

ISSN 0555-1099

Том 59, Номер 3

Май - Июнь 2023



# ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ



[www.sciencejournals.ru](http://www.sciencejournals.ru)



# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 59, номер 3, 2023

---

---

РНК-интерференция в защите растений от грибной и оомицетной инфекции <i>И. В. Максимов, М. Ю. Шеин, Г. Ф. Бурханова</i>	219
Эффект инактивации глиоксилатного шунта на биосинтез адипиновой кислоты штаммами <i>Escherichia coli</i> по обращенному $\beta$ -окислению жирных кислот <i>А. Ю. Гулевич, А. Ю. Скороходова, В. Г. Дебабов</i>	235
Выявление “некультивируемых” клеток <i>Mycobacterium tuberculosis</i> культуральными методами <i>Г. Р. Демина, М. О. Шлеева, Д. И. Багаева, Г. Н. Вострокнутова, А. С. Капрельяни</i>	244
Предобработка тростника с помощью глубоких эвтектических растворителей для увеличения его гидролизруемости под действием целлюлаз <i>М. В. Семенова, И. С. Васильева, А. И. Ярополов, А. П. Синицын</i>	253
Взаимосвязь состава корневых экссудатов и эффективности взаимодействия растений пшеницы с микроорганизмами <i>А. И. Шапошников, А. А. Белимов, Т. С. Азарова, О. К. Струнникова, Н. А. Вишневецкая, Н. И. Воробьев, О. С. Юзихин, Л. А. Беспалова, И. А. Тихонович</i>	260
Нарингенин модулирует активность аденилатциклазы в планктонной культуре и биопленках <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> <i>А. М. Гончарова, Л. А. Ломоватская, А. С. Романенко</i>	275
Метод выделения ДНК из растений для метагеномного анализа на примере винограда <i>Vitis amurensis</i> Rupr. <i>К. В. Киселев, Н. Н. Нитяговский, О. А. Алейнова</i>	281
Оптимизация параметров биобаллистической трансформации <i>Nicotiana tabacum</i> <i>А. А. Давлекамова, А. В. Зубрицкий, Т. А. Тимофеева, И. В. Яковлева, А. М. Камионская</i>	289
Перспективы применения сенсорных элементов для детекции присутствия бактерий в режиме реального времени <i>А. Н. Лачинов, А. А. Лачинов, Д. Д. Карамов, А. Ф. Галиев, Е. В. Кузина, Т. Ю. Коршунова</i>	295
Белковый антиоксидантный комплекс водного экстракта личинок <i>Ulomoides dermestoides</i> <i>Н. А. Ушакова, О. В. Тихонова, А. В. Амбарян, А. И. Бастраков, А. Е. Донцов</i>	301
Разработка кинетического микропланшетного иммуноферментного определения дибутилфталата <i>А. Н. Берлина, К. В. Серебренникова, Н. С. Комова, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев</i>	309

---

## Хроника

Поздравляем юбиляра. Владимиру Олеговичу Попову 70 лет 318

---

---

# CONTENTS

---

---

Vol. 59, No. 3, 2023

---

---

RNA Interference in Plant Protection from Fungal and Oomycet Infection <i>I. V. Maksimov, M. Yu. Shein, and G. F. Burkhanova</i>	219
Effect of the Glyoxylate Shunt Inactivation on Biosynthesis of Adipic Acid Through the Inverted Fatty Acid $\beta$ -oxidation by <i>Escherichia coli</i> Strains <i>A. Yu. Gulevich, A. Yu. Skorokhodova, and V. G. Debabov</i>	235
Detection of “Non-culturable” <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Cells by Culture Methods <i>G. R. Demina, M. O. Shleeva, D. I. Bagaeva, G. V. Vostroknutova, and A. S. Kaprelyants</i>	244
Cane Pretreatment by Deep Eutetic Solvents to Increase its Reactivity During Enzymatic Hydrolysis with Cellulases <i>M. V. Semenova, I. S. Vasil’eva, A. I. Yaropolov, and A. P. Sinitsyn</i>	253
Relationship between the Composition of Root Exsudates and the Efficiency of Interaction of Wheat Plants with Microorganisms <i>A. I. Shaposhnikov, A. A. Belimov, T. S. Azarova, O. K. Strunnikova, N. A. Vishnevskaya, N. I. Vorobyov, O. S. Yuzikhin, L. A. Bespalova, and I. A. Tikhonovich</i>	260
Naringenin Modulates Adenylate Cyclase Activity in Planktonic Culture and Biofilm <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> <i>A. M. Goncharova, L. A. Lomovatskaya, and A. S. Romanenko</i>	275
Method of DNA Extraction from Plant for Metagenomic Analysis as Example from Grape <i>Vitis amurensis</i> Rupr. <i>K. V. Kiselev, N. N. Nityagovsky, and O. A. Aleynova</i>	281
Optimization of Biolistic Transformation Parameters for <i>Nicotiana tabacum</i> <i>A. A. Davlekamova, A. V. Zubritsky, T. A. Timofeeva, I. V. Yakovleva, and A. M. Kamionskaya</i>	289
Prospects for the Application of Sensor Elements for Detecting the Presence of Bacteria in Real Time <i>A. N. Lachinov, A. A. Lachinov, D. D. Karamov, A. F. Galiev, E. V. Kuzina, and T. Yu. Korshunova</i>	295
Protein Antioxidant Complex of Water Extract of Larvae of Black Beetles <i>Ulomoides dermestoides</i> <i>N. A. Ushakova, O. V. Tikhonova, A. V. Ambaryan, A. I. Bastrakov, and A. E. Dontsov</i>	301
Development of Kinetic Microplate Immunoenzyme Determination of Dibutyl Phthalate <i>A. N. Berlina, K. V. Serebrennikova, N. S. Komova, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev</i>	309

---

---

## Chronicle

Congratulations to Vladimir Olegovich Popov on his 70th Birthday	318
--	-----

---

---

УДК 632.938.2:577.29

## РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ ОТ ГРИБНОЙ И ООМИЦЕТНОЙ ИНФЕКЦИИ

© 2023 г. И. В. Максимов<sup>1</sup>, \*, М. Ю. Шеин<sup>1</sup>, Г. Ф. Бурханова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, Уфа, 450054 Россия

\*e-mail: igor.mak2011@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.07.2022 г.

После доработки 02.09.2022 г.

Принята к публикации 09.01.2023 г.

Фитопатогенные грибы представляют угрозу продовольственной безопасности, ограничивая биологический потенциал сельскохозяйственных культур и снижая качество получаемой продукции. На современном этапе разрабатываются методы защиты растений, основанные на естественном системном и клеточном фитоиммунитете, где особое место занимает уникальный механизм, описываемый термином “РНК-интерференция” (РНКи). Природный механизм РНКи, обеспечивая регуляцию экспрессии генов-мишеней гомологически зависимым образом с вовлечением белкового комплекса, обозначенного как RISC (RNA-induced silencing complex — РНК-индуцируемый сайленсинговый комплекс), с одной стороны защищает растения от патогенов, но с другой — патогены используют его как фактор вирулентности. Описаны случаи двустороннего обмена малых РНК между растениями и поражающими их грибными патогенами посредством внеклеточных везикул. В обзоре обсуждается роль малых РНК, а также белков DCL, AGO и RdR в ответе растений на инфицирование патогенными грибами и оомицетами и перспективы использования механизма РНКи при создании экологически безопасных, современных препаратов для защитных мероприятий.

**Ключевые слова:** РНК-интерференция, фитоиммунитет

**DOI:** 10.31857/S0555109923030133, **EDN:** BEKGNX

РНК-интерференция (РНКи) — одно из выдающихся открытий в биологии, документально подтвержденное в 1998 г. Э. Файром и К. Меллоу на нематодах *Caenorhabditis elegans*, за которое авторы получили Нобелевскую премию [1]. Вместе с тем, сам феномен РНКи наблюдался еще до его официального признания. Например, подобное явление описывалось под термином “квеллинг” (quelling), в качестве объекта наблюдений в 1992 г. использовали гриб *Neurospora crassa* [2], в 1997 г. — *Schizophyllum commune* [3], а в 1998 г. — *Cladosporium fulvum* [4]. А еще раньше, в 1990 г., Р. Йоргенсен наблюдал у трансгенных растений петунии *Petunia hybrid* L. химерные растения с фиолетовыми и белыми, а также полностью белыми цветами, вместо ожидаемого интенсивно фиолетового цвета лепестков за счет гиперэкспрессии гена халконсинтазы [5]. РНКи играет важную роль в эпигенетической модификации, контроле перемещения мобильных элементов, регуляции стабильности генома, экспрессии генов и образовании гетерохроматина, а также в ответных реакциях при воздействии различных стрессовых факторов, в том числе патогенной природы у всех эукариот, включая растения, а также грибы.

Установлено, что в механизме РНКи важную роль играют малые РНК (20–26 н.п.), а также комплекс белков, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами [6]: РНК-зависимая РНК полимераз (RNA-dependent RNA polymerase, **RdR**), Dicer-подобные белки (**DCL**), белки Аргонавты (**AGO**) и белки **RdDM** (РНК-зависимые ДНК-метилазы, RNA-directed DNA metilase) (рис. 1).

**Малые РНК.** Малые РНК являются ключевыми участниками РНКи. Выявлено их накопление в растениях в ответ на стрессовые факторы среды, включая и биотические, и контролирование экспрессии генов посредством деградации информационной РНК, репрессии трансляции и ремоделирования хроматина [76]. Биогенез многих малых РНК расшифрован и описан [7, 8]. По локализации в геноме их источники классифицируются как “межгенные” и “интронные” [9]. Малые РНК включают в себя два больших класса — микро- (miРНК) и малые интерферирующие РНК (siРНК).

Первая малая РНК, о которой сообщалось, что она вовлечена в процессы иммунитета — miR393, выделена из растений арабидопсиса, обработанных элиситорами, и показан запуск ею супрессии mРНК, кодирующих рецепторы ауксинов, в целях

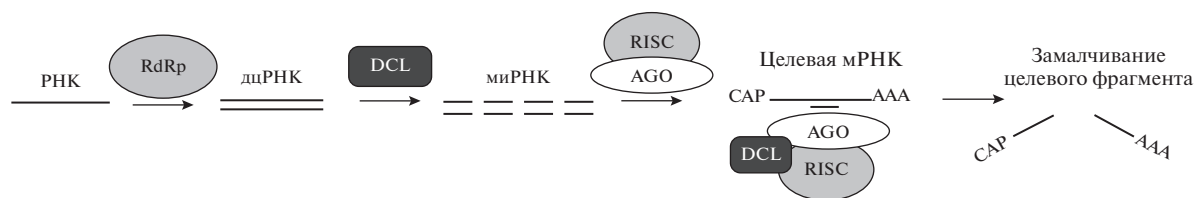


Рис. 1. Схематическое представление механизма РНКи в растениях.

отключения соответствующего сигнального пути и активации запускаемого патогеном иммунитета (pathogen-triggered immunity, **PTI**) [10]. Среди siРНК первой, генерируемой в ответ на инфицирование бактерией *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), несущей эффектор AvrRpt2, была pat-siR-NAATGB2, регулирующая опосредованный R-генами эффектор-индуцируемый фитоиммунитет (effector-triggered immunity, **ETI**) [11].

