–399.
30. Thuy NTD, Melchinger-Wild E, Kuss AW, Cuong NV, Bartschlagel H, Geldermann H. Comparison of Vietnamese and European pig breeds using microsatellites. *Journal of Animal Science*. 2006;84(10):2601–2608. DOI: 10.2527/jas.2005-641.
31. Fan B, Wang Z-G, Li Y-J, Zhao X-L, Liu B, Zhao S-H, et al. Genetic variation analysis within and among Chinese indigenous swine populations using microsatellite markers. *Animal Genetics*. 2002;33(6):422–427. DOI: 10.1046/j.1365-2052.2002.00898.x.
32. Chang WH, Chu HP, Jiang YN, Li SH, Wang Y, Chen CH, et al. Genetic variation and phylogenetics of Lanyu and exotic pig breeds in Taiwan analyzed by nineteen microsatellite markers. *Journal of Animal Science*. 2009;87(1):1–8. DOI: 10.2527/jas.2007-0562.
33. Nei M. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*. 1972;106(949):283–292.
34. Gascuel O. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution*. 1997;14(7):685–695. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025808.
35. Gil'man ZD. *Svinovodstvo i tekhnologiya proizvodstva svininy* [Pig breeding and pork production technology]. Minsk: Uradzhaj; 1995. 367 p. Russian.

Получена 16.02.2021 / исправлена 06.04.2021 / принята 03.05.2021.
Received 16.02.2021 / revised 06.04.2021 / accepted 03.05.2021.

Авторы:

Алина Олеговна Рябцева – заместитель начальника отдела исследования и учетов объектов животного происхождения и волокнистой природы управления генотипоскопических экспертиз главного управления специальных экспертиз центрального аппарата.

Светлана Александровна Котова – кандидат химических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований.

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

Алла Ивановна Ганджа – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент; заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования.

Наталья Владимировна Журина – кандидат сельскохозяйственных наук; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования.

Иосиф Станиславович Цыбовский – кандидат биологических наук; научный руководитель лаборатории молекулярно-биологических исследований²⁾, ведущий специалист⁴⁾.

Authors:

Alina A. Rabtsava, deputy head of the department of research and accounting of objects of animal origin and fibrous nature, department of genotyposcopic examination, general directorate of special examination, central office.

alunchik_90@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-5550-9873>

Sviatlana A. Kotava, PhD (chemistry); leading researcher at the laboratory of molecular biological research.

svetlkotova@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-6521-7732>

Alexandra Ya. Hrebanchuk, junior researcher at the laboratory of molecular biological research.

iamsanya94@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-1224-3275>

Alla I. Gandzha, PhD (agricultural science), docent; head of the laboratory of molecular biotechnology and DNA testing.

animalgen@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4730-2017>

Natallia V. Zhuryna, PhD (agricultural science); leading researcher at the laboratory of molecular biotechnology and DNA testing.

molgenetics@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-3616-7913>

Iosif S. Tsybovsky, PhD (biology); scientific supervisor at the laboratory of molecular biological research^{b)} and leading specialist^{d)}.

tsybovsky@yahoo.com

<https://orcid.org/0000-0002-8611-8215>

ЭКОЛОГИЯ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ

ECOLOGY AND CONSERVANCY

УДК 574.5(476)574.583

СОДЕРЖАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПИГМЕНТОВ В ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ ОЗЕРА БАТОРИНО И ИХ СПЕКТРАЛЬНЫЕ ПИГМЕНТНЫЕ ИНДЕКСЫ

А. А. ЖУКОВА¹⁾, О. С. СМОЛЬСКАЯ¹⁾, Е. А. ВИШНЕВЕЦКАЯ¹⁾, Ю. КАРОСИЕНЕ²⁾

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

²⁾Центр исследований природы, ул. Академии, 2, LT-08412, г. Вильнюс, Литва

Исследования на оз. Баторино были направлены на изучение количественных и качественных характеристик автотрофного компонента донных отложений, а также поиск их связи с данными спектрального анализа пигментного состава. Содержание суммарного хлорофилла *a* (без поправки на присутствие феопигментов) было относительно невысоким – $12,7 \pm 10,2$ мкг/г сырой массы донных отложений. Содержание каротиноидов в среднем составило $10,24 \pm 4,89$ мкг/г сырой массы донных грунтов. Показано, что для характеристики структурных показателей донных отложений могут применяться пигментные индексы E_{450}/E_{480} , E_{480}/E_{664} , E_{430}/E_{664} , E_{430}/E_{412} , отражающие долговременные тренды в развитии продуцентов в экосистеме, в первую очередь фитопланктона. В ходе предварительного анализа проб были рассчитаны вспомогательные пигментные индексы контроля чистоты экстракта и четкости прописанного спектра: E_{664}/E_{720} , E_{430}/E_{720} , E_{530}/E_{720} , E_{412}/E_{720} , E_{430}/E_{530} , E_{664}/E_{530} , E_{412}/E_{664} .

Образец цитирования:

Жукова АА, Смольская ОС, Вишневецкая ЕА, Каросиене Ю. Содержание растительных пигментов в донных отложениях озера Баторино и их спектральные пигментные индексы. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021;2:84–96.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-84-96>

For citation:

Zhukava HA, Smolskaya VS, Vishnevetskaya EA, Karosienė J. The content of plant pigments in bottom sediments of Batorino Lake and their spectral pigment indices. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;2:84–96. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-84-96>

Авторы:

Анна Анатольевна Жукова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры общей экологии и методики преподавания биологии биологического факультета.
Ольга Сергеевна Смольская – кандидат биологических наук; доцент кафедры общей экологии и методики преподавания биологии биологического факультета.
Екатерина Александровна Вишневецкая – студентка биологического факультета. Научный руководитель – А. А. Жукова.
Юрате Каросиене – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории альгологии и экологии микроорганизмов Института ботаники.

Authors:

Hanna A. Zhukava, PhD (biology), docent; associate professor at the department of general ecology and methods of biology teaching, faculty of biology.
anna_eco@tut.by
Volha S. Smolskaya, PhD (biology); associate professor at the department of general ecology and methods of biology teaching, faculty of biology.
sylimova_1991@mail.ru
Ekaterina A. Vishnevetskaya, student at the faculty of biology.
kvlenta2001@gmail.com
Jūratė Karosienė, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of algology and microbial ecology, Institute of botany.



Выявлена тесная обратная связь индекса E_{430}/E_{664} и количества хлорофилла a на разных горизонтах колонок донных отложений ($r = -0,7$), а также обратная связь средней силы между индексом E_{430}/E_{412} и долей феопигментов ($r = -0,56$).

Ключевые слова: оз. Баторино; донные отложения; пигментные индексы; хлорофилл; феопигменты; каротиноиды.

THE CONTENT OF PLANT PIGMENTS IN BOTTOM SEDIMENTS OF BATORINO LAKE AND THEIR SPECTRAL PIGMENT INDICES

H. A. ZHUKAVA^a, V. S. SMOLSKAYA^a, E. A. VISHNEVETSKAYA^a, J. KAROSIENĖ^b

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

^bNature Research Centre, 2 Akademijos Street, Vilnius LT-08412, Lithuania

Corresponding author: V. S. Smolskaya (sylimova_1991@mail.ru)

Studies on the Batorino Lake were aimed at assessing the quantitative and qualitative characteristics of the autotrophic component of bottom sediments, as well as searching for their relationships with the data of spectral analysis of the pigment composition. The content of total chlorophyll a (without correction for the presence of phaeopigments) was relatively low – $12.7 \pm 10.2 \mu\text{g/g}$ wet weight of bottom sediments. The content of carotenoids averaged $10.24 \pm 4.89 \mu\text{g/g}$ wet weight of bottom sediments. It has been shown that pigment indices: E_{450}/E_{480} , E_{480}/E_{664} , E_{430}/E_{664} , E_{430}/E_{412} , characterise the structural indicators of bottom sediments and reflect the long-term trends in the development of primary producers in water ecosystems, primarily phytoplankton. During the preliminary analysis, auxiliary pigment indices for controlling the purity of the extract and the clarity of the prescribed spectrum were calculated: E_{664}/E_{720} , E_{430}/E_{720} , E_{530}/E_{720} , E_{412}/E_{720} , E_{430}/E_{530} , E_{664}/E_{530} , E_{412}/E_{664} . A close inverse relationship was revealed between E_{430}/E_{664} index and the amount of chlorophyll a at different depths of bottom sediments ($r = -0.7$), as well as an average correlation between the E_{430}/E_{412} index and the proportion of phaeopigments ($r = -0.56$).

Keywords: Batorino Lake; bottom sediments; pigment indices; chlorophyll; phaeopigments; carotenoids.

Введение

Временные и пространственные изменения в содержании хлорофилла дают представление о продукционно-деструкционных процессах в водной экосистеме, а также ее устойчивости и способности к самоочищению. Хлорофилл – неотъемлемый элемент процессов синтеза органического вещества, отражающий интенсивность функционирования автотрофного блока в водоемах, поэтому пигментные характеристики донных отложений могут служить индикаторами интегральных изменений, происходящих в водных экосистемах [1; 2].

Концентрация хлорофилла и продуктов его распада в донных отложениях в эвфотной зоне определяется функционированием комплекса микробентических водорослей и процессами седиментации хлорофиллсодержащей взвеси из водной толщи. При отмирании клеток водорослей наиболее быстрая деградация пигментов происходит, когда они подвергаются одновременному действию высокой интенсивности излучения, температуры и кислорода, т. е. находятся в состоянии, характерном для эпилимниона водоемов. Кроме того, важной характеристикой является скорость осаждения органического биогенного материала, на которую оказывают влияние многие факторы, например питание планктонных беспозвоночных и скорость осаждения клеток. Все эти особенности необходимо учитывать при оценке пигментного состава донных осадков и изучении спектров их поглощения [3].

Развивающийся в толще водоема фитопланктон образует на дне осадок, содержание пигментов в котором прямо пропорционально размеру формирующей его водорослевой культуры и остается относительно постоянным в течение длительного периода. Содержание пигментов в отдельных слоях донных отложений также может быть показателем продуктивности водоема на протяжении долгого времени.

Фотосинтетические пигменты претерпевают химические изменения и в конечном итоге окисляются до бесцветных соединений. Эти изменения контролируются в водоеме различными физическими, химическими и биотическими факторами. Содержание пигментов в осадочном слое будет зависеть от условий, преобладавших в водоеме, когда образовался осадок¹.

¹Reuss N. Sediment pigments as biomarkers of environmental change : PhD thesis. Roskilde : Natl. Environ. Res. Inst., 2005. 33 p.



В литературе встречается информация, что захоронение осадка последующими слоями донного грунта приводит к замедлению разрушения пигментов [4; 5]. Отсутствие света, низкие температуры и недостаток кислорода являются основными факторами, способствующими сохранению пигментов в отложениях. Также на содержание пигментов в живых популяциях водорослей оказывают влияние факторы окружающей среды.

Пигментный состав взвешенного в воде вещества и донных отложений в водоемах – интегральный показатель, отражающий как современное состояние водоема, так и широкий спектр различных воздействий на водные экосистемы (эвтрофирование, ацидификация, климатические изменения, практика землепользования и т. д.) [2].