Уникальная стратегия защиты растений от патогенов с помощью малых РНК описана в работе Т. Чханг и соавт. [12]. Ими получены малые РНК из мицелия гриба *Verticillium dahliae*, выделенного из зараженного материала хлопчатника, не связанные с геномом патогена, но проявляющие гомологию с последовательностями ДНК из генома хлопчатника (хозяина). Показано, что большая часть малых РНК, экспортированных из растений хлопчатника, действовала на гены вирулентности *Verticillium dahliae*, способствуя, тем самым, развитию устойчивости хозяина к грибу [12].

В геноме пшеницы, инфицированной возбудителем стеблевой ржавчины, описано функционирование локуса, ответственного за продукцию транскрипционно-активных ta-siРНК (ta-siRNA producing locus, **TAS**), не всегда, однако, гомологичного целевым генам [9]. Это предполагает их способность ингибировать экспрессию нескольких генов, например, кодирующих белки, содержащие домены с лейцин-богатым повтором (leucine-rich repeat, **LRR**), такие как трансмембранные рецепторные белки, киназы,  $\alpha$ -глиадин, глутатион-S-трансферазу (glutathione S-transferase, **GST**) и десатуразу жирных кислот. Поскольку домен LRR является важным компонентом киназ плазмалеммы, обладающих рецепторными свойствами, можно полагать, что выработка таких ta-siРНК необходима для сигнального “замалчивания” генов, ответственных за гиперчувствительную реакцию в растениях в норме [9].

Выявлено, что мобильные элементы и интроны функционально активных генов могут быть важными источниками малых РНК как в растениях [13], так и в грибах [14]. Так, накопление TE-siR815/osa-miR815 в растениях риса, связанная с интроном WRKY45-1 транскрипционного фактора WRKY45, и зависящая от экспрессии генов *OsRdR2* и *OsDCL3a*, но не *OsDCL1*, *OsDCL2* и *OsDCL3b*, формировала восприимчивость растений риса к патогенной бактерии *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*,

подавляя накопление белка ST1, важного компонента WRKY45-опосредованной устойчивости с помощью белка RdDM [15]. Вместе с тем, в отношении грибка *Magnaporthe oryzae* эта же miРНК работала как позитивный регулятор устойчивости растений [13].

Малые РНК: miR160a, miR396a, miR398b, miR482, miR1444, miR2118, miR6021, miR6022, miR6023 и miR7695 являются немногими примерами miРНК растений, участие которых в регуляции генов защитных белков и в иммунитете против патогенов в целом доказана [16, 17]. Так, если в норме в растениях томата повышенный уровень miR6021, miR6022 и miR6023 подавлял накопление трансмембранного рецепторного белка Cf9, придающего устойчивость к грибу *Cladosporium fulvum*, то при инфицировании такая репрессия гена снималась, что предполагает жесткую супрессию некоторых защитных генов miРНК в условии отсутствия патогенов [10, 17]. Растительные ta-siРНК, направленные против мРНК патогенных эффекторов, названных *Phytophthora Suppressors of RNA silencing* (PSR1 и PSR2) и вырабатываемых в ответ на инфицирование оомицетом, служат межвидовыми защитными молекулами против патогенов. Вероятно, эти ta-siРНК могут экспортироваться из растений-хозяев в мицелий патогена во внеклеточных везикулах, запуская там РНКи против эффекторов PSR1 и PSR2 и снижая вирулентность патогена. Особо следует заметить, что грибной эффектор PSR2, как оказалось, эффективно взаимодействуя с хозяйским белком DRB4 (Double-stranded-RNA-Binding protein 4), вовлеченным в качестве кофактора DCL4 в запуске вторичного биогенеза siРНК, специфически уменьшает накопление вторичных siРНК, регулируемых miR161 и miR173 [18]. В корнях растений сои накопление эффекторов PSR1 и PSR2 усиливало вирулентность оомицета *Phytophthora sojae* [19]. Анализ транскрипционной активности гена, кодирующего эффектор PSR2, показал, что наиболее высокий уровень транскриптов наблюдался в биотрофной фазе патогена, что свидетельствует о необходимости белка PSR2 именно в ранний период формирования взаимоотношений с хозяином. Гомолог PSR2 идентифицирован у *Phytophthora infestans* (PITG\_15152) и других видов, вызывающих фитофтороз. В другой работе описан эффектор Pi14054, накапливающийся в пределах 36 ч после начала инфицирования оомицетом *P. infestans*

растений табака *Nicotiana benthamiana* и эффективно подавляющий РНКи хозяина [20]. Кроме того, PSR1 активно влиял как на уровень miРНК, так и на siРНК у *Arabidopsis*, тогда как PSR2 в основном на siРНК [21]. Эффекторный белок PgtSR1, кодируемый двумя аллельными генами (*PgtSR1-a* и *PgtSR1-b*) из гриба *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, подавлял накопление siРНК в растениях, препятствуя защите растений от патогена посредством запуска гиперчувствительной реакции в инфицированных тканях [22]. Патогенная Pst-milR1, выделенная из мицелия *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, обладала свойством транспортироваться в клетки пшеницы, отключать накопление защитного белка PR2 и запускать реакцию восприимчивости к авирулентному изоляту *P. striiformis* f. sp. *tritici* CYR23 [23]. Супрессия накопления пре-Pst-milR1 у вирулентного изолята *P. striiformis* CYR31 способствовала устойчивости растений к болезни [22]. Штамм оомицета *Phytophthora capsica*, не имеющий в своем “арсенале” эффектор PSR2, не снижал в растениях накопление miR161 и связанных с ней вторичных siРНК, экспрессирующихся из локусов TAS1/TAS2, и, соответственно, не приводил к супрессии иммунного ответа [24].

Растения *Solanum tuberosum* L., как гиперпродукующие miR160, так и с подавленным ее уровнем, проявляли восприимчивость к фитофторозу [25], что предполагает строгую регуляторную роль этой малой РНК. Точно также, как регулятор устойчивости растений томатов к фитофторозу, функционирует miR172, имеющая гомологию с участком гена, кодирующего транскрипционный фактор AP2/ERF [26]. В растениях баклажана *Solanum melongena* L. выявлены miR156 и miR395, накапливающиеся при инфицировании грибом *Verticillium dahliae* [27, 28]. Тонко настроенную и многофункциональную роль в РНКи в регуляции устойчивости растений к грибной инфекции выполняют изоформы miR168, выработка которых отключала накопление хозяйского белка VnAGO1 в патогенной системе растений рапса *Brassica napus* с грибом *Verticillium longisporum* и, соответствующим образом, способствовала восприимчивости [29, 30]. В растениях риса *Oriza sativa*, инфицированных грибом *Magnaporthe oryzae*, miR319 проявляла комплементарность к мРНК ключевого фермента синтеза жасмоновой кислоты (ЖК) — липоксигеназы, что подавляло ее синтез и снижало устойчивость растений [31]. В растениях рапса, инфицированных грибом *Sclerotinia sclerotiorum*, показано дифференциальное накопление 68 малых РНК комплементарных генам, кодирующим белки, содержащие нуклеотид-связывающий домен и богатые лейциновыми повторами (NB-LRR), вовлеченные в защитный ответ растений ЕТ1 против различных патогенов [32].

Накопление miR482, как негативного регулятора устойчивости, наблюдали в условиях инфицирования грибными патогенами тополя волосистоплодного *Populus trichocarpa*, сосны ладанной

*Pinus taeda*, сои культурной *Glycine max*, яблони домашней *Malus domestica*, фасоли обыкновенной *Phaseolus vulgaris* люцерны усеченной *Medicago truncatula*, томатов *Solanum lycopersicum*, картофеля *S. tuberosum*, хлопчатника *Gossypium hirsutum* [33–35]. Обнаружено, что РНКи, опосредованная этой двухцепочечной РНК (дцРНК), имея родство в растениях к примерно 20% генов, кодирующим NBS-LRR домен [33, 36], может служить настройщиком фитоиммунного ответа, а ее сверхэкспрессия — снижает устойчивость растений к патогенам. В растениях хлопчатника искусственное ингибирование накопления ghr-miR482c, ghr-miR482d.2 и ghr-miR482b/miR482b.2 укрепляло устойчивость к грибу *V. dahlia*. Также, растения томатов после ингибирования накопления sly-miR482f [35] или ее гомолога sly-miR482b [37] повышали устойчивость к *Fusarium oxysporum* или *Botrytis cinerea* соответственно. У томатов, инфицированных грибом *B. cinerea*, показана негативная регуляторная активность pri-miR482b и в отношении маркерных генов, кодирующих защитные белки PDF1.2 и PR4, что предполагает формирование восприимчивости за счет ингибирования ERF-ветви жасмоноватного сигнального пути [37]. Универсальность работы miR482 почти во всех семенных, включая и голосеменные, подразумевает относительную эволюционную древность этой группы малых РНК, возникших еще на заре формирования высших растений [36].

Регуляция транскрипции при РНКи может быть опосредована и под влиянием длинных некодирующих РНК, превышающих в длину 200 н.о. и не содержащих значимой открытой рамки считывания (ORF) [38]. Шестьдесят три дифференциально экспрессируемых некодирующих РНК идентифицированы в кукурузе при взаимодействии с микоризными грибами *Rhizophagus irregularis* [38]. У пшеницы межгенные РНК длиной 254 и 52 н.о. экспрессировались на инфицирование грибами *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* и *P. striiformis* f. sp. *tritici* соответственно [39].

**Dicer-подобные белки (DCL)** — семейство эндорибонуклеаз — РНКазы III, состоящих из геликазы DExD-box-C, домена Piwi-Argonaute-Zwille (PAZ) — домена с неизвестной функции 283 (DUF283), РНКазы III и доменов, связывающих дцРНК (dsRBD). Домен PAZ имеет фосфатсвязывающий карман, состоящий из аргининовых компонентов, распознающих 5'-монофосфат пре-микроРНК и необходимы для ее разрезания на фрагменты коротких дцРНК [40].

Мутанты по генам *Osdcl1* риса и *Atdcl1* арабидопсиса проявляли устойчивость к грибам *Magnaporthe oryzae* и *S. sclerotiorum* соответственно [31, 32], что можно объяснить необходимостью функционирования именно белков DCL1 в формировании miРНК и последующего запуска РНКи, способствующей вирулентности патогенов [41]. Соответственно, отключение выработки белков DCL гриба, снижающее генерацию ими

малых РНК, ожидаемо должно ослабить патогенность и рост грибов в растениях. Действительно, двойные мутанты *dcl1/dcl2* грибов *B. cinerea* [42] и *Colletotrichum gloeosporioides* [43] показали пониженную вирулентность в отношении своих хозяев. У патогенного гриба *Penicillium italicum* вирулентность пропадала при глушении гена *DCL2*, но не *DCL1* (в отличие от *S. sclerotiorum*) [44].

**Посттранскрипционное метилирование ДНК.** Часто в растениях биотический стресс резко сказывается на профиле метилирования ДНК, что представляет консервативную форму эпигенетической маркировки, связанной с иммунитетом [45]. Метилирование ДНК с участием белков РНК-зависимых ДНК-метилаз (RdDM) имеет два основных этапа: биогенез siРНК и метилирование ДНК, управляемое siРНК. Первая стадия включает РНК-полимеразу (Pol) IV и белки DCL, тогда как вторая стадия включает РНК-полимеразу V, AGO4/6 и РНК-зависимую ДНК-метилазу [46].

У шелковицы *Morus notabilis* устойчивость к грибу *B. cinerea* была увеличена подавлением гена *MnMET1*, что предполагает важность зависимого от РНК метилирования промоторных областей генов защитных белков в формировании эффективной защиты против патогенов [47]. В целом, мутанты *Arabidopsis* с гипометилированием ДНК оказались более устойчивыми к болезням и продемонстрировали повышенный салицилат-зависимый ответ. Мутанты *met1*, *drm1/drm2* и *drm1/drm2/cmt3* (*ddc*), *nrpd1* (мутант по PolIV), *nrpe1* (мутант по PolIV), *nrpd1/nrpe1*, *nrpd2* (субъединица различная у Pol IV и PolV), *drd1* (мутант по DRM), *rdr2*, и *dcl2/3/4* оказались более устойчивыми к бактериальному патогену *Pseudomonas syringae*, а мутанты *cmt3*, *drd1*, и *nrpe1* – к биотрофному оомицету *Hyaloperonospora arabidopsidis* [48]. Напротив, мутанты арабидопсиса *Drd1*, *nrpe1*, *nrpd1/nrpe1* и *nrpd2* проявили восприимчивость к грибу *Plectosphaerella cucumerina* [49], а мутант *ddc* – к *Alternaria brassicicola* [50], что связано с жасмонат-зависимым запуском сигнальной защитной системы. Тройные мутанты по ДНК-деметиلاзам *ros1/dml2/dml3* (*rdd*) демонстрируют повышенную восприимчивость к грибу *F. oxysporum* и, напротив, накопление четырех ДНК-деметилаз DME, ROS1, DML2 и DML3 способствовало устойчивости [51]. Также обнаружено, что промоторы генов *ROS1*, *DML2* и *DML3*, а также транскрибируемые области, кодирующие домены NB-LRR, могут быть деметилированы [52].

В профилях метилирования цитозина пшеницы наблюдали изменения через 96 ч после инокуляции возбудителем листовой ржавчины пшеницы *Puccinia triticina* [53]. У растений *Aegilops tauschii* при заражении грибом *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Bgt) обнаружено метилирование локусов богатых цитозином [54]. Участие siРНК гриба *Trichoderma atroviride* в эпигенетической регуляции активности генов растений через метилирование их промоторов белками RdDM, сохраняющееся и в

следующем поколении (F1) [55], позволяет использовать такое наследование механизма глушения генов для закрепления в следующем поколении и обеспечивает фундаментальные основы для разработки новых подходов в семеноводстве [56].

Особый интерес представляют данные о влиянии метилирования ДНК, связанной с РНКи, на экспрессию генов, при эндосимбиозе. Так, арбускулярный микоризный гриб *Funneliformis mosseae* индуцировал изменения профиля метилирования ДНК у герани *Geranium robertianum* [57]. В инокулированных и неинокулированных грибом эндофитом SMCD 2206 проростках пшеницы *Triticum turgidum* описаны различные паттерны метилирования ДНК, особенно четко проявившиеся в условиях засухи [58]. Поскольку инокулированные эндофитным штаммом растения оказывались более устойчивыми к засухе, чем неинокулированные, можно полагать, что в растениях микроорганизм запускает ответное усиление чувствительности к стрессовым факторам, близкое по природе к феномену, описываемому термином “прайминг” [59]. Но ответ на вопрос о том, насколько это соответствует действительности и отличается ли в растениях метилирование хозяйских генов в зависимости от уровня трофности микроорганизма, пока еще требует ответа.

**Белки аргонавты (AGO)** связывают короткие дцРНК, генерированные DCL, и считаются ключевыми в комплексе RISCs. Наиболее важная функция белков AGO – участие в фитоиммунитете. Белки AGO1 формируют совместимость между хозяином и патогеном, что подтверждается в условиях подавления их синтеза укреплением устойчивости растений к грибам *V. dahlia* и *V. longisporum* [30]. Обнаружены различия между белками AGO, связанные с транскрипционным глушением генов (transcription gene silencing, TGS) и посттранскрипционным глушением генов (posttranscription gene silencing, PTGS). Так, белки AGO4, AGO6 и AGO9 важны при TGS, в то время как AGO1, AGO2, AGO3, AGO5, AGO7 и AGO10 при PTGS [60]. Группа белков AGO4 участвует в метилировании ДНК с участием белков RdDM и связывает дцРНК размером 24 п.н, продуцируемые RdR2 и DCL3 [46, 61].

**РНК-зависимая РНК-полимераза (RdR)** вовлечена в усиление эффекта глушения, реплицируя длинные одноцепочечные РНК (оцРНК) в длинные дцРНК, конвертирующимися в последствии белками DCL до коротких siРНК, что приводит к новому циклу глушения РНК. Белок RdR первоначально был идентифицирован как фермент репликации в РНК содержащих вирусах. Активность растительной RdR, функционально подобной, но генетически не гомологичной вирусной, впервые изучена у китайской капусты в 1971 г. [62]. Оказалось, что эти белки характеризуются функциональным разнообразием. Белки RDR1 участвуют в амплификации экзогенных фрагментов оцРНК

и прайминге фитозащитной системы, а RDR2 – в запуске метилирования ДНК с участием белков RdDM, необходимым в функционировании РНКи и генерации siРНК. RDR6 активирует метилирование ДНК транскрибируемой области в отсутствие RDR2. В селекции на устойчивость роз к листовым пятнистостям оказался эффективен генный локус, содержащий ген *Rdr1* [63].

**Передача сигнала РНКи.** Известно об огромном числе РНК, перемещающихся по клеткам и тканям растения [33, 64]. У арабидопсиса описано более 3500 фрагментов РНК, способных к перемещению [65]. Присутствие РНК в соке флоэмы ясно демонстрирует, что они мобильны и, таким образом, участвуют в передаче сигналов на большие расстояния. Хорошо изученными мобильными РНК, перемещающимися от одной клетки к другой, являются мРНК, кодирующие фактор транскрипции KNOTTED1, переносчик сахарозы SUC1, а также вовлеченные в синтез miR390 и miR165/166. Наблюдали прохождение мРНК проростка томатов через флоэму и ее выгрузку в клетки привоя, где она транслировалась в ответ на атаку патогенов и придавала устойчивость к ним [31].

В рамках рассмотрения вопроса об участии малых РНК во взаимодействии между хозяином и патогеном необходимо обратить особое внимание на внеклеточные везикулы, вырабатываемые обоими партнерами. Везикулярный обмен РНК между растениями и патогенами описывается как двунаправленная кросс-межцарственная РНКи, что в условиях инфицирования может способствовать как иммуностимулирующим, так и иммуносупрессивным процессам [8]. Внеклеточные везикулы описаны у различных штаммов грибов, и они выполняют функции доставки факторов вирулентности, ремоделирования клеточной стенки и взаимодействия между патогеном и хозяином [66]. Точно также растения *A. thaliana* секретируют во внеклеточную среду TAS1c-siR483 и TAS2-siR45 в составе везикулярных пузырьков, направляющихся в места инфицирования, поглощающиеся клетками гриба *B. cinerea* и, подавляя экспрессию мРНК Vc-Vps51, Vc-DCTN1 и Vc-SAC1, снижают вирулентность гриба [64]. Подобный механизм глушения патогенных генов обнаружен у подсолнечника, томатов и оливы, что указывает на то, что точный межцарственный транспорт растительной дцРНК опосредуется внеклеточными везикулами [65]. Растения хлопчатника индуцируют биогенез двух специфических miR166 и miR159 при заражении возбудителем вертициллеза *Verticillium dahliae* и экспортируют их в клетки мицелия гриба для подавления работы генов Ca<sup>2+</sup>-зависимой цистеиновой протеазы (Clp-1) и гидроксилазы изотриходермина C-15 (HiC-15), связанных с вирулентностью, и обеспечивают таким образом устойчивость к болезням [68]. Особо следует отметить, что секреция во внеклеточную среду малых РНК в экзосомах не только усиливается во

время стрессового воздействия, но и способствует укреплению врожденного фитоиммунитета [69]. Так, транспорт малых РНК из клеток хозяина в мицелий патогена наблюдали в системе пшеница – гриб *Fusarium graminearum*, где хозяйская miR1023 подавляла инвазию гриба, глуша ген *FgSG\_03101*, кодирующий альфа/бета-гидролазы [70]. И напротив, используя экзосомы, гриб *B. cinerea* доставлял свои белки-эффекторы в клетки-хозяина и снижал эффективность работы хозяйского механизма РНКи [71]. О возможности отключения фитоиммунитета через механизм кросс-межцарственной РНКи говорят факты обнаружения в растениях томата, инфицированных грибом *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Fol-miR1, генерируемой им и комплементарной к фрагменту растительного гена *Solyc06g007430*, кодирующего протеинкиназу SlyFRG4 [72]. Для эффективного отключения трансляции мРНК *Solyc06g007430* оказалась необходима загрузка Fol-miR1 в комплекс RISC, содержащий белок SlyAGO4a, а отключение накопления этого белка методом VIGS приводило к пониженной восприимчивости к грибу [72].

Исходя из возможности дцРНК транспортироваться по растению, можно полагать, что эффективная доставка дцРНК к месту локализации патогена имеет решающее значение для контроля инфицирования патогенами и наоборот [73]. Показан перенос ряда малых РНК из клеток арабидопсиса в клетки гриба *B. cinerea* через внеклеточные везикулы, подавляя гены вирулентности грибов и способствуя повышению иммунитета хозяина [74]. Выдвигается предположение, что экзосомы защищают малые РНК от атаки нуклеаз в апопласте, что объясняет их стабильность и активность после переноса и существование опосредованного экзосомами обмена дцРНК в патогенной системе [75]. Взятые вместе, комбинация трех возможных транспортных систем для РНК (плазмодесмы, экзосомы и сосудистая транспортная система) позволяет распределять дцРНК по всему организму и даже за его пределами. В растениях секреция везикул происходит не только при инфицировании, но и при абиотических стрессовых воздействиях, фитогормональном воздействии, предполагая врожденный характер работы РНКи на внешние воздействия [76].

**Супрессия хозяйской (растительной или грибной) РНКи.** Необходимо помнить, что РНКи – продукт совместного эволюционного развития хозяина и его паразитов [64]. Понятно, что, поскольку генная организация, клеточные структуры и многие метаболические пути грибной клетки аналогичны таковым других высших эукариот, эта группа организмов может также использовать РНКи для своей защиты от других патогенов. Но понятно и то, что такой механизм эффективной РНКи может функционировать и для преодоления патогенами защиты хозяина [77]. О важной противодействующей роли компонентов (белков), включенных в РНКи как растения, так и патогенного гриба опи-



сано в обзорной работе Лакс с соавт [78]. Данное противодействие – пример сложной и интенсивной “эволюционной борьбы” между вирусами, фитопатогенами и фитофагами с одной стороны и растениями с другой. Коэволюция между супрессорами и РНКи также свидетельствует о чрезвычайно сложной природе адаптации мутуалистов, симбиотрофов и патогенов к фитозащитной системе.