Растительные пигменты – природные индикаторы, которые мигрируют в составе органического вещества в экосистеме. По изменению содержания отдельных пигментов судят не только о сукцессиях альгоценозов и факторах их формирования, но и об эволюции экосистем разного типа [3; 6]. По содержанию седиментационных пигментов в толще грунтов можно восстановить картину долговременных изменений продуктивности фитопланктона в зависимости от антропогенных и климатических факторов [2].

Пигментные индексы для индикации состояния водных экосистем на сегодняшний день применяются достаточно редко, и в литературе содержится очень мало подобных сведений и методических рекомендаций, что усложняет возможность получить достоверные значения и провести их детальный анализ. Однако некоторые наработки позволяют использовать особенности спектра поглощения пигментов для оценки важных показателей развития сообществ продуцентов в водоемах. В частности, в коротковолновой области спектра поглощения установлено отличие синезеленых водорослей (цианобактерий) от других групп и на основе этого разработан способ оценки качества воды по пигментному индексу E_{450}/E_{480} [2]. Показано, что индекс дает неплохие результаты и показывает тесную и значимую связь со структурными характеристиками фитопланктона, в том числе при применении на водоемах и водотоках Беларуси [7; 8].

В рамках настоящего исследования было прослежено изменение физико-химических параметров, содержания хлорофилла *a* и продуктов его распада, а также других пигментных показателей в донных отложениях оз. Баторино.

Баторино – полимиктический водоем с очень высокой степенью водообмена, являющийся начальным звеном в цепи трех связанных между собой протоками Нарочанских озер. Площадь зеркала составляет 6,25 км², длина – 3,5 км, средняя ширина – 1,7 км, средняя глубина – 2,4 м, длина береговой линии – 15 км, объем воды – 18,7 млн м³, площадь водосбора – 92,5 км², время полного водообмена – 1 год, мелководье песчано-илистое. Озеро является водоприемником мелиоративных систем. Трофический статус водоема – эвтрофный [9].

Материалы и методы исследования

Сбор материала проводили в середине мая 2020 г. Для отбора колонок донных отложений использовали дночерпатель Uwitec Corer (Австрия). Всего в оз. Баторино было отобрано 38 проб на 4 станциях, расположенных по трансекте на глубинах от 1,0 до 4,5 м. Колонки донных отложений (около 30 см) разделяли с шагом 5 см на 5–6 горизонтов, что позволило исследовать характер изменения показателей донных отложений не только по глубинам отбора проб, но и в вертикальном распределении.

Для экстракции пигментов из навесок донных отложений применяли 90 % ацетон² [10; 11]. Собранные образцы грунта перемешивали до однородной массы, из которой отбирали навеску для анализа содержания хлорофилла *a* (суммарного, без поправки на присутствие в смеси других пигментов) и продуктов его разложения [12], а также каротиноидов [13]. Оставшуюся часть пробы использовали для определения плотности и влажности донных отложений. В зависимости от типа грунта исходная влажная масса исследованной навески колебалась от 3,0 до 4,5 г. Навеску грунта отмеряли на электронных весах SPU 202 (США), помещали в пробирки и заливали раствором ацетона, тщательно перемешивали и оставляли на несколько часов для экстракции в темном прохладном месте. Далее пробирки центрифугировали дважды по 15 мин при 5000 об/мин с использованием центрифуги Sigma 1-6 (Германия), полученный экстракт осторожно переносили в стеклянные пробирки, измерения на спектрофотометре Cary 50 (США) проводили в 2-сантиметровых кварцевых кюветах.

Для определения содержания хлорофилла *a* и феопигментов в общем экстракте применяли спектрофотометрический метод³ (приложение *ADL Shell*) [12]. Одновременно с определением концентрации

² Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла *a* : ГОСТ 17.1.04.02.90. Введ. 01.01.1990. М., 2009.

³ Там же.



хлорофилла и его дериватов было рассчитано содержание каротиноидов по стандартной формуле [14]. Также в донных отложениях общепринятыми методами определяли плотность осадка естественной влажности (в граммах на кубический сантиметр) и относительную влажность – отношение удаляемой при сушке воды к единице массы осадка естественной влажности (в процентах) [15].

При обработке количественных данных использовали статистические методы с применением персонального компьютера и программных пакетов *Microsoft Excel* и *Statistica Trial 13*. В таблицах и по тексту приведены рассчитанные средние значения со стандартным отклонением ($\pm SD$). Для изучения взаимозависимости исследованных параметров проводили корреляционный анализ (r) по Пирсону, связь считали статистически значимой при $p \leq 0,05$ [16].

Результаты и их обсуждение

Изучение базовых физико-химических свойств донных отложений оз. Баторино показало, что на мелководных участках на исследованных станциях донные грунты представлены заиленным песком и илами.

Основные данные по содержанию растительных пигментов в донных отложениях и их распределение по глубинам отбора проб в оз. Баторино, а также анализ данных по относительной влажности и плотности седиментов приведены в табл. 1.

В образцах донных отложений оз. Баторино суммарное содержание хлорофилла a и продуктов его распада в среднем составило $12,7 \pm 10,2$ мкг/г сырой массы донных грунтов при колебаниях от 2,5 до 33,5 мкг/г, содержание каротиноидов – $10,24 \pm 4,89$ мкг/г сырой массы донных отложений при колебаниях от 0,56 до 23,07 мкг/г. Доля феопигментов в суммарном пуле была высокой во всех пробах, хотя на мелководных станциях не достигала 50 %. В целом данный показатель для донных отложений озера изменялся от 39 до практически 100 %, составив в среднем $72,4 \pm 19,6$ %.

Таблица 1

Физико-химические свойства донных отложений
оз. Баторино и содержание в них растительных пигментов

Table 1

The physicochemical properties of the bottom sediments
of Batorino Lake and the content of plant pigments in them

Глубина станции, м	Слой колонки, см	Плотность, г/см ³	Относительная влажность, %	Содержание суммарного хлорофилла, мкг/г ($C_{\text{хл}}$)	Доля феопигментов в суммарном хлорофилле, %	Содержание каротиноидов, мкг/г ($C_{\text{к}}$)	$C_{\text{к}}/C_{\text{хл}}$
1,0	0–5	1,31	64,13	6,45	–	4,76	0,74
	0–5			6,98	42,6	4,93	0,71
	5–10	1,59	36,40	18,11	40,3	12,42	0,69
	5–10			18,34	38,5	12,06	0,66
2,0	0–5	1,15	95,45	26,57	49,4	17,09	0,64
	0–5			24,83	53,2	13,91	0,56
	5–10	1,16	94,59	30,39	47,0	23,07	0,76
	5–10			27,40	54,9	16,74	0,61
	10–15	1,12	95,07	28,80	48,8	15,81	0,55
	10–15			26,25	64,5	11,35	0,43
	15–20	1,19	94,03	33,53	47,8	16,63	0,50
	15–20			26,82	64,3	15,71	0,59
	20–25	1,13	93,85	21,72	68,9	11,65	0,54
	20–25			28,78	90,8	17,15	0,60
	25–30	1,23	93,07	21,53	77,7	17,79	0,83
	25–30			15,79	70,8	11,92	0,75



Окончание табл. 1
Ending table 1

Глубина станции, м	Слой колонки, см	Плотность, г/см ³	Относительная влажность, %	Содержание суммарного хлорофилла, мкг/г (C _{хл})	Доля феопигментов в суммарном хлорофилле, %	Содержание каротиноидов, мкг/г (C _к)	C _к /C _{хл}
3,0	0–5	1,09	95,83	7,23	69,8	6,84	0,95
	0–5			4,72	≈100,0	5,13	1,09
	5–10	1,17	95,02	2,68	86,0	3,04	1,13
	5–10			4,45	66,9	6,21	1,39
	10–15	1,18	92,66	4,67	84,6	8,10	1,74
	10–15			4,49	93,2	7,39	1,64
	15–20	1,04	93,10	4,31	≈100,0	10,32	2,39
	15–20			3,28	96,4	7,56	2,31
	20–25	1,02	94,75	3,93	≈100,0	8,43	2,14
	20–25			3,45	95,9	7,27	2,11
4,5	0–5	1,01	94,61	9,23	69,9	8,41	0,91
	0–5			9,03	58,5	8,89	0,98
	5–10	1,20	93,43	10,09	55,0	14,03	1,39
	5–10			9,33	68,6	10,08	1,08
	10–15	1,09	91,93	3,75	67,7	5,56	1,48
	10–15			5,13	57,7	0,56	0,11
	15–20	1,01	89,83	11,93	77,9	12,28	1,03
	15–20			6,42	70,6	10,36	1,61
	20–30	1,03	82,50	3,30	87,2	7,65	2,32
	20–30			2,57	94,2	5,42	2,11
	30–40	1,18	76,07	2,93	97,8	6,93	2,36
	30–40			2,47	94,1	5,85	2,37

Относительная влажность донных отложений колебалась в широких пределах – от 36,4 до 95,8 %, значения плотности донных грунтов показали небольшой размах колебаний – от 1,01 до 1,59 г/см³. В среднем для исследованных станций озера эти параметры составили $87,7 \pm 14,8$ % и $1,15 \pm 0,14$ г/см³ соответственно.

Пигментный состав донных отложений дает интегральную характеристику состояния водных экосистем в период, предшествующий исследованию. Для оз. Баторино были рассчитаны пигментные индексы состояния первичных продуцентов (табл. 2 и 3) [7; 17; 18]. В табл. 2 приведены общие показатели для оз. Баторино, в табл. 3 – значения пигментных индексов для каждой станции отбора проб.

Таблица 2

**Вариабельность пигментных индексов состояния
первичных продуцентов в донных отложениях оз. Баторино**

Table 2

**The variability of pigment indices of the state
of primary producers in bottom sediments of Batorino Lake**

Показатели	E_{450}/E_{480}	E_{430}/E_{664}	E_{480}/E_{664}	E_{480}/E_{665}	E_{430}/E_{412}
Среднее значение	1,33	3,75	2,65	2,59	0,97
Медиана	1,32	3,35	2,17	2,13	0,96
Стандартное отклонение	0,12	1,14	1,31	1,28	0,06



Окончание табл. 2
Ending table 2

Показатели	E_{450}/E_{480}	E_{430}/E_{664}	E_{480}/E_{664}	E_{480}/E_{665}	E_{430}/E_{412}
25–75-й проценти	1,22–1,42	2,81–4,62	1,63–3,73	1,60–3,64	0,94–1,01
Минимум – максимум	1,17–1,55	2,32–6,32	1,09–5,56	1,06–5,40	0,86–1,10
Коэффициент вариации, %	9	30	49	49	6