В геноме грибов идентифицированы гены, кодирующие гомологи белков RdR, AGO и DCL [79], а продукты этих генов обладали аналогичными функциями защитной активности против биотической инфекции, как у всех высших эукариот [80]. У патогенного гриба *Verticillium nonalfalfae* идентифицированы по 2 белка для всех трех ключевых компонентов РНКи (AGO, DCL, RdR), а также выстроено их филогенетическое древо [81]. Были подтверждены существующие таксономические отношения в группе грибов *Ascomycetes*, а также высокое сходство аминокислотных последовательностей генов, вовлеченных в РНКи, между представителями *Hypocreomycetidae* и *Sordariomycetes*.

Грибы имеют активные пути РНКи, влияющие на их патогенность. Гриб *F. graminearum*, возбудитель фузариоза пшеницы, кодирует два белка DCL, два белка AGO и пять белков RdR [82]. Мутанты, лишенные одного или двух генов РНКи у этих видов, обычно теряют способность проникать через листья [43]. Так, вирулентность *F. graminearum* на листьях ячменя зависела от активности грибных белков DCL, ответственных за генерацию патогенных дцРНК, интерферирующих экспрессию ряда генов хозяина, таких как *HvEOL1*, *HvBAK1*, *HvSERK2* и *BdSERK2*, связанных с регуляцией этилен-жасмонатной сигнальной системы [83]. Аналогичный эффект наблюдался и у гриба *S. sclerotiorum*: мутанты по генам *AGO2* [84] и двойные мутанты по гену *DCL 2/4* [85] имели замедленный рост и пониженную вирулентность. Подавление уровня транскриптов гена *AGO2* также снижало вирулентность у грибов *Valsa mali* и *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* [86]. Хотя единичные нарушения в работе генов *DCL*, *RdR* гриба *Colletotrichum higginsianum* не влияли на вегетативный рост гриба, двойные мутанты  $\Delta dcl1$ ,  $\Delta dcl1\Delta dcl2$  и мутанты  $\Delta ago1$  демонстрировали серьезные дефекты в морфологии конидий [87]. Гриб *V. dahliae* также использует малые РНК в качестве эффекторов, встраивая их в хозяйский белковый комплекс RICS, содержащий белки AGO1, арабидопсиса для подавления его (растительных) генов. Обнаружена способность ряда малых РНК гриба *B. cinerea* (Vc-sRNAs) подавлять накопление транскриптов ряда генов арабидопсиса и томатов, отвечающих за работу РНКи (AGO1) и иммунитета [42]. А двойное отключение работы генов и *Bcdcl1*, и *Bcdcl2*, вызывающее неспособность мутантов продуцировать Vc-siRNAs, подавляло его патогенность [42].

При анализе сортов хмеля *Humulus lupulus* L., контрастных по устойчивости к грибу *Verticillium nonalfalfae*, обнаружено дифференциальное накопление транскриптов грибных генов, ответственных за РНКи, в зависимости от локализации в различных органах растения, а с использованием методов высокопроизводительного секвенирования и обширного биоинформационного анализа идентифицировали до 156 предшественников малых РНК [88].

Обнаружено, что мРНК, транскрибируемые *Phitophthora sojae* и способствующие трансляции патогенных эффекторов РНК (PSR1 и PSR2), нацелены на РНКи хозяина. PSR1 ингибирует биогенез miРНК, тогда как PSR2 нацелен исключительно на siРНК [21]. Аналогичным образом, *B. cinerea* продуцирует малые РНК (Vc-siRNAs) во время инфекции, чтобы вызвать у томата и ароматического “замалчивание” генов, кодирующих митоген-активируемую протеинкиназу-1 (mitogen-activated protein kinase 1 – MPK1) и MPK2, пероксиредоксин (peroxiredoxin-2F – PRXIIIF) и киназу, связанную с клеточной стенкой (cell wall-associated kinase – WAK). У томата Vc-siRNAs подавляли накопление MAPKKK4 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4), напрямую влияющую на устойчивость к грибу *B. cinerea* [42]. Аналогичным образом возбудитель ржавчины пшеницы *P. striiformis* f. sp. *tritici* (Pst) продуцирует miРНК-подобную РНК 1 (Pst-milR1), которая подавляет защиту пшеницы во время ее взаимодействия с инфекционными структурами гриба. “Замалчивание” предшественника Pst-milR1 повышало устойчивость пшеницы к инфекции Pst [23]. Анализ miРНК в растениях пшеницы, инфицированной грибом *Puccinia striiformis*, показал, что большая их доля, синтезируемая в патогенной системе, направлена против генов, ответственных за экспрессию растительных белков, имеющих функциональные домены RabGAP/TBC, “цинковые пальцы”, цистеин-богатой рецептор-подобной протеинкиназы [89]. Выдвигается предположение, что эти miРНК вовлечены в межгенные взаимодействия между хозяином и патогеном [89]. Кроме того, в транскриптом, вырабатываемом возбудителями мучнистой росы злаков *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*) и *B. graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*), данные последовательности РНК, полученные из инфицированной пшеницы, выявили шесть малых РНК от *Bgt* и пятнадцать малых РНК от *Bgh*. Последовательности их нуклеотидов были комплементарны большому числу растительных генов, что указывает на их многофункциональность. Большая часть таких генов кодирует белки, включенные в процессы транспорта ацил-КоА, биосинтеза убихинона, прорастания семян и макромолекулярный катаболизм. Эти грибные малые РНК предсказали мишени, присутствующие исключительно в растениях, с функциями, связанными с изменениями первичного метаболизма [95]. Это доказало наличие транспорта РНК между представите-

лями разных царств живого мира [95]. Эффективность переноса малых РНК от растений в мицелий патогенных грибов и последующий запуск РНКи доказан с использованием модифицированных грибов *M. oryzae*, *Venturia inaequalis*, *Ph. infestans*, *Histoplasma capsulatum* и *Blastomyces dermatitidis*, содержащих ген зеленого флуоресцирующего белка (GFP), а также растений, генерирующих антиGFP малых РНК [90]. Наконец, у биотрофного оомицета *Hyaloperonospora arabidopsidis* обнаружено до 34 малых РНК, способных к транслокации в клетках и подавлению хозяйских генов-мишеней. При этом арабидопсис, мутантный по биогенезу малых РНК, был восприимчив к грибу *H. arabidopsidis*, демонстрируя тем самым их важную роль в иммунитете растений [91]. Группа Х. Джина показала, что некротроф *B. cinerea* продуцирует малые РНК во время инфекции, отключающие гены РНКи хозяина [42]. Следовательно, взаимодействие хозяина с патогеном постоянно развивается и РНКи стала эволюционно приобретенным преимуществом не только для растений, но и для патогенов. Между фитоиммунным ответом и развитием инфекции патогена сохраняется баланс, обусловленный работой РНКи [78].

Другие участники растительного метабиома, вирусы или эндосимбионты, могут вовлекаться во взаимное воздействие на работу РНКи [92]. Так, показано, что колонизация корней орхидей эндозитным грибом *Piriformospora indica* усилила накопление в листьях мРНК, кодирующей белки, содержащие домен NBS-LRR, снижая уровень miR524650, miR1510a\*, miR2118 и miR5246, направленных против транскриптов этих белков, и обеспечила лучшую устойчивость растений к бактериальной гнили, вызываемой *Erwinia chrysanthemi* [93]. Особый интерес в связи с отмеченной выше коррекцией грибом *Piriformospora indica* эффективного функционирования фитоиммунитета представляет то, как малые РНК могут регулировать симбиотические взаимоотношения между растением и микоризными грибами, поскольку они, также, как и все представители царства грибов, обладают всеми необходимыми компонентами РНКи [94]. Во время установления симбиоза большинство малых РНК эндосимбионтов нацелена на систему защиты растений. Например, при формировании симбиотических отношений эктомикоризного гриба *Pisolithus microcarpus* с корнями эвкалипта *Eucalyptus grandis* экспрессируется Pmic\_miR-8, которая, как показывают авторы, в последствии, обнаруживается в клетках хозяина [95]. Сравнение нуклеотидных последовательностей Pmic\_miR-8 с комплементарными в геноме арабидопсиса последовательностями ДНК показало, что она может узнавать гены, кодирующие семейство ДНК-нуклеаз K00246 и L01882, а также фрагмент домена NB-ARC гена, кодирующего защитный ген E03170. Показано регулируемое эндозитными грибами *Trichoderma atroviride* и *T. crementum* изменение уровня транскриптов

miR398, miR167 и miR159 в растениях пшеницы в ответ на инфицирование продуцирующим микотоксины грибом *Fusarium culmorum*, что способствует защите от патогена [16]. Обнаружено активное участие малых РНК в регуляции взаимоотношений арбускулярных микоризных грибов с люцерной *Medicago truncatula* [96], томатами *Solanum lycopersicum* [97] и рисом *Oryza sativa* [98]. При этом большинство индуцированных miРНК были нацелены на гены, ответственные за гормональный ответ. Например, miРНК E4D3Z3Y01BW0TQ нарушала функционирование сигнального пути гибберелловой кислоты [99].

Известно, что у грибов РНКи способна активироваться посредством либо процесса “подавления”, либо за счет биогенеза siРНК, в зависимости от вида гриба, стадии развития, а также от типа целевой последовательности. У гриба *Neurospora crassa* подтверждено наличие нескольких путей “замалчивания” генов [100]. Ряд связанных с подавлением процесса квеллинга (qde) исследований на мутантах *N. crassa* указывает на присутствие малых РНК в механизме подавления, а также на деффектность мутантов qde-1 по RdR. Кодирующие RdR гены *SDE1/SGS2 Arabidopsis thaliana* и *EGO-1* у *Caenorhabditis elegans* оказались необходимы для пост-транскрипционного глушения генов (*PTGS*) и РНКи, соответственно. Ген *qde-2*, кодирующий белковый продукт с доменом piwi-PAZ (PPD или AGO), важный и консервативный компонент РНКи в различных эукариотах [100].

Некоторые компоненты РНКи могут отсутствовать у ряда видов грибов, например, из таксонов *Ustilaginomycotina*, *Saccharomycotina*, *Wallemiomycetes* и клады *Microsporidia*, что указывает на необязательность РНКи для них и, вероятно, их способность обходиться без этого физиологического механизма, а в случае с патогенными формами – использовать хозяйскую систему “замалчивания” генов в своих целях [101]. У биотрофа *Erysiphe necator* отсутствуют белки RdR и ДНК-метилаза [91]. Возбудитель головни кукурузы *Ustilago maydis* утратил гены, кодирующие основные компоненты РНКи. В то время как родственные ему виды, такие как возбудитель головни ячменя *Ustilago hordei*, имеют функционально эффективную РНКи [102]. М. Дебишир с соавт. [14], изучая малые РНК гриба *S. sclerotiorum*, отмечают, что почти все идентифицированные локусы, отвечающие за их генерацию, были связаны с ретро-транспозонами, в особенности с LINE1 (до 40%). Они находились вне кодируемой области генома, при этом область, включающая эти локусы, оказалась более полиморфной, что говорит о быстро эволюционирующей совокупности малых РНК-эффекторов, связанных с мобильными элементами генома. Высказывается мнение, что случайное действие малых РНК патогена на иммунитет хозяина дает патогену селективное преимущество [103]. С другой стороны, потеря компонентов, отвечающих за РНКи у грибов, вероятно, связана с

эволюцией вирулентности, так как свободное движение ретротранспозонов (отсутствие контроля за движением мобильных элементов) может обеспечивать быстрые адаптационные ответы на стрессовые воздействия среды [78].

Еще одно интересное явление — это синтез рядом видов патогенных грибов малых РНК, получивших название miРНК (microRNA-like RNA — miРНК-подобная РНК) [42]. Например, miR1 представлена только у *Puccinia striiformis* Westend, а у других возбудителей ржавчины *Puccinia graminis* Persoon и *P. triticea* Erikss. она отсутствует. Соответственно, образование MILR1 только у одного вида может быть результатом его эволюции и адаптации к паразитированию на строго определенном виде [82]. Данная miРНК участвовала в “междолевой” РНКи, воздействуя на экспрессию гена *PR2* ( $\beta$ -1,3-глюканаза) в пшенице. Ее высокий уровень, снижая экспрессию гена *PR2*, усиливал чувствительность пшеницы к ранее авирулентному штамму патогена, тогда как ингибирование накопления предшественника miРНК укрепляло устойчивость пшеницы к вирулентному штамму *P. striiformis* [23].

**Фитогормоны и РНКи.** В функционировании РНКи в растениях важное место занимают фитогормоны. Так как салициловая кислота (СК) — один из ключевых факторов, ответственных за индукцию системной приобретенной устойчивости (СПУ) к биотрофам интерес представляет ее способность участвовать в работе РНКи. Координированная работа белков, вовлеченных в СПУ, с белками РНКи, пока не полностью расшифрована. Основные участники РНКи, такие как эндонуклеазы DCL2, DCL3 или DCL4, как оказалось, не связаны с СПУ, индуцированной СК или ее функциональными аналогами [104], тогда как накопление транскриптов гена *RdR1* происходило под влиянием СК и зависело от экспрессии белка NPR1 [105]. Соответственно, СК-индуцированная устойчивость связана с РНКи через ген *RdR1* и координируется его продуктом. В свою очередь, экспрессия гена *RdR1* усиливала экспрессию генов, кодирующих *RdR6* (компонент РНКи) и альтернативную оксидазу (про-/антиоксидантная система). Такая координация по всей видимости является гибкой, поскольку у *A. thaliana*, накапливающих вирусный эффекторный белок 2b, экспрессия гена *AGO2* становилась салицилат чувствительной [65]. Буквально недавно обнаружено, что СК и miR403a, комплементарная фрагменту гена *NbAGO2*, эффективно регулировали экспрессию гена *NbAGO2* у табака *Nicotiana benthamiana* [106]. Уровень транскриптов гена *AtRdR1* выше у *A. thaliana*, предварительно обработанной СК, тогда как ген *AtRdR2* не чувствителен к ней [104]. Ген *StRdR1 S. tuberosum* показал высокую чувствительность к СК [107]. У перца *Capsicum annuum* L. экспрессия гена *CaRdR1* стимулировалась под влиянием СК, абсцизовой кислоты (АБК), пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [108]. Анализ *in silico* промоторной части

генов семейства *RdR1-6* различных видов растений показал, что основными их транскрипционными факторами являются белки MYB44, AS1/AS2 и WRKY1 [109]. Подавление экспрессии *NaRdR1*, *NaRdR2*, но не *NaRdR3* повышала восприимчивость табака *Nicotiana attenuata* к грибу *Fusarium brachygibbosum* [110].

Важную роль в СК регулируемой устойчивости играют miR160. Так, линии картофеля с подавленной экспрессией miR160 не запускали СПУ, регулирующую СК. В связи с тем, что сигнальные системы, регулируемые СК и ауксинами, проявляют противоположную направленность, можно полагать, что miR160 вовлечена в их перекрестное взаимодействие [25]. Показана важность TAG-производной 21-nt siРНК, опосредовано индуцированной СК в метилировании ДНК у арабидопсиса [111].

Участие АБК в защите растений от грибной инфекции ранее обсуждалось [112]. Этот фитогормон, являясь регулятором ответных реакций на, как правило, абиотический стресс, вовлекается и в фитоиммунные процессы, препятствуя колонизации патогенов в растительных тканях посредством регуляции работы устьиц, экспрессии генов про-/антиоксидантной системы, а также синтеза каллозы. Наконец, обнаружена важная роль АБК в регуляции работы РНКи и соответственно формировании фитоиммунитета [113]. У *A. thaliana*, гиперсинтезирующей АБК, индуцируется накопление транскриптов генов *AtAGO4* и *AtAGO10*. Хотя в физиологических реакциях СК и АБК часто обсуждаются с позиции антагонистов, они могут совместно модулировать различные защитные ответы, в том числе и РНКи, на уровне регуляции экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы (транс-факторы), а также основные белки РНКи. Поскольку только в мутантных по уровню СК растениях АБК вызывала экспрессию генов *AGO1* и *RdR1*, вероятно этот фитогормон запускает экспрессию генов каскада сигналов салицилат-зависимой экспрессии, а СК регулирует интенсивность накопления защитного продукта [46]. Выявлено, что растения с высоким уровнем синтеза AGO1 слабо чувствительны к АБК и, наоборот, при нарушении синтеза AGO1, формируют гиперчувствительность к АБК.

Жасмонаты индуцируют в растениях устойчивость к некротрофам. В отношении биотрофных и гембиотрофных патогенов их роль противоречива. У табака в формировании устойчивости по жасмонатному сигнальному пути к грибу *F. brachygibbosum* оказалось критичным наличие белка NaAGO4 [110]. Показано, что активация бактериями *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 устойчивости *A. thaliana* по жасмонатному сигнальному пути находится под контролем miR846. Белок AGO4 оказался важным в формировании защиты у *N. attenuata* к грибу *Fusarium brachygibbosum*, а “замалчивание” его синтеза нарушало работу жасмонатной сигнальной системы [110]. Такое нарушение происходило вслед-

ствии отключения синтеза ЖК, а устойчивость к грибу восстанавливалась после обработки растений ЖК. Таким образом, полученные данные дополнительно объясняют, как защитные сигнальные системы и РНКи могут совместно работать в растениях.

Для более полной оценки важности молекулярных взаимоотношений между защитной системой организма и патогена необходимы дальнейшие детальные молекулярные, биохимические и структурные исследования супрессоров патогенной природы. Но уже известные данные говорят о сложной коэволюционной “гонке вооружений” между хозяевами и их патогенами. Со временем эти знания могут быть реализованы для развития эффективных стратегий фитозащиты.

**Прикладной аспект.** Фундаментальная защитная роль РНКи в растениях, в первую очередь, проявляется в формировании уникальной естественной защитной стратегии организма и описывается как хозяин-индуцированный генный сайленсинг (ХИГС, host-induced gene silencing, HIGS), эффективно работающий не только против вирусов, но и фитопатогенных грибов и оомицетов [64]. На современном этапе исследований описано формирование ХИГС с вовлечением хозяйских белков, отвечающих за РНКи, на пшенице и ячмене, инфицированных возбудителем мучнистой росы биотрофом *Blumeria graminis* [9], на пшенице – возбудителем ржавчины *Puccinia tritici* [114], на пшенице и банане, инфицированных грибами рода *Fusarium* [12], картофеля и перце, инокулированных возбудителями фитофтороза *P. infestans* [115] и *P. capsica* [116], соответственно, а также на томате и арабидопсисе, инфицированных возбудителем вертициллез [117].

Природный ХИГС предполагает возможность искусственной модификации генома хозяина с помощью внедрения в него последовательности, отвечающей за транскрипцию шпилечной дцРНК, содержащей информацию о целевом гене патогена, который в последствии планируется заглушить. Идеи о возможности терапевтического использования РНКи для эффективного подавления экспрессии генов в организмах появились уже вскоре после его открытия [118]. В ранних работах РНКи в основном использовалась для повышения устойчивости растений к болезням путем внедрения в геном транскрибируемых фрагментов ДНК, содержащих палиндромные последовательности генов эффекторов. Так, в обзорной работе Sang H. и Kim J. [119] приводится не менее 11 вариантов эффективных технологий фитозащиты с использованием методов РНКи.

Искусственные дцРНК, генерируемые растениями, способны индуцировать “замалчивание” генов у грибов, нематод, насекомых и оомицетов, что указывает на их успешный перенос от хозяина в клетки патогенов [71]. РНК-структуры, содержащие гомологии к генам синтазы хитина, важного

компонента клеточной стенки грибов, внедренные в геном растений, обеспечивали их защиту от гриба *S. sclerotiorum* [72]. Пшеница, накапливающая дцРНК против патогенных генов, кодирующих хитин-синтазы (Chs3b) или  $\beta$ -1, 3-глюкансинтазы [83], может вызывать серьезные дефекты в формировании клеточных стенок гифов *Fusarium graminearum* и *Fusarium culmorum* соответственно и демонстрируют повышенную устойчивость к этим патогенам. Экспрессия трех конструкций РНК в двух различных сортах пшеницы трансгенных по *FgCYP 51* (гены биосинтеза эргостерола) и *FgChs3b* (ген хитин-синтазы) обеспечила высокую устойчивость культуры к фузариозу колоса и ограничила развитие гриба [120]. С использованием специфических векторов, содержащих сенс- и антисенс-фрагменты гена, кодирующего MAP-киназу 1 (Pathogenicity MAP Kinase 1, РМК1) *Rhizoctonia solani*, получены растения риса, показавшие снижение степени поражения грибом по технологии ХИГС [121]. Экспрессия дцРНК, комплементарной мРНК MAP-киназы (PtMAPK1, 520 нп) или циклофилина (PtCYC1, 501 нп), возбудителя ржавчины *Puccinia tritici* в пшенице показала эффективное глушение соответствующих генов и значительное последующее за глушением генов снижение патогенности грибов. Пролиферация клеток мицелия *P. tritici* была снижена вместе с уменьшением числа транскриптов генов-мишеней грибов в устойчивых растениях на основе РНКи [122].

Супрессия факторов вирулентности (Ave1, Sge1 и NLP1) гриба *V. dahliae* посредством ХИГС снижала восприимчивость арабидопсиса и томатов к вертициллезу [6]. Растения томатов, генерирующие фрагменты генов PEX6, кодирующих белок фактора биогенеза пероксиосом 6, принадлежащий к семейству белков АТФазы (FoPEX6-RNAi) и  $\beta$ -1,3-глюкозилтрансферазы (FoGAS1-RNAi) гриба *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), важных в биогенезе клеточной стенки и морфогенезе мицелия, проявили устойчивость к этому грибу [123].