Таблица 3

**Пигментные индексы состояния первичных продуцентов
в донных отложениях по станциям отбора проб**

Table 3

**The pigment indices of the state of primary producers
in bottom sediments by sampling stations**

Глубина станции, м	Слой колонки, см	E_{450}/E_{480}	E_{430}/E_{664}	E_{480}/E_{664}	E_{480}/E_{665}	E_{430}/E_{412}
1,0	0–5	1,43	3,26	1,90	1,88	1,02
	0–5	1,45	3,18	1,83	1,80	1,03
	5–10	1,41	2,80	1,62	1,60	1,04
	5–10	1,42	2,81	1,64	1,62	1,05
2,0	0–5	1,51	3,11	1,63	1,60	1,10
	0–5	1,46	2,65	1,42	1,40	1,04
	5–10	1,50	3,54	1,85	1,81	1,06
	5–10	1,55	3,14	1,55	1,52	1,05
	10–15	1,51	2,80	1,38	1,34	1,01
	10–15	1,50	2,32	1,09	1,06	0,92
	15–20	1,53	2,67	1,27	1,23	1,03
	15–20	1,40	2,58	1,42	1,38	0,90
	20–25	1,41	2,47	1,32	1,28	0,87
	20–25	1,37	2,62	1,48	1,44	0,87
	25–30	1,29	2,96	1,93	1,89	0,87
	25–30	1,30	2,80	1,78	1,73	0,86
3,0	0–5	1,36	3,53	2,25	2,19	0,94
	0–5	1,25	2,98	2,17	2,13	0,96
	5–10	1,41	4,15	2,55	2,47	0,96
	5–10	1,32	3,25	2,17	2,12	0,95
	10–15	1,22	4,90	3,94	3,85	0,95
	10–15	1,24	4,56	3,48	3,40	0,93
	15–20	1,17	5,59	4,81	4,72	0,95
	15–20	1,17	6,32	5,56	5,40	0,97
	20–25	1,22	5,36	4,34	4,25	0,90
	20–25	1,19	6,16	5,29	5,19	0,95



Окончание табл. 3
Ending table 3

Глубина станции, м	Слой колонки, см	E_{450}/E_{480}	E_{430}/E_{664}	E_{480}/E_{664}	E_{480}/E_{665}	E_{430}/E_{412}
4,5	0–5	1,33	3,02	1,96	1,92	0,95
	0–5	1,34	3,13	2,01	1,97	0,94
	5–10	1,24	3,51	2,65	2,59	1,01
	5–10	1,28	3,60	2,56	2,50	0,98
	10–15	1,26	4,73	3,67	3,57	1,00
	10–15	1,32	3,52	2,43	2,37	1,01
	15–20	1,33	3,45	2,28	2,22	0,92
	15–20	1,21	3,91	3,14	3,06	1,01
	20–30	1,18	4,58	3,97	3,92	0,96
	20–30	1,18	5,21	4,48	4,39	0,94
	30–40	1,18	5,66	4,91	4,80	0,96
	30–40	1,18	5,69	4,95	4,87	0,97

Для исследованных образцов донных отложений значение индекса E_{450}/E_{480} практически везде было больше 1,2 (1,17–1,55), что свидетельствует о доминировании пигментов зеленых и диатомовых водорослей. Средние и медианные значения индекса E_{450}/E_{480} оказались очень близкими (1,33 и 1,32 соответственно) в общей выборке. Коэффициент вариации данного индекса для оз. Баторино был небольшим (9 %).

В исследованных образцах донных отложений озера индекс E_{430}/E_{664} изменялся от 2,3 до 6,3, что характерно для нормально функционирующего фитопланктона. Коэффициент вариации был больше по сравнению с предыдущим индексом и составил около 30 %.

Индекс E_{480}/E_{664} отражает баланс хлорофилла и каротиноидов в сообществе планктонных продуцентов водной экосистемы. В неблагоприятных условиях соотношение меняется в пользу каротиноидов. В наших образцах отмечены невысокие значения индекса, а коэффициент вариации достигал 50 %. Значения индекса E_{430}/E_{664} на всех исследованных станциях были в 1,5–2,0 раза выше, чем значения индекса E_{480}/E_{664} . Полученные величины и соотношения пигментных индексов хорошо сопоставимы с данными, полученными нами в 2018 г. для литоральных станций оз. Баторино [19].

В табл. 3 величины индексов E_{480}/E_{664} и E_{480}/E_{665} практически идентичны, поэтому для дальнейших исследований целесообразно оставить только один из них.

Для контроля чистоты экстракта пигментов и правильности прописывания спектра светопоглощения были рассчитаны дополнительные индексы, представленные в табл. 4 и 5 [17; 18].

Таблица 4

Вариабельность индексов чистоты экстракта пигментов в донных отложениях оз. Баторино

Table 4

The variability of the indices of the purity of pigment extract in the bottom sediments of Batorino Lake

Показатели	E_{664}/E_{720}	E_{430}/E_{720}	E_{412}/E_{720}	E_{530}/E_{720}	E_{430}/E_{530}	E_{664}/E_{530}	E_{412}/E_{664}
Среднее значение	22,29	73,23	75,54	8,76	7,82	2,36	3,89
Медиана	18,41	70,55	70,40	8,96	7,68	2,17	3,41
Стандартное отклонение	16,81	44,75	46,58	4,37	2,18	1,12	1,23
25–75-й проценти	6,81–35,80	35,54–104,87	37,15–106,70	5,48–10,78	5,85–9,77	1,23–3,41	2,95–4,81
Минимум – максимум	3,19–76,90	10,19–189,70	10,60–217,50	2,33–19,60	4,38–12,17	0,96–4,47	2,53–6,53
Коэффициент вариации, %	75	61	62	50	28	47	32



Таблица 5

Пигментные индексы контроля чистоты
экстракта донных отложений оз. Баторино

Table 5

The pigment indices for monitoring the purity
of the bottom sediment extract from Batorino Lake

Глубина станции, м	Слой колонки, см	E_{664}/E_{720}	E_{430}/E_{720}	E_{412}/E_{720}	E_{530}/E_{720}	E_{430}/E_{530}	E_{664}/E_{530}	E_{412}/E_{664}
1,0	0–5	47,00	153,00	150,17	14,83	10,31	3,17	3,20
	0–5	38,56	122,56	119,11	12,22	10,03	3,15	3,09
	5–10	40,20	112,53	107,80	12,00	9,38	3,35	2,68
	5–10	44,54	125,31	119,77	12,46	10,06	3,57	2,69
2,0	0–5	37,61	117,00	106,11	9,61	12,17	3,91	2,82
	0–5	35,10	93,00	89,00	8,75	10,63	4,01	2,54
	5–10	21,53	76,30	71,81	6,77	11,28	3,18	3,33
	5–10	30,81	96,77	91,73	8,58	11,28	3,59	2,98
	10–15	15,85	44,32	43,77	5,08	8,72	3,12	2,76
	10–15	46,11	107,16	116,47	10,32	10,39	4,47	2,53
	15–20	37,92	101,08	98,27	9,19	11,00	4,13	2,59
	15–20	35,20	90,88	100,72	9,72	9,35	3,62	2,86
	20–25	76,90	189,70	217,50	19,60	9,68	3,92	2,83
	20–25	37,85	99,12	113,69	10,35	9,58	3,66	3,00
	25–30	28,16	83,40	95,64	9,92	8,41	2,84	3,40
	25–30	26,16	73,16	85,12	9,16	7,99	2,86	3,25
3,0	0–5	15,29	53,94	57,18	6,94	7,77	2,20	3,74
	0–5	3,42	10,19	10,60	2,33	4,38	1,47	3,10
	5–10	10,40	43,20	45,20	6,33	6,82	1,64	4,35
	5–10	4,32	14,05	14,77	2,80	5,02	1,54	3,42
	10–15	12,76	62,59	66,00	9,88	6,33	1,29	5,17
	10–15	8,15	37,19	40,19	6,62	5,62	1,23	4,93
	15–20*	6,93	38,71	40,79	7,11	5,45	0,97	5,89
	15–20*	10,38	65,62	67,85	10,77	6,09	0,96	6,53
	20–25	13,36	71,64	79,27	10,82	6,62	1,24	5,93
	20–25	21,60	133,00	140,40	19,00	7,00	1,14	6,50
4,5	0–5	6,15	18,58	19,63	3,17	5,87	1,94	3,19
	0–5	9,43	29,52	31,43	4,43	6,67	2,13	3,33
	5–10	4,54	15,91	15,78	3,12	5,10	1,46	3,48
	5–10	28,89	104,11	106,33	12,78	8,15	2,26	3,68
	10–15	30,00	142,00	141,40	18,20	7,80	1,65	4,71
	10–15	19,73	69,45	69,00	9,27	7,49	2,13	3,50
	15–20	17,08	58,88	64,25	7,75	7,60	2,20	3,76
	15–20	3,73	14,57	14,38	3,19	4,57	1,17	3,86
	20–30	3,19	14,62	15,23	2,77	5,28	1,15	4,77
	20–30	6,27	32,67	34,60	5,53	5,90	1,13	5,52
	30–40	6,45	36,50	38,00	6,30	5,79	1,02	5,89
	30–40	5,36	30,50	31,55	5,32	5,74	1,01	5,88

*Малоприменяемые для дальнейшего анализа и расчета пигментных индексов образцы.



Для индексов контроля чистоты экстракта отмечается более высокий коэффициент вариации, достигающий 75 % (E_{664}/E_{720}). Согласно полученным данным индекс E_{530}/E_{720} в среднем составил 8,8 при колебаниях в диапазоне 2–20.

Значения индексов E_{430}/E_{530} и E_{664}/E_{530} должны быть больше единицы и меньше величин индексов E_{664}/E_{720} , E_{430}/E_{720} соответственно. Проанализировав спектры донных отложений, можно сделать следующее заключение: максимальное светопоглощение отмечено на длине волны 412 нм, на что указывает и индекс E_{412}/E_{720} , значения которого несколько больше в сравнении с индексом E_{430}/E_{720} . Это подтверждает данные о высоком содержании в донных отложениях феопигментов, имеющих в сравнении с хлорофиллом максимум поглощения, сдвинутый в более коротковолновую область синей части спектра.

Анализ приведенных в табл. 4 и 5 индексов доказывает достоверность нижних пороговых значений, позволяющих отбраковывать плохо прописанные спектры по критериям контроля чистоты экстракта. Так, для донных отложений предложены следующие нижние пороговые пределы пригодности пробы для анализа: индекс $E_{664}/E_{720} - 2$; E_{430}/E_{720} и $E_{412}/E_{720} - 5$; $E_{530}/E_{720} - 1$; $E_{430}/E_{530} - 3$; $E_{664}/E_{530} - 1,2$; $E_{412}/E_{664} - 2$ [7; 8; 17; 18]. Верхний порог не должен превышать 100 (что бывает характерно для экстрактов проб, полученных из планктона). В донных отложениях верхняя граница возрастает, что прослеживается по данным, приведенным в табл. 5.

После детального анализа спектров поглощения экстрактов пигментов донных отложений оз. Баторино некоторые образцы (отмечены звездочкой в табл. 5) оказались малопригодными для дальнейшего анализа и расчета пигментных индексов (например, там, где значение индекса E_{664}/E_{530} оказалось меньше единицы).

Таким образом, в результате проведенной работы были проанализированы спектры поглощения в диапазоне длин волн 350–800 нм для колонок донных отложений оз. Баторино, отобранных на глубинах 1,0–4,5 м.

В целях выявления связи между рассчитанными индексами и глубиной залегания слоя в колонках донных отложений был проведен корреляционный анализ. Связь между индексами состояния первичных продуцентов E_{450}/E_{480} и E_{430}/E_{412} и глубиной залегания слоя донных отложений не прослеживалась. Связь отмечена между индексами E_{480}/E_{664} , E_{430}/E_{664} и глубиной сбора проб, что указывает на синхронность изменения пигментного состава производных хлорофилла по глубинам. Согласно полученным данным (см. табл. 3) до глубины 2 м (и горизонта 10–15 см в колонках) в донных осадках прослеживается четкая тенденция к более низким значениям вышеуказанных индексов, далее с увеличением глубины слоя наблюдается рост их значений.

Отношение общих каротиноидов к хлорофиллу a (C_k/C_{chl}) может служить показателем физиологического состояния клеток фитопланктона [20]. Каротиноиды – более стабильный компонент пигментной системы, чем хлорофилл, поэтому при старении популяции фитопланктона и неблагоприятных воздействиях факторов среды, которые способствуют деструкции хлорофилла, величина отношения C_k/C_{chl} возрастает. Содержание каротиноидов и их отношение к хлорофиллу также могут быть следствием изменения фитопланктона или его адаптации к качественному составу света. При разных условиях отношение C_k/C_{chl} колеблется в широких пределах. Однако среднее его значение для отдельных видов водорослей пресноводного фитопланктона варьирует слабо (0,28–0,40) [20]. Согласно нашим данным, полученным при обработке донных отложений оз. Баторино, отношение C_k/C_{chl} изменялось в пределах 0,11–2,39 при среднем значении $1,18 \pm 0,67$ (см. табл. 1). Высокие величины C_k/C_{chl} (больше единицы) объясняются тем, что в бескислородных условиях с увеличением глубины залегания слоя донных отложений каротиноиды разрушаются медленнее, чем хлорофилл и его производные [21].

В качестве показателя пигментного разнообразия планктонного сообщества был рассчитан индекс E_{430}/E_{664} (см. табл. 2 и 3), который, в отличие от C_k/C_{chl} , отражает количественное соотношение между суммой общих каротиноидов и хлорофилла a и собственно хлорофиллом a . Для нормально функционирующего фитопланктона этот индекс равен 1,25–4,00 [20]. По нашим наблюдениям, характер изменения данного пигментного индекса в донных отложениях оз. Баторино хорошо коррелировал с динамикой отношения C_k/C_{chl} (рис. 1). Значения E_{430}/E_{664} варьировали в границах 2–6 (см. табл. 2 и 3). Наибольшие величины пигментного индекса объясняются присутствием значительного количества растительного детрита, так как пик оптической плотности экстрактов из детритных пигментов слабее выражен на длине волны 664 нм. Обратную связь между индексом E_{430}/E_{664} и количеством хлорофилла a на разных глубинах донных отложений также удалось установить (рис. 2). Коэффициент корреляции r , равный $-0,7$ ($n = 38$), подтверждает сильную отрицательную связь.

Таким образом, изучение пигментных индексов и отношения C_k/C_{chl} вносит полезный вклад в разработку оптимальных показателей экспресс-оценки эффективности функционирования фитопланктона и оценки его видового состава в экосистеме водоема.

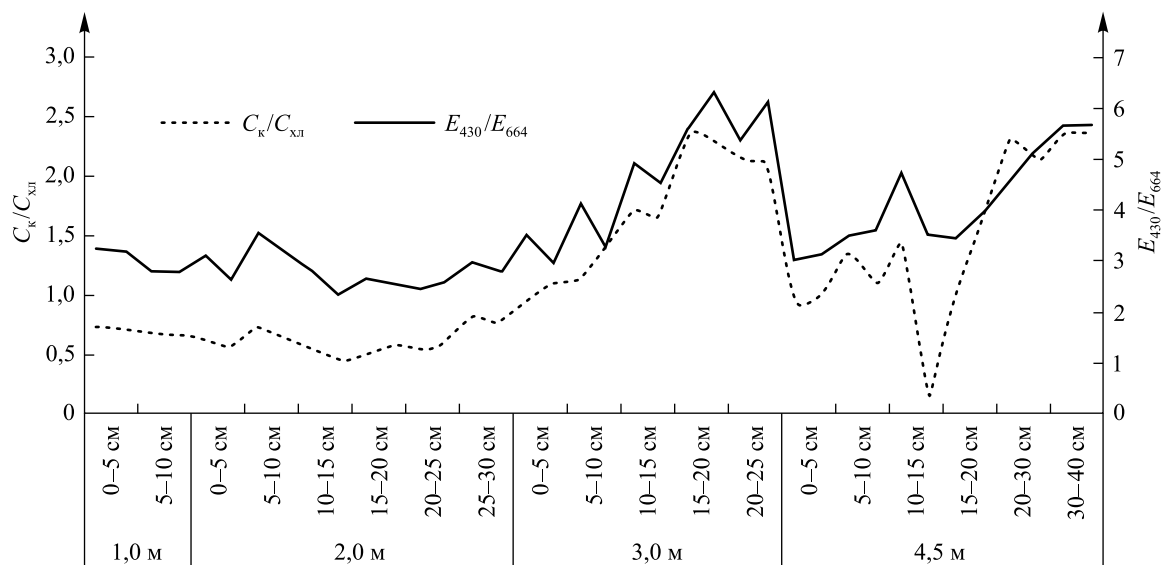


Рис. 1. Соотношение между концентрациями общих каротиноидов и хлорофилла a (C_k/C_{chl}) и пигментный индекс E_{430}/E_{664} для донных отложений оз. Баторино на разных глубинах

Fig. 1. The ratio between the concentrations of total carotenoids and chlorophyll a (C_k/C_{chl}) and the pigment index E_{430}/E_{664} for bottom sediments of Batorino Lake at different depths

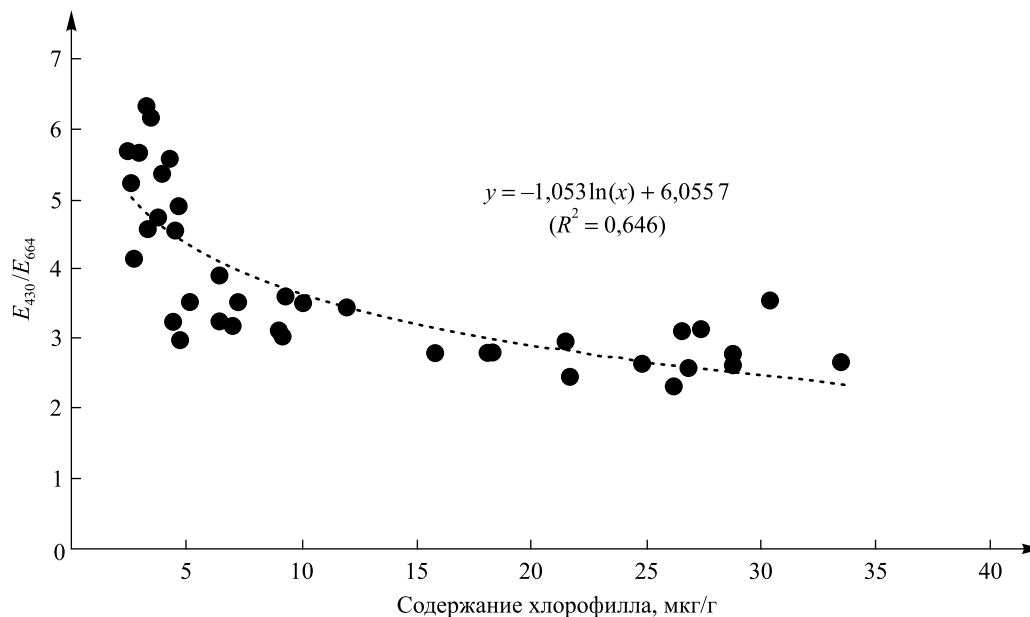


Рис. 2. Соотношение между пигментным индексом E_{430}/E_{664} и содержанием хлорофилла a для донных отложений оз. Баторино

Fig. 2. The ratio between the pigment index E_{430}/E_{664} and the chlorophyll a content for bottom sediments of Batorino Lake

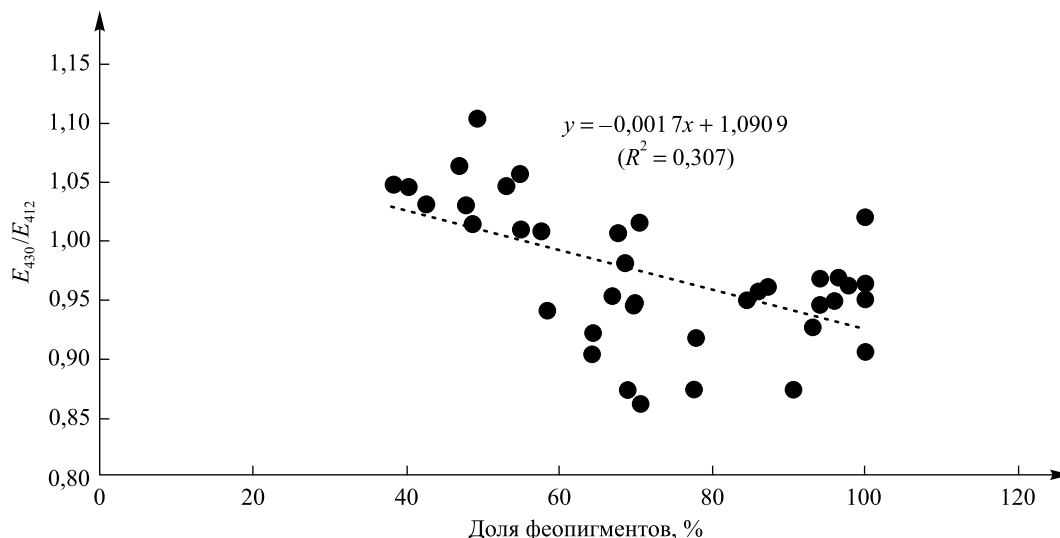


Рис. 3. Связь индекса E_{430}/E_{412} с долей феопигментов в донных отложениях оз. Баторино

Fig. 3. The relationship between the E_{430}/E_{412} index and the proportion of pheopigments in the bottom sediments of Batorino Lake

Значения индекса E_{430}/E_{412} , полученные для донных отложений оз. Баторино, колебались от 0,82 до 1,10, свидетельствуя, что в большей части проб хлорофилл находился в основном в деградированном состоянии (см. табл. 2 и 3). На рис. 3 показана связь между значением индекса E_{430}/E_{412} и долей феопигментов. Коэффициент корреляции r равен $-0,56$ ($n = 38$).

Примечательно, что, как и ранее показано в наших работах [7; 17; 18], медианная доля феопигментов в пробе соответствует значению индекса, равному 1, что можно использовать для экспресс-анализа степени деградации хлорофилла в пробе (если $E_{430}/E_{412} < 1$, то доля феопигментов составляет менее 50 %).

Закключение

В исследованных пробах донных отложений оз. Баторино суммарное содержание хлорофилла *a* и продуктов его распада за период исследования в среднем составило $12,7 \pm 10,2$ мкг/г сырой массы донных грунтов, содержание каротиноидов – $10,24 \pm 4,89$ мкг/г сырой массы донных отложений. Доля феопигментов в суммарном пуле была высокой во всех пробах, хотя на мелководных станциях не достигала 50 %, составив в среднем для донных отложений озера $72,4 \pm 19,6$ %. Относительная влажность и значения плотности донных грунтов в среднем составили $87,7 \pm 14,8$ % и $1,15 \pm 0,14$ г/см³ соответственно. Отношение $C_k/C_{хл}$ изменялось в пределах 0,11–2,39 при среднем значении $1,18 \pm 0,67$.