В качестве эффективного метода искусственного запуска целевого РНКи предлагается и транспластомная модификация растений, когда дцРНК продуцируются в пластидах, где уровень экспрессии дцРНК может достигать 0.4% от общего уровня РНК [124].

Глушение генов 1,3- $\beta$ -глюкозилтрансферазы (*BgGTF1* и *BgGTF2*) с помощью технологии вирус индуцированного генного сайленсинга (ВИГС) на базе вируса мозаики ячменя (BSMV) значительно замедлило рост гриба *P. striiformis* f. sp. *tritici* [125]. Ячмень, накапливающий дцРНК, нацеленную на ген авирулентности *Avra10*, соответствующий гену устойчивости *Mla10*, показал снижение уровня транскриптов генов возбудителя мучнистой росы *B. graminis* [126]. Лocus устойчивости к милдью (*Mlo*) кодирует трансмембранный белок, действующий как отрицательный регулятор фитоим-

мунитета в неинфицированных тканях, участвует в защите от гибели клеток, а также в ответах на биотические и абиотические стрессы [127]. Подавление экспрессии гена *TaMlo* пшеницы через ВИГС формировало устойчивость пшеницы к мучнистой росе [128]. В другой работе одновременный нокаут у пшеницы трех гомеологических генов *TaMlo* с использованием технологии геномного редактирования TALEN (transcription activator-like effector nuclease) и мутации в аллеле *TaMLO-A1*, используя комплексную технологию CRISPR-Cas9 и РНКи, также формировало устойчивость [129].

Нацеливание на гены метаболизма жирных кислот у патогена с помощью РНКи оказалось важной стратегией для создания устойчивости к грибковым болезням. РНКи-опосредованное подавление гена риса *OsSSI2* привело к повышенной устойчивости к *Magnaporthe grisea*. Кроме того, она могла быть достигнута подавлением генов *OsFAD7* и *OsFAD8*, представляющих десатуразу жирных кислот [130]. Показано, что в пшенице 24 вида miРНК участвуют в ответах на атаку *B. graminis* f. sp. *tritici* [131]. Малые РНК *Osa-miR7695* и *Osa-miR7696* противоположно регулировали накопление ассоциированного с иммунитетом белка *OsNramp6* в ответ на инфицирование *M. oryzae* в растениях риса [132].

С использованием метода РНКи доказана важность рецепции в растениях патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП), в частности хитина, в дальнейшем развитии оксидативного взрыва в зоне инфицирования. Сайленсинг гена *SEViP*, ответственного за связывание хитоолигосахаридов, в растениях *Oryza sativa* с помощью технологии ХИГС ингибировал образование активных форм кислорода и экспрессию генов, участвующих в иммунном ответе [133]. С использованием антисенс-конструкций к генам *FUM1* и *FUM8* фузинозин-продуцирующих штаммов *Fusarium verticillioides* на кукурузе позволили многократно снизить концентрацию токсина [134].

Возможность запускать механизм РНКи посредством экзогенного применения целевой дцРНК в качестве спрея с целью нарушения экспрессии жизненно важных генов вредителей и патогенов открывает новые возможности в развитии современных экологически чистых технологий и стратегий защиты растений, не связанных с растительным трансгенозом и созданием генно-модифицированных растений. Это направление фитозащиты развивается очень быстро и описывается термином “индукция замолкания генов с помощью опрыскивания” или спрей индуцированного генного сайленсинга (СИГС, spray induced gene silencing, SIGS). Суть этой технологии заключается в распылении препарата, содержащего целевую дцРНК, по поверхности, например, листа растений [135]. Уникальность этого метода сочетается также с тем, что с одной стороны сами дцРНК, а также их носители могут характеризоваться

своими свойствами ПАМП и запускать защиту растительной клетки, связанную с классическими сигнальными системами защиты РТИ и ЕТИ, опосредованными активацией рецепторных киназ SERK (Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase) и MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), взаимодействующих с РНКи. С другой стороны, дцРНК могут проникать в ткани растения, амплифицироваться в клетках, перерабатываться в siРНК, как правило 22 нт, и индуцировать природные механизмы РНКи и запустить замолкание целевых генов вредителя или патогена после аппликаций препаратами дцРНК поверхности тканей.

Использование дцРНК в виде спрея имеет множество преимуществ перед химическими препаратами. В связи с высокой комплементарностью дцРНК к определенному фрагменту целевого гена, продукт которого отвечает за вирулентность или жизненно-важные функции патогена, препараты на их основе могут действовать специфически и есть возможность использования в одном препарате нескольких форм дцРНК, направленных на различные области гена или даже на разные гены целевого организма. Такая схема принципиально отличается от использования генетической модификации самих растений, но требует разработки методов доставки “РНКи-пестицида”, в том числе и “РНКи-фунгицида”, защиты РНК-молекул от солнечного света, смыва дождем. При создании препаратов на основе РНКи необходимо помнить и о том, что регуляция замалчивания защитных генов в растениях, заселенных вредителями, может быть связана и с эндосимбионтным микробиомом, а также виромом, которые могут регулировать РНКи в растительном метабиоме (рис. 2).

Стратегия СИГС считается экологически чистой и впервые применена в работе Коч с соавт. [135], где, используя дцРНК, нацеленную на ген цитохрома P450 (*CYP3*) в *F. graminearum*, наблюдали подавление роста патогена в непосредственно опрысканных этой РНК листьях пшеницы. В другой работе эта же группа исследователей усовершенствовала метод, что позволило избавить ячмень от корневой гнили [136]. Сравнение методов ХИГС и СИГС на модельных растениях арабидопсиса и ячменя показало проявление большей эффективности в защите от колонизации грибом последней [137]. Хотя технология СИГС активно изучается [138], исследования по ее использованию все еще находятся на стадии накопления материала. При этом можно полагать, что внешнее воздействие может не только непосредственно подавлять функционирование генов патогена, но и воздействовать на функцию хозяйского генома.

Так, сообщалось об успешном применении метода СИГС с использованием видоспецифических дцРНК на рапсе (*Brassica napus*) для защиты от *B. cinerea* и *S. sclerotiorum* [139]. При внесении

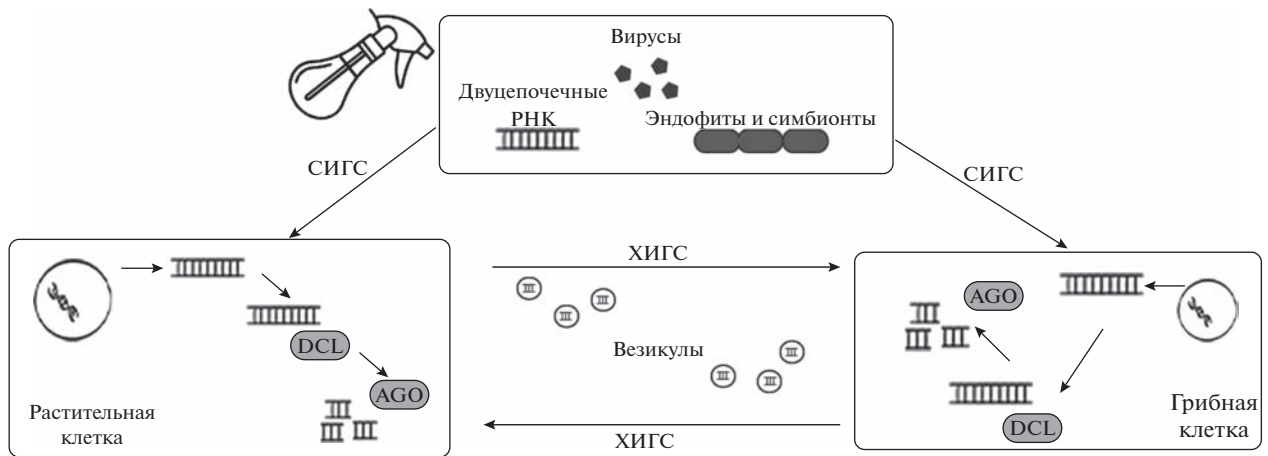


Рис. 2. Схематическое представление работы механизма РНК-интерференции в патогенной системе растение – гриб и возможность ее коррекции.

дцРНК, комплементарной гену *CYP51*, в жидкую культуру *F. graminearum* наблюдали слабый рост гриба и изменение его морфологии. Создание линий *A. thaliana* и ячменя, экспрессирующих дцРНК, привело к значительному повышению их устойчивости. Рост мицелия был ограничен в местах инокуляции патогена, а инокулированные зерновки ячменя практически свободны от инфекционных структур. Обработка *in vitro* спорами *F. graminearum* дцРНК длиной 791 п.н, нацеленной на ген *FgCYP51* (ген биосинтеза эргостерола – цитохром Р450 ланостерол С-14 $\alpha$ -деметилазы), в культуре, а также *in vivo* на ячмене подавляла рост грибов как в областях, где распылялась дцРНК, так и в дистальных частях листьев [135]. В листьях томатов, клубники, винограда, салата, лука, розы и арабидопсиса подавление экспрессии грибного гена *BcDCL1-2* гриба *B. cinerea* с использованием целевых дцРНК и технологии СИГС значительно снижало развитие серой гнили [139]. Этот подход открыл новые возможности в развитии экотехнологий для улучшения растений за счет подавления специфических генов, продукты которых сопровождают или даже усугубляют развитие стрессового фактора. В этой связи наиболее перспективным является экзогенная доставка компонентов РНКи, исключая необходимость в модификации генома сельскохозяйственных культур, и который может быть использован против практически любого патогена и вредителя, реагирующего на подходы РНКи [71].

Отмечены положительные эффекты экзогенного использования молекул РНК против фитопатогенных грибов аскомицетов [138]. СИГС с использованием дцРНК, нацеленных на гены *FgAGO* и *FgDCL* гриба *F. graminearum*, способствовал защите листьев ячменя от инфекции [140]. Аналогично, вирулентность *F. asiaticum* снизилась после распыления на колеоптили пшеницы дцРНК, нацеленной на ген миозина 5 [140]. В этом случае

молекулы дцРНК, комплементарные нескольким регионам целевого гена, оказывали непосредственное влияние на рост мицелия, жизнедеятельность и вирулентность гриба. В связи с неспособностью гриба *F. asiaticum* поддерживать синтез вторичных малых РНК экспрессия целевого гена восстанавливалась после того, как все молекулы экзогенной дцРНК были истрачены. Продолжительность защитного эффекта препарата была дольше, если дцРНК изначально попадали в растения. Это объяснялось тем, что в растительных клетках в отличие от клеток гриба дцРНК могут амплифицироваться.