Таким образом, была проведена работа по расчету пигментных индексов для донных отложений оз. Баторино и оценке их значимости. Анализ пигментных индексов, отражающих физиологическое состояние фитопланктона, показал, что более информативными для работы с донными отложениями являются следующие индексы: E_{450}/E_{480} , E_{480}/E_{664} , E_{430}/E_{664} , E_{430}/E_{412} . Предложены дополнительные индексы контроля чистоты экстракта, которые могут быть использованы в качестве критериев качества исследуемых проб и их пригодности для детального анализа спектров поглощения.

Библиографические ссылки

1. Cyr H. How does the vertical distribution of chlorophyll vary in littoral sediments of small lakes? *Freshwater Biology*. 1998; 40(1):25–40. DOI: 10.1046/j.1365-2427.1998.00319.x.
2. Сигарева ЛЕ. *Хлорофилл в донных отложениях волжских водоемов*. Москва: КМК; 2012. 224 с.
3. Leavitt PR, Hodgson DA. Sedimentary pigments. In: Smol JP, Birks HJB, Last WM, Bradley RS, Alverson K, editors. *Tracking environmental change using lake sediments. Terrestrial, algal, and siliceous indicators*. Dordrecht: Springer; 2002. p. 295–325. (Developments in paleoenvironmental research; volume 3). DOI: 10.1007/0-306-47668-1_15.
4. Buchaca T, Catalan J. Factors influencing the variability of pigments in the surface sediments of mountain lakes. *Freshwater Biology*. 2007;52(7):1365–1379. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2007.01774.x.
5. Villanueva J, Hastings DW. A century-scale record of the preservation of chlorophyll and its transformation products in anoxic sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2000;64(13):2281–2294. DOI: 10.1016/S0016-7037(99)00428-7.
6. Paerl HW, Valdes LM, Pinckney JL, Piehler MF, Dyble J, Moisander PH. Phytoplankton photopigments as indicators of estuarine and coastal eutrophication. *BioScience*. 2003;53(10):953–964. DOI: 10.1641/0006-3568(2003)053[0953:PPAIOE]2.0.CO;2.



7. Смольская ОС, Жукова АА, Адамович БВ. Спектральные характеристики автотрофной компоненты взвешенного вещества в озерах Национального парка «Нарочанский». *Доклады Национальной академии наук Беларуси*. 2019;63(3):325–330.
8. Михеева ТМ, Смольская ОС, Савич ИВ, Жукова АА. Связь спектральных характеристик пигментного состава и структурных показателей фитопланктона р. Свислочь. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*. 2018;4:42–51.
9. Аронов АГ, Аронова ТИ, Власов БП, Ежова ОС, Жукова ТВ, Ковалевская РЗ и др. *Водные ресурсы Национального парка «Нарочанский»*. Люштык ВС, Жукова ТВ, редакторы. Минск: Рифтур Принт; 2012. 128 с.
10. Ritchie RJ. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*. 2008;46(1):115–126. DOI: 10.1007/s11099-008-0019-7.
11. Sumanta N, Haque CI, Nishika J, Suprakash R. Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Research Journal of Chemical Sciences*. 2014;4(9):63–69.
12. Lorenzen CJ. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*. 1967;12(2):343–346. DOI: 10.4319/lo.1967.12.2.0343.
13. Strickland JDH, Parsons TR. *A practical handbook of seawater analysis*. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada; 1972. 310 p.
14. Винберг ГГ. *Первичная продукция водоемов*. Минск: Издательство АН БССР; 1960. 330 с.
15. Жукова АА. Продукционно-деструкционные показатели микрофитобентоса оз. Нарочь. В: Рухленко ИА, редактор. *Татищевские чтения: актуальные проблемы экологии и окружающей среды. Материалы 7-й Международной научно-практической конференции; 15–18 апреля 2010 г.; Тольятти, Россия*. Тольятти: Волжский университет им. В. Н. Татищева; 2010. с. 50–57.
16. Мастицкий СЭ. *Методическое пособие по использованию программы Statistica при обработке данных биологических исследований*. Минск: Институт рыбного хозяйства; 2009. 76 с.
17. Смольская ОС, Жукова АА. Спектральные пигментные индексы фитопланктона в разнотипных водных объектах Беларуси. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*. 2018;1:113–123.
18. Смольская ОС, Жукова АА, Люля АС. Пигментные и физико-химические характеристики донных отложений озер Нарочь и Мястро. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2018;2:65–77.
19. Смольская ОС, Жукова АА. Содержание растительных пигментов в донных отложениях озер Нарочь, Мястро и Баторино. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*. 2020;2:18–25.
20. Бульон ВВ. *Первичная продукция планктона внутренних водоемов*. Ленинград: Наука; 1983. 150 с.
21. Swain EB. Measurement and interpretation of sedimentary pigments. *Freshwater Biology*. 1985;15(1):53–75. DOI: 10.1111/j.1365-2427.1985.tb00696.x.

References

1. Cyr H. How does the vertical distribution of chlorophyll vary in littoral sediments of small lakes? *Freshwater Biology*. 1998;40(1):25–40. DOI: 10.1046/j.1365-2427.1998.00319.x.
2. Sigareva LE. *Khlorofil v donnykh otlozheniyakh volzhskikh vodoyemov* [Chlorophyll in bottom sediments of the Volga reservoirs]. Moscow: KMK; 2012. 224 p. Russian.
3. Leavitt PR, Hodgson DA. Sedimentary pigments. In: Smol JP, Birks HJB, Last WM, Bradley RS, Alverson K, editors. *Tracking environmental change using lake sediments. Terrestrial, algal, and siliceous indicators*. Dordrecht: Springer; 2002. p. 295–325. (Developments in paleoenvironmental research; volume 3). DOI: 10.1007/0-306-47668-1_15.
4. Buchaca T, Catalan J. Factors influencing the variability of pigments in the surface sediments of mountain lakes. *Freshwater Biology*. 2007;52(7):1365–1379. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2007.01774.x.
5. Villanueva J, Hastings DW. A century-scale record of the preservation of chlorophyll and its transformation products in anoxic sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2000;64(13):2281–2294. DOI: 10.1016/S0016-7037(99)00428-7.
6. Paerl HW, Valdes LM, Pinckney JL, Piehler MF, Dyble J, Moisaner PH. Phytoplankton photopigments as indicators of estuarine and coastal eutrophication. *BioScience*. 2003;53(10):953–964. DOI: 10.1641/0006-3568(2003)053[0953:PPAIOE]2.0.CO;2.
7. Smolskaya OS, Zhukova AA, Adamovich BV. [Spectral characteristics of the autotrophic component of suspended matter in the lakes of the National Park «Narochansky»]. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi*. 2019;63(3):325–330. Russian.
8. Mikheeva TM, Smolskaya VS, Savich IV, Zhukava HA. Coupling of spectral characteristics of pigmental composition and structural indicators of phytoplankton in Svisloch River. *Journal of the Belarusian State University. Ecology*. 2018;4:42–51. Russian.
9. Aronov AG, Aronova TI, Vlasov BP, Ezhova OS, Zhukova TV, Kovalevskaya RZ, et al. *Vodnye resursy Natsional'nogo parka «Narochanskii»* [Water resources of the National Park «Narochansky»]. Минск: Rifting Print; 2012. 128 p. Russian.
10. Ritchie RJ. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*. 2008;46(1):115–126. DOI: 10.1007/s11099-008-0019-7.
11. Sumanta N, Haque CI, Nishika J, Suprakash R. Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Research Journal of Chemical Sciences*. 2014;4(9):63–69.
12. Lorenzen CJ. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*. 1967;12(2):343–346. DOI: 10.4319/lo.1967.12.2.0343.
13. Strickland JDH, Parsons TR. *A practical handbook of seawater analysis*. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada; 1972. 310 p.
14. Vinberg GG. *Pervichnaya produktsiya vodoemov* [Primary production of reservoirs]. Минск: Publishing House of the Academy of Sciences of the USSR; 1960. 330 p. Russian.
15. Zhukova AA. [Production and destruction indicators of microphytobenthos of Naroch Lake]. In: Rukhlenko IA, editor. *Tatishchevskie chteniya: aktual'nye problemy ekologii i okruzhayushchei sredy. Materialy 7-i Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 15–18 aprelya 2010 g.; Tol'yatti, Rossiya* [Tatishchev readings: actual problems of ecology and the environment. Materials of the 7th International scientific and practical conference; 2010 April 15–18; Togliatti, Russia]. Togliatti: Volzhsky University named after Tatishchev; 2010. p. 50–57. Russian.



16. Mastitskii SE. *Metodicheskoe posobie po ispol'zovaniyu programmy Statistica pri obrabotke dannykh biologicheskikh issledovaniy* [Methodological manual on the use of the Statistica program in the processing of biological research data]. Minsk: Institut rybnogo khozyaistva; 2009. 76 p. Russian.
17. Smolskaya OS, Zhukava HA. Spectral pigment indices of phytoplankton in different water objects of Belarus. *Journal of the Belarusian State University. Ecology*. 2018;1:113–123. Russian.
18. Smolskaya OS, Zhukava HA, Lyulya AS. Analysis of pigment, physical and chemical characteristics of bottom sediments in lakes Naroch and Myastro. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;2:65–77. Russian.
19. Smolskaya VS, Zhukava HA. The contents of plant pigments in bottom sediments of lakes Naroch, Myastro and Batorino. *Journal of the Belarusian State University. Ecology*. 2020;2:18–25. Russian.
20. Bul'on VV. *Pervichnaya produktsiya planktona vnutrennikh vodoemov* [Primary production of plankton of inland water bodies]. Leningrad: Nauka; 1983. 150 p. Russian.
21. Swain EB. Measurement and interpretation of sedimentary pigments. *Freshwater Biology*. 1985;15(1):53–75. DOI: 10.1111/j.1365-2427.1985.tb00696.x.

Получена 04.04.2021 / принята 12.05.2021.
Received 04.04.2021 / accepted 12.05.2021.

УДК 577.13

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЭМОДИНА НА РАСТЕНИЯ

А. И. КОХАНОВСКИЙ¹⁾, В. М. ЮРИН²⁾, Е. Ю. КОХАНОВСКАЯ³⁾

¹⁾Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2В, 220012, г. Минск, Беларусь

²⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

³⁾Белорусский государственный медицинский университет,
пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Беларусь

Эмодин, являющийся вторичным метаболитом многих растений, обладает широким спектром биологического действия на различные группы организмов, однако механизмы его воздействия на растения практически не изучены. Существует предположение, что эмодин может играть определенную роль в аллелопатии, попадая в почву с опавшими листьями. Цель исследования – установить влияние эmodина на ростовые процессы и гемсодержащие ферменты. Проведенные эксперименты показали, что он оказывает ингибирующий эффект на корневую систему *Allium sera*, а также способствует инициации каталазной активности в корнях, при этом *in vitro* активность фермента каталазы под действием эmodина снижается. Выявлен возможный механизм инактивации фермента – взаимодействие эmodина с гемом. Дальнейшая детализация биологического действия эmodина позволит расширить сферы его применения в защите растений, растениеводстве, а также определить роль данного соединения в экологии и физиологии растений.

Ключевые слова: эмодин; аллелопатия; вторичные метаболиты растений; *Frangula*; Rhamnaceae.

Образец цитирования:

Кохановский АИ, Юрин ВМ, Кохановская ЕЮ. Некоторые аспекты биологического действия эmodина на растения. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021;2:97–103.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-97-103>

For citation:

Kakhanouski AI, Yurin VM, Kakhanouskaya KYu. Some aspects of biological effect of emodin on plants. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;2:97–103. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-97-103>

Авторы:

Александр Иванович Кохановский – аспирант лаборатории прикладной биохимии отдела биохимии и биотехнологии растений. Научные руководители – кандидат биологических наук Е. В. Спиридович, В. М. Юрин.

Владимир Михайлович Юрин – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Екатерина Юрьевна Кохановская – ассистент кафедры общей химии факультета профориентации и довузовской подготовки.

Authors:

Aliaxandr I. Kakhanouski, postgraduate student at the laboratory of applied biochemistry, department of biochemistry and plant biotechnology.

a.kakhanouski@yandex.by

<https://orcid.org/0000-0002-5643-2254>

Vladimir M. Yurin, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of cell biology and plant bioengineering, faculty of biology.

yurin@bsu.by

Katsiaryna Yu. Kakhanouskaya, assistant at the department of general chemistry, faculty of career guidance and pre-university training.

e.kokhanovskaya@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-2298-1765>



SOME ASPECTS OF BIOLOGICAL EFFECT OF EMODIN ON PLANTS

A. I. KAKHANOUSKI^a, V. M. YURIN^b, K. Yu. KAKHANOUSKAYA^c

^aCentral Botanical Garden, National Academy of Sciences of Belarus,
2B Surhanava Street, Minsk 220012, Belarus

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

^cBelarusian State Medical University, 83 Dziaŕžynskaha Avenue, Minsk 220116, Belarus

Corresponding author: A. I. Kakhanouski (a.kakhanouski@yandex.by)

Emodin, a secondary metabolite of many plants, has a wide spectrum of biological action on various groups of organisms, but the mechanisms of its action on plants are practically not studied. There is an assumption that emodin plays a certain role in allelopathy, getting into the soil with fallen leaves in the form of glycosides, which break down into emodin aglycones and are stored in the ecosystem. The aim of the study was to establish the effects of emodin on growth processes and its effect on heme-containing enzymes. It was found that emodin has an inhibitory effect on the root system of *Allium cepa*, and also promotes the activation of catalase activity in the roots. When studying the direct action of emodin on the activity of the catalase enzyme *in vitro*, it was found that the activity of the catalase enzyme decreases under the action of emodin. When studying the possible mechanisms of inactivation, it was found that emodin can interact with heme. Further detailing of the patterns of biological action of emodin will expand the scope of its application in plant protection, crop production, and also determine its role in plant ecology and physiology.

Keywords: emodin; allelopathy; plant secondary metabolites; *Frangula*; Rhamnaceae.

Введение

Эмодин (6-метил-1,3,8-тригидроксиантрахинон) является вторичным метаболитом многих растений. В частности, это соединение в виде гликозидов обнаружено во всех органах представителей рода крушины (*Frangula*, Rhamnaceae), но у разных видов в разных соотношениях. Кора крушины содержит около 8 % антрахинонов, среди которых преобладают гликозиды эmodина [1, с. 85–87].

На лабораторных животных и культурах клеток млекопитающих достаточно хорошо исследовано биологическое действие эmodина, а именно его фармакологические и токсические эффекты. Так, по токсикологической номенклатуре эмодин – это среднетоксичное соединение, однако функции этого вещества для самого растения и его действие на другие растения мало изучены.

Поскольку эмодин обладает токсичностью, возникло предположение, что данный метаболит играет определенную роль в аллелопатии, так как попадает в почву с опавшими листьями в виде гликозидов. В результате физических и биологических процессов гликозиды распадаются на агликоны эmodина, которые стабильно сохраняются в экосистеме. Являясь активной формой, агликоны ингибируют рост проростков близлежащих растений. В ходе экспериментов было установлено, что эмодин подавлял рост проростков салата (*Lactuca sativa*), зеленого амаранта (*Amaranthus viridis*) и травы тимopheевки (*Phleum pratense*) [2]. Так, при концентрации 0,005 % эмодин сильно замедлял рост рассады салата, а при концентрации более 0,01 % ингибировал рост корней и hypocotyle. Эмодин в дозах 10–100 мг/л подавлял рост корней и побегов подсолнечника (*Helianthus annuus*) (LD₅₀ – 45 мг/л) и кукурузы (*Zea mays* var. *everte*) (LD₅₀ – 65 мг/л). Следует отметить, что эмодин оказывал влияние и на всхожесть семян. К примеру, после применения эmodина в дозах 50 и 100 мг/л всхожесть семян подсолнечника с 98 % снизилась до 76 и 55 % соответственно [3].

Согласно исследованию *in silico* [4] эмодин способен образовывать соединения не только с белками, но и с гемом. Таким образом, одним из возможных механизмов биологического действия эmodина может быть его взаимодействие с гемопротеинами, такими как цитохромы, пероксидазы, каталазы.

Несмотря на то что эмодин обладает широким спектром биологического действия на различные группы организмов, сами механизмы его воздействия на растения практически не изучены.

Цель исследования – установить биологическое действие эmodина на модельном организме луке репчатом (*Allium cepa*).

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали эмодин (code: 117755000, lot: A0348291, CAS: 518-82-1) компании *Acros Organics* (Бельгия). Спектры поглощения снимали на спектрофотометре Solar PV 1211 (Беларусь). Коэффициент молярного поглощения эmodина определяли в 0,2 моль/л фосфатном буферном растворе (ФБР) с pH 7,4.



Агликон эмодина практически нерастворим в воде, по этой причине приготовили коллоидный раствор эмодина методом химической конденсации. Для этого эмодин растворили в 0,1 моль/л гидроксиде натрия с образованием фенолята эмодина. Затем полученный раствор добавили в ФБР (рН 7,4) в соотношении 12 : 100, такое соотношение не приводит к сдвигу рН. В итоге гидроксид натрия нейтрализовался буферным раствором, а фенолят эмодина преобразовался в эмодин, который конденсировался с образованием коллоидного раствора с концентрацией эмодина $1,586 \cdot 10^{-4}$ моль/л. В данный раствор поместили часть пророщенных луковиц, контрольные луковицы погрузили в ФБР, интактные – в воду. Через 5 дней измерили массу корней по методике аллиум-теста [5].

Активность каталазы определяли методом Баха и Опарина [6, с. 44–47].

В качестве модельного гемопroteина использовали гемоглобин. В эксперименте к раствору гемоглобина с концентрацией $1,796 \cdot 10^{-4}$ моль/л последовательно добавляли раствор эмодина с концентрацией $1,586 \cdot 10^{-4}$ моль/л и снимали спектр поглощения.

Статистическую обработку результатов проводили в программе *Statistica 10*. Для прямой при определении коэффициента молярного поглощения был получен 99,83 % порог значимости. Различия между двумя независимыми выборками оценивали по непараметрическому критерию Манна – Уитни ($n = 3-6$ при $\alpha = 0,05$).

Результаты и их обсуждение

При изучении токсического действия веществ на модельном организме *Allium cepa* хорошим макропоказателем является прирост корневой системы, так как любое нарушение биологических функций клеток приводит к снижению прироста растений (рис. 1).

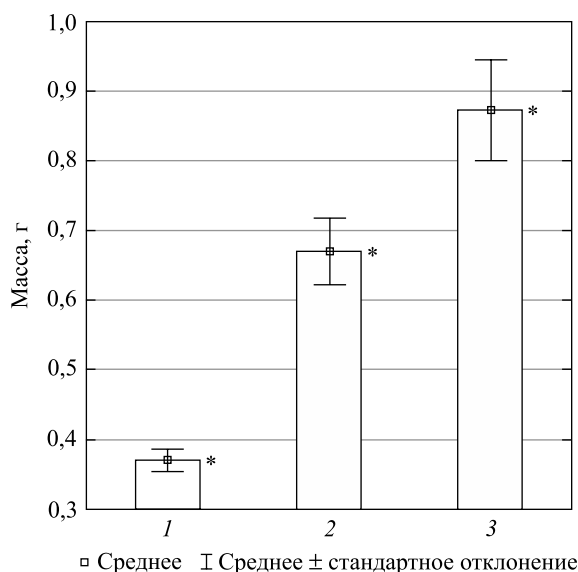


Рис. 1. Действие эмодина на массу корней в аллиум-тесте:
1 – луковицы в растворе эмодина; 2 – луковицы в ФБР; 3 – луковицы в воде;
* – различия между выборками ($n = 5$) статистически значимы
($p = 0,003$ 1, дисперсионный анализ Краскела – Уоллиса)

Fig. 1. The effect of emodin on the mass of roots in the allium test:
1 – bulbs in emodin solution; 2 – bulbs in phosphate buffered saline; 3 – bulbs in water;
* – differences between samples ($n = 5$) are statistically significant
($p = 0.003$ 1, Kruskal – Wallis analysis of variance)

Из рис. 1 видно, что масса корней лука в растворе эмодина почти в 3 раза меньше, чем в воде. Исходя из этого, можно сделать вывод, что эмодин оказывает ингибирующее действие на корневую систему лука.

Как известно, эмодин, обладая липофильными свойствами, способен преодолевать плазматические мембраны, а также, согласно базе данных токсических веществ *The Toxin and Toxin Target Database* (T3DB), может ингибировать цепи переноса электронов с образованием активных форм кислорода, это, в свою очередь, приводит к активации антиоксидантной системы. Кроме того, в ответ на чужеродные вещества в растительных клетках активируются биохимические системы трансформации веществ, при этом образуются активные формы кислорода и пероксид водорода. Пероксид водорода индуцирует экспрессию генов, участвующих в регулировании окислительного стресса [7], что приводит



к увеличению каталазной активности в клетках. Следовательно, каталазная активность в тканях как биохимический показатель хорошо отражает физиологическое состояние растительного организма.

С этой целью определено изменение каталазной активности в тканях корней лука, находившихся в растворе эмодина (рис. 2).