Способность дцРНК предотвращать и противодействовать инфекции *B. cinerea* проверена на винограде *Vitis vinifera*, где применялись три независимых подхода для доставки дцРНК, в частности с использованием в качестве мишени экспрессии грибной ген *BcDCL1/2* [71], а именно: опрыскивание листьев, адсорбция дцРНК на черешках и послеуборочное опрыскивание гроздей. Важно заметить все 3 метода снижали вирулентность *B. cinerea* и, соответственно, развитие серой гнили не только на растениях, но и плодах [141]. Торможение роста гриба *B. cinerea* на поверхности фруктов, овощей и цветов после их обработки дцРНК на основе генов *BcDCL1/2* показывает потенциал экзогенной дцРНК как нового поколения экологически безопасных препаратов для борьбы с патогенами и при хранении. Эти результаты демонстрируют, что дцРНК мобильна, а экзогенное применение дцРНК может послужить основой для разработки новых подходов в создании препаратов для защиты сельскохозяйственных культур, в том числе и от грибковых заболеваний, как в полевых условиях, так и в пост уборочный период. Причем, применение экзогенных дцРНК обеспечивает в полевых условиях более краткосрочную защиту в сравнении со временем послеуборочного хранения, где продукты не подвергаются воздействию ультрафиолетового излучения. Но, к сожалению



нию, эффективные протоколы для использования препаратов на основе дцРНК при хранении фруктов и овощей пока не определены.

В работе [90] описывается ряд примеров конструирования генно-инженерных векторов для запуска РНКи в растениях и подавления роста и развития патогенных грибов. Таким образом, экзогенное применение молекул дцРНК с потенциалом запуска РНКи — эффективный инструмент в современных платформах защиты и улучшения урожая. При явном положительном защитном эффекте целевых дцРНК в экспериментальных условиях остаются вопросы по подбору гиперпродукторов дцРНК, массовому накоплению целевого продукта, обеспечению его сохранности и использованию в полевых условиях и в условиях хранения. В обзорной работе [142] описано 9 вариантов доставки дцРНК в растения, преимущественно для защиты от насекомых, но по всей видимости некоторые из них можно применить и в отношении патогенов.

Так как специфичность РНКи зависит от идентичности последовательности между малыми РНК и мРНК-мишенями, существует риск нецелевого эффекта, который может привести к замалчиванию других транскриптов, содержащих достаточную гомологию с такими малыми РНК [143]. Можно разработать дцРНК, нацеливающиеся на несколько групп патогенов, как например произошло с дцРНК, нацеленными на ген  $\beta 2$ -тубулина гриба *Fusarium asiaticum* [144]. Эти дцРНК проявили эффективность дополнительно и против *B. cinerea*, *M. oryzae* и *Colletotrichum truncatum* в клетках пшеницы, огурца, ячменя и сои соответственно [144], по всей видимости, связанной с относительно высокой консервативностью ДНК, ответственной за экспрессию соответствующего продукта и даже фрагмента (домена) этого продукта, с целью выключения которого подобрана конструкция. Но, поскольку такое отклонение от цели может произойти даже на хозяине, необходим внимательный подбор эффективных дцРНК к генам-мишеням, исключая их гомологию с другими нецелевыми хозяйскими транскриптами и генами эндофитной и симбиотрофной микробиоты. Искусственное снижение экспрессии гена *PhMLO1* действительно повысило устойчивость петунии к мучнистой росе, но нокдаун привел к плейотропным эффектам на рост и развитие, что говорит о необходимости внимательного отношения при разработке стратегий создания устойчивости петунии к возбудителю мучнистой росы с помощью РНКи [145]. По всей видимости, продукт гена *PhMLO1* кроме формирования чувствительности к мучнистой росе выполняет и другие важные физиологические функции в растении. К сожалению, пока представленные технологии можно применять только к культурам, доступным для эффективной трансформации. Кроме того, у общества все еще есть опасения по поводу потребления продуктов, полученных из генно-модифицирован-

ных организмов, находящихся под строгим контролем. Нельзя забывать и о разностороннем эффекте дцРНК в РНКи, связанных с генами, кодирующими белки рецепции и защиты.

При разработке стратегии противогрибковой защиты на основе РНКи необходимо учитывать жизненную важность гена-мишени. Так, дцРНК, полученная из нескольких областей гена *Myosin 5* или  $\beta 2$ -тубулина гриба *Fusarium asiaticum*, различалась по эффективности [146]. Использование *in vitro* дцРНК, направленных против генов, кодирующих аденилатциклазу, альфа и дельта субъединицы ДНК-полимеразы, грибов *F. oxysporum* f. sp. *cubense* и *Mycosphaerella fijiensis* показало их противогрибную активность [147]. Искусственный нокаут гена *DMR6* (*Downy Mildew Resistance 6*) в растениях базилика *Ocimum basilicum* с привлечением технологий CRISPR/Cas9 и РНКи подавлял развитие возбудителя ложной мучнистой росы до 93% [148].

Важным моментом в последующем использовании дцРНК в РНКи на основе СИГС в производственных целях является подходы к их наработке. На современном этапе показана возможность наработки дцРНК на культурах *E. coli* и *P. syringae*, а также в клетках дрожжей *Yarrowia lipolytica* и *Sacharomyces cerevisiae* [149]. Штамм *E. coli* HT115 (DE3), содержащий про-фаг  $\lambda$ DE3, кодирующий индуцируемый изопропил  $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) ген полимеразы T7 и дефицитный по РНКазе III, активно используется для получения большого количества дцРНК, с последующим автолизом эффективных против *Aspergillus flavus* [150]. Выделенная из такой линии бактерий дцРНК, успешно подавляла выработку грибных афлатоксинов [150]. Другая бактериальная культура *P. syringae* Van Hall, содержащая RdR бактериофага  $\phi$ i6 [151], позволяла синтезировать большие молекулы дцРНК (>2600 н.о.), стабильные которых поддерживались до 20 дней [150]. Дрожжи *Y. lipolytica* показали себя как удобный продуцент для производства и доставки дцРНК-ORF89 [148]. Экспрессионная система на основе культуры дрожжей *S. cerevisiae*, лишённых генов DCL-2 и AGO-2, оказалась также достаточно удобной и по эффективности сравнимой с бактериальными культурами [152].

В связи с важностью стабилизации дцРНК ряд работ показали возможность его осуществления с использованием наночастиц [138, 140]. В недавнем исследовании сообщалось о получении наногидрогеля, содержащего нуклеазу Cas9 и одноплавленную РНК [153]. Загрузка дцРНК в слоистые нанослои двойной гидроксидной глины позволяет обеспечить устойчивую их сохранность до 30 дней [154].

**Симбионты и эндофиты.** Симбионты и эндофиты могут быть как индукторами экспрессии претРНК через механизм ПАМП-индуцированного защитного ответа в растениях (ХИГС), так и

непосредственными генераторами дцРНК. Штамм *Bacillus* AR156 запускал устойчивость, подавляя накопление miR472 и активируя опосредованный белками, содержащими домен NB-LRR, иммунитет у арабидопсиса [155]. Инокуляция арабидопсиса клетками *B. amyloliquefaciens* FZB42 подавляла специфическую экспрессию miR846, индуцируя устойчивость через жасмонат-зависимый сигнальный путь [155]. В общей сложности обнаружено до 363 малых РНК, дифференциально экспрессируемых в кукурузе в ответ на инокуляцию штаммом FZB42 в сравнении с мутантами FZB42ΔsfpΔalss с подавленным синтезом сурфактина и не способными запускать фитозащитную реакцию [156]. Среди них четыре miРНК (zma-miR169a-5p, zma-miR169c-5p, zma-miR169i-5p и zma-miR395b-5p) были выбраны в качестве ассоциированных с устойчивостью растений к патогенам [156]. Многие эндофиты также способны давать дополнительные преимущества хозяевам, включая устойчивость к вредителям и патогенам за счет производства антибиотиков, антимикотических и антифидатных белков и метаболитов.

Потенциалом для исследований может быть также оценка работы РНКи в условиях формирования многоуровневого растительного метабиома, состоящего как минимум из растения и патогена и/или эндофита и/или симбионта. Поскольку феномен РНКи присущ всем эукариотам, следует ожидать, что при формировании тесных, в особенности паразитических и/или симбиотных отношений, этот защитный для отдельного организма, казалось бы, механизм отключения генов вступает во взаимодействие с подобным другого организма. С одной стороны, так как РНКи является естественным и эффективно работает во всех таксонах живых организмов, фитопатогены такую защиту легко обойти не смогут. С другой, поскольку при использовании экзогенных дцРНК целевые эффекты достигаются без изменения структуры генома хозяина, на них не должны распространяться правовые ограничения, связанные с ГМО. Правда, это не снимает вопросов перспективности и безопасности использования такого экономически выгодного подхода для укрепления устойчивости к вирусам, патогенам и вредителям, поскольку потенциал и безопасность метода аппликаций экзогенной дцРНК слабо исследованы, не все риски известны.

В отличие от других фитозащитных мероприятий, не только химических, но и биологических, очевидные риски для здоровья человека в случае применения технологии РНКи кажутся минимальными, поскольку присутствие молекул дцРНК не способствует накоплению каких-либо белковых продуктов и, следовательно, подход к использованию природного метода РНКи для “замалчивания” синтеза целевых белков считается более предпочтительным по сравнению с традиционными подходами создания генно-модифицированных организмов. Данные по функционированию РНКи

позволят разработать весьма эффективные стратегии борьбы с комплексом патогенов в агроценозе. Известные данные по РНКи говорят об ее эффективности против различных патогенов на сельскохозяйственных культурах и целевые дцРНК можно использовать в качестве базовой модели как удобный, экологически-безопасный и универсальный инструмент для борьбы с болезнями. Такой метод защиты растений может стать хорошей альтернативой синтетическим пестицидам.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ-аспирант № 20-34-90004.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fire A.Z.* // Cell Death Differ. 2007. V. 14. P. 1998–2012.
2. *Romano N., Macino G.* // Mol. Microbiol. 1992. V. 6. P. 3343–3353.
3. *Schuurs T.A., Schaeffer E.A., Wessels J.G.* // Genetics. 1997. V. 147. P. 589–596.
4. *Hamada W., Spanu P.D.* // Mol. Gen. Genet. 1998. V. 259. P. 630–638.
5. *Jorgensen R.A., Cluster P.D., English J., Que Q., Napoli C.A.* // Plant Mol. Biol. 1996. V. 31. № 5. P. 957–973.
6. *Yang L., Mu X., Liu C., Cai J., Shi K., Zhu W., Yang Q.* // J. Integr. Plant Mol. Biol. 2015. V. 57. № 12. P. 1078–1088.
7. *Huang C.Y., Wang H., Hu P., Hamby R., Jin H.* // Cell Host Microbe. 2019. V. 26. № 2. P. 173–182.
8. *Wang J., Mei J., Ren G.* // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. Art. 360.
9. *Dutta S., Kumar D., Jha S., Prabhu K.V., Kumar M., Mukhopadhyay K.* // Planta. 2017. V. 246. № 5. P. 939–957.
10. *Navarro L., Jay F., Nomura K., He S.Y., Voinnet O.* // Science. 2008. V. 321. № 5891. P. 964–967.
11. *Katiyar-Agarwal S., Jin H.* // Annu Rev Phytopathol. 2010. V. 48. P. 225–246.
12. *Zhang T., Zhao J.H., Fang Y.Y., Guo H.S., Jin Y.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 5. Art. 2742.
13. *Tao Z., Liu H., Qiu D., Zhou Y., Li X., Xu C., Wang S.* // Plant Physiology. 2009. V. 151. № 2. P. 936–948.
14. *Derbyshire M., Mbengue M., Barascud M., Navaud O., Raffaele S.* // Mol. Plant Pathol. 2019. V. 20. № 9. P. 1279–1297.
15. *Zhang H., Tao Z., Hong H., Chen Z., Wu C., Li X., Xiao J., Wang S.* // Nat Plants. 2016. V. 2. Art. 16016.
16. *Salamon S., Żok J., Gromadzka K., Błaszczuk L.* // Pathogens. 2021. V. 10. № 11. Art. 1461.
17. *Li F., Pignatta D., Bendix C., Brunkard J.O., Cohn M.M., Tung J., Sun H., Kumar P., Baker B.* // PNAS USA. 2012. V. 109. № 5. P. 1790–1795.
18. *Fukudome A., Kanaya A., Egami M., Nakazawa Y., Hiraguri A., Moriyama H., Fukuhara T.* // RNA. 2011. V. 17. № 4. P. 750–760.
19. *Xiong Q., Ye W., Choi D., Wong J., Qiao Y., Tao K., Wang Y., Ma W.* // Mol. Plant Microbe Interact. 2014. V. 27. № 12. P. 1379–89.
20. *Vetukuri R.R., Whisson S.C., Grenville-Briggs L.J.* // Eur. J. Plant Pathol. 2017. V. 149. P. 771–777.