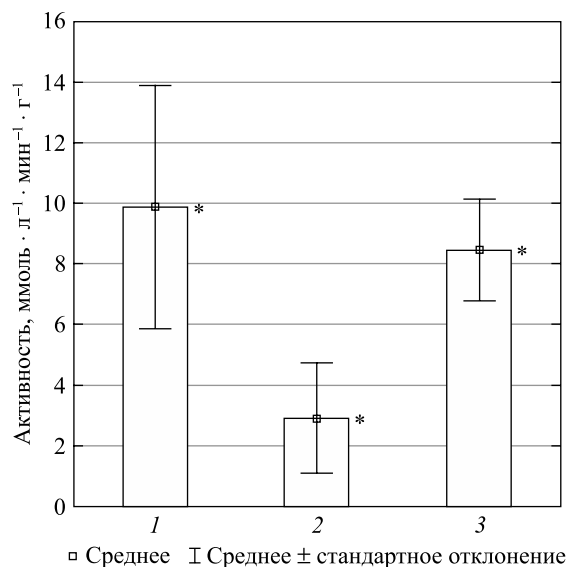


Рис. 2. Действие эмодина на каталазную активность в тканях корней лука:
1 – луковицы в растворе эмодина; 2 – луковицы в ФБР; 3 – луковицы в воде;
* – различия между выборками ($n = 5$) статистически значимы
($p = 0,0106$, дисперсионный анализ Краскела – Уоллиса)

Fig. 2. Effect of emodin on catalase activity in onion root tissues:
1 – bulbs in emodin solution; 2 – bulbs in the phosphate buffered saline; 3 – bulbs in water;
* – differences between samples ($n = 5$) are statistically significant
($p = 0.0106$, Kruskal – Wallis analysis of variance)

Как видно из рис. 2, наибольшая каталазная активность наблюдается в тканях корней, имевших контакт с эмодином. Она почти на 70 % превышает каталазную активность корневой системы луковиц, помещенных в ФБР, и на 20 % – луковиц, помещенных в воду (отличия статистически значимы, $n = 5$, $p = 0,0106$). Можно предположить, что высокая концентрация ионов натрия в ФБР способствовала снижению каталазной активности в корнях контрольной группы. В то же время эмодин инициировал каталазную активность в корнях. Это явление можно объяснить тем, что эмодин обладает свойством ингибирования цепи переноса электронов и способствует образованию активных форм кислорода, а это активирует антиоксидантную систему клеток.

Поскольку имеются сведения, что эмодин может взаимодействовать с белками и гемом, было проведено исследование, позволяющее судить о способности эмодина инактивировать гемсодержащие ферменты *in vitro* (рис. 3).

Активность фермента каталазы под действием эмодина снижается, что указывает на способность эмодина инактивировать фермент *in vitro* (см. рис. 3).

Как показали эксперименты с корешками лука, эмодин активирует антиоксидантную систему, о чем можно судить по увеличению каталазной активности в тканях. Однако *in vitro* эмодин снижает активность каталазы. Эта, на первый взгляд, парадоксальность может иметь вполне логичное объяснение. В эксперименте с корешками лука молекулы эмодина, проникая в клетки, опосредованно запускают антиоксидантную систему, кроме того, часть молекул эмодина могут прореагировать с большим числом молекул плазматической мембраны или цитоплазмы, что уменьшает вероятность взаимодействия с молекулами каталазы, чтобы инактивировать этот фермент.

Для определения возможности взаимодействия эмодина с гемом *in vitro* в качестве доступной модели использовали гемсодержащий белок гемоглобин.

Сначала определили максимум поглощения для коллоидного раствора эмодина в ФБР (рис. 4).

Как видно из рис. 4, максимум поглощения у эмодина в ФБР при разных концентрациях наблюдается при 480 нм.

Затем к растворенному в ФБР гемоглобину с концентрацией $1,796 \cdot 10^{-4}$ моль/л последовательно добавляли раствор эмодина с концентрацией $1,586 \cdot 10^{-4}$ моль/л и снимали спектры (рис. 5).

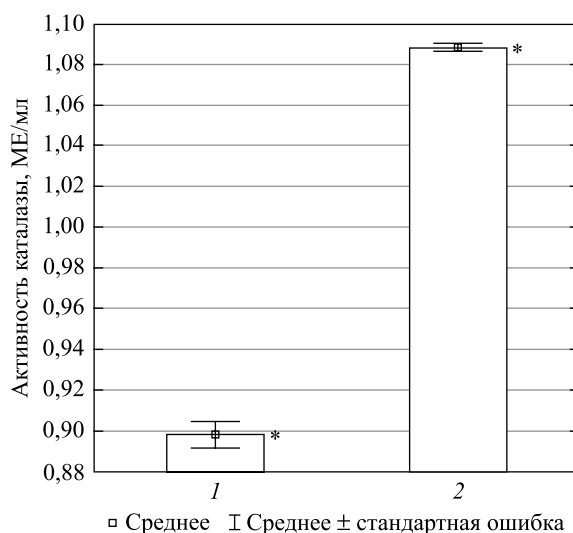


Рис. 3. Действие эмодина на активность каталазы *in vitro*:

1 – каталаза с эмодином; 2 – каталаза без эмодина;

* – различия между выборками ($n_1 = 4$, $n_2 = 4$) статистически значимы ($p = 0,028571$, тест Манна – Уитни)

Fig. 3. Effect of emodin on catalase activity *in vitro*:

1 – catalase with emodin; 2 – catalase without emodin;

* – differences between samples ($n_1 = 4$, $n_2 = 4$) are statistically significant ($p = 0,028571$, Mann – Whitney test)

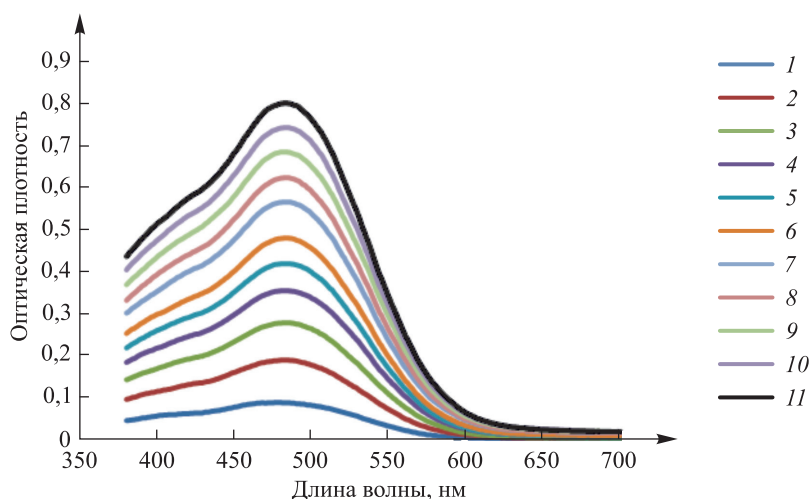


Рис. 4. Спектры поглощения эмодина при его разных концентрациях в ФБР

($\times 10^{-4}$ моль/л): 1 – 0,00793; 2 – 0,01585; 3 – 0,02379; 4 – 0,03172;

5 – 0,03965; 6 – 0,04758; 7 – 0,05551; 8 – 0,06344; 9 – 0,07137; 10 – 0,0793; 11 – 0,08723

Fig. 4. Light absorption spectra of emodin at different concentrations in phosphate buffered saline

($\times 10^{-4}$ mol/L): 1 – 0,00793; 2 – 0,01585; 3 – 0,02379; 4 – 0,03172; 5 – 0,03965;

6 – 0,04758; 7 – 0,05551; 8 – 0,06344; 9 – 0,07137; 10 – 0,0793; 11 – 0,08723

Как видно из рис. 5, с каждым добавлением эмодина увеличивается оптическая плотность в области 480 нм, что указывает на рост концентрации эмодина. При этом концентрация гемоглобина снижалась, следовательно, должна была уменьшиться и оптическая плотность при 414 нм, так как это максимум поглощения гема, но оптическая плотность раствора при этой длине волны увеличивалась с каждым добавлением раствора эмодина.

Максимум поглощения в области 414 нм относится к так называемой полосе Соре, которая характерна для всех тетрапиррольных макроциклов, в том числе гема, независимо от того, является он простетической группой или находится в свободном виде. При этом любые физико-химические преобразования тетрапиррольных макроциклов (например, депротонизация) приводят к изменениям оптической плотности в области Соре [8]. Таким образом, в нашем эксперименте наблюдается взаимодействие эмодина с гемом, однако мы не располагаем данными, чтобы с уверенностью указать на физико-химическую природу этого взаимодействия.



Для установления характера зависимости изменений оптической плотности от концентрации эмодаина проведен регрессионный анализ и определены коэффициенты линейной регрессии и их статистическая значимость (рис. 6).

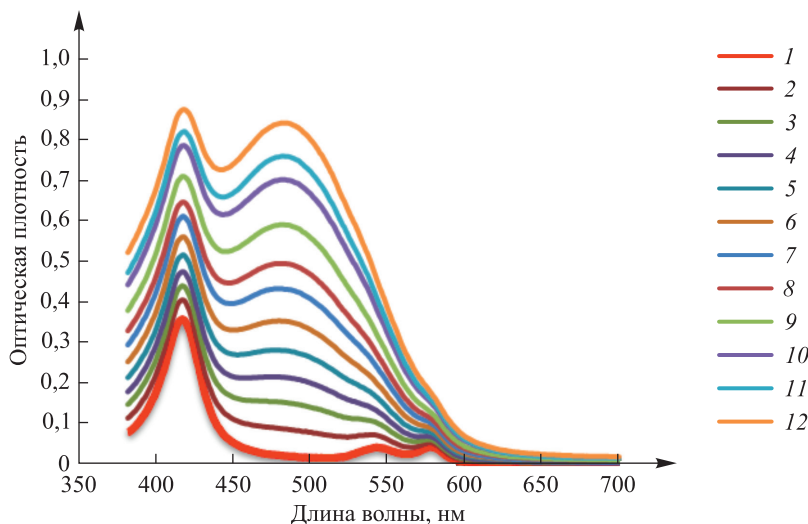


Рис. 5. Спектры поглощения раствора гемоглобина в присутствии эмодаина: 1 – гемоглобин ($1,796 \cdot 10^{-4}$ моль/л); 2–12 – эмодин ($(0,00793-0,08723) \cdot 10^{-4}$ моль/л)

Fig. 5. Light absorption spectra of a hemoglobin solution with the addition of emodin: 1 – hemoglobin ($1.796 \cdot 10^{-4}$ mol/L); 2–12 – emodin ($(0.00793-0.08723) \cdot 10^{-4}$ mol/L)

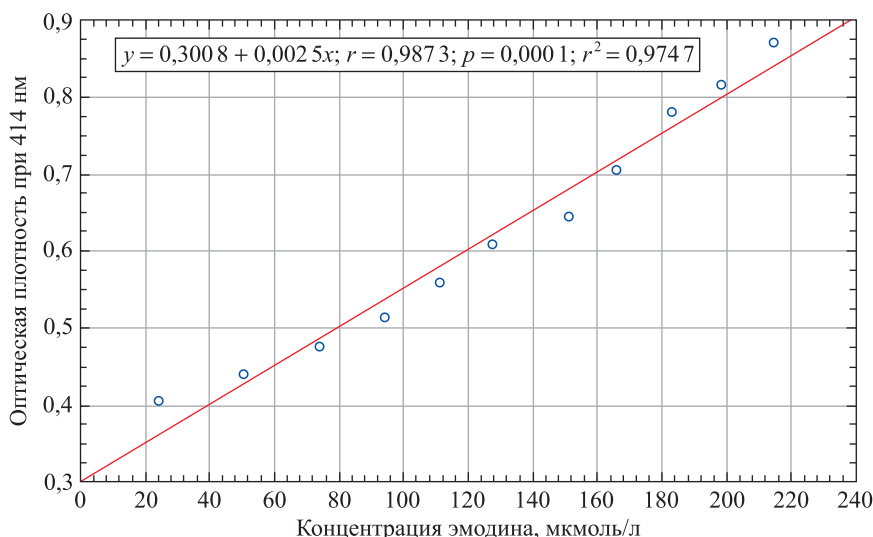


Рис. 6. Зависимость оптической плотности раствора гемоглобина при 414 нм от концентрации эмодаина

Fig. 6. Dependence of the optical density of a hemoglobin solution at 414 nm on the concentration of emodin

В данном случае регрессионный анализ указывает на статистическую значимость и линейный характер зависимости оптической плотности раствора гемоглобина при длине волны 414 нм от концентрации эмодаина с коэффициентом регрессии 0,002 510 ($p = 0,000\,000\,017$), свободный член равен 0,300 831 ($p = 0,000\,000\,066$). Так как происходит увеличение оптической плотности раствора гемоглобина, несмотря на снижение его концентрации, коэффициент регрессии имеет положительное значение. Это свидетельствует о взаимодействии эмодаина с гемом, в противном случае коэффициент имел бы отрицательное значение. Из уравнения также видно, что оптическая плотность в полосе Сорэ увеличивается пропорционально количеству добавленного эмодаина, что позволяет в дальнейшем при проведении фотометрического титрования определить точку эквивалентности, а также использовать гем как внутренний индикатор для количественного анализа эмодаина.



Заключение

В результате проведенного исследования показано, что эмодин обладает ингибирующим действием на *Allium cepa*, при котором в тканях корней повышается каталазная активность. Это может быть связано с активацией антиоксидантной системы клеток, поскольку известно, что эмодин способен ингибировать цепь переноса электронов и способствовать образованию активных форм кислорода. На гемоглобине как модельном гемсодержащем белке было показано взаимодействие гема с эмодином, что может являться возможным механизмом нарушения функции гемсодержащих белков. Дальнейшая детализация биологического действия эмодина позволит расширить сферы его применения в защите растений, растениеводстве, а также определить роль данного соединения в экологии и физиологии растений.

Библиографические ссылки

1. Шмярко ЯП, Мазан ИП. *Лекавыя расліны ў комплексным лячэнні*. Мінск: Навука і тэхніка; 1989. 399 с.
2. Inoue M, Nishimura H, Li HH, Mizutani J. Allelochemicals from *Polygonum sachalinense* Fr. Schm. (Polygonaceae). *Journal of Chemical Ecology*. 1992;18(10):1833–1840. DOI: 10.1007/BF02751107.
3. Hasan A, Ahmed I, Jay M, Voirin B. Flavonoid glycosides and an anthraquinone from *Rumex chalepensis*. *Phytochemistry*. 1995;39(5):1211–1213. DOI: 10.1016/0031-9422(95)00071-E.
4. Sridhar J, Jiawang Liu, Foroozesh M, Klein Stevens CL. Inhibition of cytochrome p450 enzymes by quinones and anthraquinones. *Chemical Research in Toxicology*. 2012;25(2):357–365.
5. Fiskesjö G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*. 1985;102(1):99–112. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x.
6. Ермаков АИ, редактор. *Методы биохимического исследования растений*. 2-е издание. Ленинград: Колос; 1972. 456 с.
7. Desikan R, A-H-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ. Regulation of the arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology*. 2001;127(1):159–172. DOI: 10.1104/pp.127.1.159.
8. Аджиб ЮХ, Минченя АА, Климович ПП, Маес В, Крук НН. Термохромизм растворов корролов в этаноле. *Журнал прикладной спектроскопии*. 2019;86(5):697–704.

References

1. Shmjarko JaP, Mazan IP. *Lekavyja rasliny w kompleksnym ljachjenni* [Medicinal plants in complex treatment]. Minsk: Navuka i tjechnika; 1989. 399 p. Belarusian.
2. Inoue M, Nishimura H, Li HH, Mizutani J. Allelochemicals from *Polygonum sachalinense* Fr. Schm. (Polygonaceae). *Journal of Chemical Ecology*. 1992;18(10):1833–1840. DOI: 10.1007/BF02751107.
3. Hasan A, Ahmed I, Jay M, Voirin B. Flavonoid glycosides and an anthraquinone from *Rumex chalepensis*. *Phytochemistry*. 1995;39(5):1211–1213. DOI: 10.1016/0031-9422(95)00071-E.
4. Sridhar J, Jiawang Liu, Foroozesh M, Klein Stevens CL. Inhibition of cytochrome p450 enzymes by quinones and anthraquinones. *Chemical Research in Toxicology*. 2012;25(2):357–365.
5. Fiskesjö G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*. 1985;102(1):99–112. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x.
6. Ermakov AI, editor. *Metody biokhimicheskogo issledovaniya rastenii* [Biochemical research methods of plants]. 2nd edition. Leningrad: Kolos; 1972. 456 p. Russian.
7. Desikan R, A-H-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ. Regulation of the arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology*. 2001;127(1):159–172. DOI: 10.1104/pp.127.1.159.
8. Ajeeb YH, Minchenya AA, Klimovich PG, Maes W, Kruk MM. Thermochromism of corrole solutions in ethanol. *Zhurnal prikladnoi spektroskopii*. 2019;86(5):697–704. Russian.

Получена 08.11.2020 / исправлена 23.02.2021 / принята 03.05.2021.
Received 08.11.2020 / revised 23.02.2021 / accepted 03.05.2021.

СОДЕРЖАНИЕ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

Нижегородова Д. Б., Зафранская М. М., Квасюк Е. И., Сыса А. Г. Влияние эмоксипина на цитотоксичность мононуклеаров периферической крови в условиях культивирования с цитарабином и циклоцитидином	3
Приступа К. В., Кукулянская Т. А., Храмцова Е. А. Изучение состояния компонентов аскорбат-глутатионового цикла в трансгенных растениях <i>Nicotiana tabacum</i> , выращенных в условиях абиотического стресса	11
Русакович А. А., Шашко А. Ю., Ветошкин А. А., Солдатенко А. А., Болвонович В. В., Смолч И. И., Соколик А. И., Шашко Ю. К., Демидчик В. В. Влияние диодного ультрафиолетового излучения на скорость роста колоний мицелиальных грибов рода <i>Alternaria</i>	19

БИОХИМИЯ

Ковалев И. В., Ковалева Н. О. Лигниновые фенолы как основа биопрепаратов	29
Губич О. И., Окорокова С. С., Копылева Д. В., Джаафар Н. С., Дуц Д. В., Коваль М. И. Исследование адаптогенных и гепатопротекторных свойств падуба парагвайского (<i>Ilex paraguayensis</i>) на экспериментальных моделях <i>in vivo</i>	43

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

Муратова А. А., Мандрик-Литвинкович М. Н., Валентович Л. Н. Увеличение антимикробной активности бактерий <i>Pseudomonas brassicacearum</i> S-1 в результате инактивации генов <i>lysR3</i> и <i>mtfA</i>	52
Чао Ю., Лагодич А. В. Анализ эффективности факторов электротрансформации клеток <i>Bacillus subtilis</i> для инактивации гена <i>aroK</i> путем гомологичной рекомбинации	64

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Рябцева А. О., Котова С. А., Гребенчук А. Е., Ганджа А. И., Журина Н. В., Цыбовский И. С. Микросателлитные маркеры в исследовании полиморфизма пород свиньи домашней (<i>Sus scrofa domestica</i>)	74
--	----

ЭКОЛОГИЯ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ

Жукова А. А., Смольская О. С., Вишневецкая Е. А., Каросиене Ю. Содержание растительных пигментов в донных отложениях озера Баторино и их спектральные пигментные индексы	84
--	----

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Кохановский А. И., Юрин В. М., Кохановская Е. Ю. Некоторые аспекты биологического действия эмодина на растения	97
--	----

CONTENTS

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

<i>Nizheharodava D. B., Zafranskaya M. M., Kvasyuk E. I., Sysa A. G.</i> Effect of emoxipine on cytotoxicity of peripheral blood mononuclears under cultivation with cytarabine and cyclocytidine.....	3
<i>Pristupa K. V., Kukulianskaya T. A., Khramtsova E. A.</i> Study of the ascorbate-glutathione cycle in transgenic plants <i>Nicotiana tabacum</i> under abiotic stress conditions	11
<i>Rusakovich A. A., Shashko A. Yu., Viatoshkin A. A., Saldatsenka A. A., Balvanovich U. V., Smolich I. I., Sokolik A. I., Shashko Yu. K., Demidchik V. V.</i> The effect of ultraviolet diode radiation on the growth rate of <i>Alternaria</i> colonies	19

BIOCHEMISTRY

<i>Kovalev I. V., Kovaleva N. O.</i> Lignin phenols as a basis for biopreparations.....	29
<i>Hubich A. I., Okarakava S. S., Kopyleva D. V., Jaafar N. S., Duts D. V., Koval M. I.</i> The investigation of adaptogenic and hepatoprotective properties of <i>Ilex paraguariensis</i> on experimental models <i>in vivo</i>	43

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

<i>Muratova A. A., Mandryk-Litvinkovich M. N., Valentovich L. N.</i> Increasing the antimicrobial activity of <i>Pseudomonas brassicacearum</i> S-1 by inactivation of <i>lysR3</i> and <i>mtfA</i> genes	52
<i>Chao Y., Lahodzich A. V.</i> Analysis of the efficiency factors of electrotransformation of <i>Bacillus subtilis</i> to inactivate the <i>aroK</i> gene by the method of homologous recombination	64

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

<i>Rabtsava A. A., Kotava S. A., Hrebianchuk A. Ya., Gandzha A. I., Zhuryna N. V., Tsybovsky I. S.</i> Microsatellite markers in the study of polymorphism of domestic pig breeds (<i>Sus scrofa domestica</i>)	74
---	----

ECOLOGY AND CONSERVANCY

<i>Zhukava H. A., Smolskaya V. S., Vishnevetskaya E. A., Karosienė J.</i> The content of plant pigments in bottom sediments of Batorino Lake and their spectral pigment indices	84
---	----

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Kakhanouski A. I., Yurin V. M., Kakhanouskaya K. Yu.</i> Some aspects of biological effect of emodin on plants	97
---	----

*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).*

**Журнал Белорусского
государственного университета. Биология.
№ 2. 2021**

Учредитель:
Белорусский государственный университет

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

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

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

E-mail: jbiol@bsu.by

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

«Журнал Белорусского государственного
университета. Биология» издается с января 1969 г.
До 2017 г. выходил под названием «Вестник БГУ.
Серия 2, Химия. Биология. География»
(ISSN 2308-9164).

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

Подписано в печать 30.06.2021.
Тираж 105 экз. Заказ 240.

Республиканское унитарное предприятие
«Информационно-вычислительный центр
Министерства финансов Республики Беларусь».
ЛП № 02330/89 от 03.03.2014.
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.

© БГУ, 2021

**Journal
of the Belarusian State University. Biology.
No. 2. 2021**

Founder:
Belarusian State University

Registered address: 4 Niezaliežnasci Ave.,
Minsk 220030.

Correspondence address: 4 Niezaliežnasci Ave.,
Minsk 220030.

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

E-mail: jbiol@bsu.by

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

«Journal of the Belarusian State University. Biology»
published since January, 1969.
Until 2017 named «Vestnik BGU.
Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya»
(ISSN 2308-9164).

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

Signed print 30.06.2021.
Edition 105 copies. Order number 240.

Republican Unitary Enterprise
«Informatsionno-vychislitel'nyi tsentr
Ministerstva finansov Respubliki Belarus'».
License for publishing No. 02330/89, 3 March 2014.
17 Kal'varyjskaja Str., Minsk 220004.

© BSU, 2021