21. *de Vries S., de Vries J., Rose L.E.* // Genes. 2019. V. 10. № 4. P. 310.
22. *Yin C., Ramachandran S.R., Zhai Y., Bu C., Pappu H.R., Hulbert S.H.* // New Phytol. 2019. V. 222. № 3. P. 1561–1572.
23. *Wang B., Sun Y., Song N., Zhao M., Liu R., Feng H., Wang X., Kang Z.* // New Phytol. 2017. V. 215. № 1. P. 338–350.
24. *Hou Y., Zhai Y., Feng L., Karimi H.Z., Rutter B.D., Zeng L. et al.* // Cell Host Microbe. 2019. V. 25. P. 153–165.
25. *Natarajan B., Kalsi H.S., Godbole P., Malankar N., Thiagarayaseelam A., Siddappa S., et al.* // J. Exp. Bot. 2018. V. 69. № 8. P. 2023.
26. *Luan Y., Cui J., Li J., Jiang N., Liu P., Meng J.* // Planta 2018. V. 247. P. 127.
27. *Yang L., Jue D., Li W., Zhang R., Chen M., Yang Q.* // PLoS ONE. 2013. V. 8. Art. e72840.
28. *Mu X.Y., Liu X.R., Cai J.H., Zhu W.J., Wang Z., Yang Q., You X.* // Russ. J. Plant Physiol. 2018. V. 65. P. 203–210.
29. *Yu X., Hou Y., Chen W., Wang S., Wang P., Qu S.* // Plant Cell Physiol. 2017. V. 58. № 9. P. 1541.
30. *Shen D., Suhrkamp I., Wang Y., Liu S., Menkhaus J., Verreet J.A., Fan L., Cai D.* // New Phytol. 2014. V. 204. P. 577–594.
31. *Zhang H., Yu P., Zhao J., Jiang H., Wang H., Zhu Y. et al.* // New Phytol. 2018. V. 217. P. 799–812.
32. *Cao J.Y., Xu Y.P., Zhao L., Li S.S., Cai X.Z.* // Plant Mol. Biol. 2016. V. 92. P. 39–55.
33. *Yang L., Mu X., Liu C., Cai J., Shi K., Zhu W., Yang Q.* // J. Integr. Plant Biol. 2015. V. 57. P. 1078–1088.
34. *Han G.Z.* // New Phytol. 2019. V. 222. № 1. P. 70.
35. *Ouyang S., Park G., Atamian H.S., Han C.S., Stajich J.E., Kaloshian I., Borkovich K.A.* // PLoS Pathog. 2014. V. 10. № 10. Art. e1004464.
36. *de Vries S., Kloesges T., Rose L.E.* // Genome Biol Evol. 2015. V. 7. № 12. P. 3307–3321.
37. *Wu F., Xu J., Gao T., Huang D., Jin W.* // BMC Plant Biol. 2021. V. 21. № 1. Art. 496.
38. *Han G., Cheng C., Zheng Y., Wang X., Xu Y., Wang W. et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. Art. 4491.
39. *Zhang H., Chen X., Wang C., Xu Z., Wang Y., Liu X. et al.* // Mol. Biol. Rep. 2013. V. 40. P. 6245–6253.
40. *Coursey T., Regedanz E., Bisaro D.M.* // J. Virol. 2018. V. 92.
41. *Liu B., Li P., Li X., Liu C., Cao S., Chu C., Cao X.* // Plant Physiol. 2005. V. 139. P. 296–305.
42. *Zhang B.S., Li Y.C., Guo H.S., Zhao J.H.* // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. Art. 847086.
43. *Wang Q., An B., Hou X., Guo Y., Luo H., He C.* // Front. Microbiol. 2018. V. 8. Art. 2621.
44. *Yin C., Zhu H., Jiang Y., Shan Y., Gong L.* // Cells. 2020. V. 9. P. 363.
45. *Alazem M., Lon N.-Sh.* // Curr. Opin. Vir. 2020. V. 42. P. 1.
46. *Matzke M.A., Kanno T., Matzke A.J.* // Annu. Rev. Plant Biol. 2015. V. 66. P. 243–267.
47. *Xin Y., Ma B., Zeng Q., He W., Qin M., He N.* // Horticult Res. 2021. V. 8. № 1. Art. 154.
48. *Cambiagno D.A., Torres J.R., Alvarez M.E.* // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. Art. 703667.
49. *Lopez Sanchez A., Stassen J.H., Furci L., Smith L.M., Ton J.* // Plant J. 2016. V. 88. P. 361–374.
50. *Luna E., Ton J.* // Plant Signal. Behav. 2012. V. 7. P. 615–618.
51. *Schumann U., Lee J.M., Smith N.A., Zhong C., Zhu J.K., Dennis E.S. et al.* // Epigenetics. 2019. V. 14. P. 1074–1087.
52. *Kong W., Xia X., Wang Q., Liu L.W., Zhang S., Ding L. et al.* // Front. Genet. 2020. V. 11. Art. 460.
53. *Saripalli G., Sharma C., Gautam T., Singh K., Jain N., Prasad P. et al.* // Mol. Biol. Rep. 2020. V. 47. P. 1339–1360.
54. *Geng S., Kong X., Song G., Jia M., Guan J., Wang F. et al.* // Phytol. 2019. V. 221. P. 1023–1035.
55. *Morán-Diez M.E., Martínez de Alba Á.E., Rubio M.B., Hermosa R., Monte E.* // J. Fungi. 2021. V. 7. P. 318–331.
56. *Srikant T., Drost H.G.* // Front. Plant Sci. 2021. V. 11. Art. 606800.
57. *Kinoshita T., Seki M.* // Plant Cell Physiol. 2014. V. 55. P. 1859–1863.
58. *Hubbard M., Germida J., Vujanovic V.* // J. Appl. Microbiol. 2014. V. 116. № 1. P. 109–122.
59. *Espinás N.A., Saze H., Saijo Y.* // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. Art. 1201.
60. *Mallory A., Vaucheret H.* // Plant Cell. 2010. V. 22. P. 3879–3889.
61. *Matzke M., Mosher R.* // Nat. Rev. Genet. 2014. V. 15. P. 394–408.
62. *Astier-Manificier S., Cornuet P.* // Biochim. Biophys. Acta Nucleic Acids Protein Synth. 1971. V. 232. P. 484–493.
63. *Terefe-Ayana D., Yasmin A., Le T.L., Kaufmann H., Biber A., Kühr A., Linde M., Debener T.* // Front. Plant Sci. 2011. V. 2. P. 35.
64. *Nunes C.C., Dean R.A.* // Mol. Plant Pathol. 2012. V. 13. P. 519–529.
65. *Lewsey M.G., Hardcastle T.J., Melnyk C.W., Molnar A., Valli A.A., Urich M.A., Nery J.R., Baulcombe D.C., Ecker D.C.* // PNAS USA. 2016. V. 113. Art. 801–810.
66. *Fang Y., Wang Z., Liu X., Tyler B.M.* // Front. Microbiol. 2022. V. 13. Art. 817844.
67. *De Palma M., Ambrosone A., Leone A., Del Gaudio P., Ruocco M., Turidák L. et al.* // Plants. 2020. V. 9. P. 1777–1791.
68. *Zhang T., Zhao Y.L., Zhao J.H., Wang S., Jin Y., Chen Z.Q. et al.* // Nat Plants. 2016. V. 2(10). Art. 16153.
69. *Rutter B.D., Innes R.W.* // Plant Physiol. 2017. V. 173. P. 728–741.
70. *Jiao J., Peng D.* // J. Plant Interact. 2018. V. 13. P. 514–521.
71. *Wang M., Weiberg A., Lin F.M., Thomma B.P., Huang H.D., Jin H.* // Nature Plants. 2016. V. 2. № 10. Art. 16151.
72. *Ji H.M., Mao H.Y., Li S.J., Feng T., Zhang Z.Y., Cheng L. et al.* // New Phytol. 2021. V. 232. № 2. P. 705–718.
73. *Wytinck N., Manchur C.L., Li V.H., Whyard S., Belmonte M.F.* // Plants. 2020. V. 9. Art. 1780.
74. *Melnyk C.W., Molnar A., Baulcombe D.C.* // EMBO J. 2011. V. 30. P. 3553–3563.
75. *Wang M., Dean R.A.* // Mol. Plant Pathol. 2020. P. 21. P. 589–601.
76. *Liu G., Kang G., Wang S., Huang Y., Cai Q.* // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. Art. 757925.

77. Villalobos—Escobedo J.M., Herrera—Estrella A., Carreras—Villaseñor N. // *Mycologia*. 2016. V. 108. № 3. P. 556—571.
78. Lax C., Tahiri G., Patiño—Medina J.A., Cánovas—Márquez J.T., Pérez—Ruiz J.A., Osorio—Concepción M. et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 24. Art. 9348.
79. Qian X., Hamid F.M., El Sahili A., Darwis D.A., Wong Y.H., Bhushan S. et al. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. P. 9295—9309.
80. Nguyen Q.B., Kadotani N., Kasahara S., Tosa Y., Mayama S., Nakayashiki H. // *Mol. Microbiol.* 2008. V. 68. P. 1348—1365.
81. Kunej U., Jakše J., Radišek S., Štajner N. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. Art. 4224.
82. Chen Y., Gao Q., Huang M., Liu Y., Liu Z., Liu X., Ma Z. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. Art. 12500.
83. Werner B.T., Koch A., Šečić E., Engelhardt J., Jelonek L., Steinbrenner J. et al. // *PLoS ONE* 2021. V. 16. № 8. Art. e0252365.
84. Neupane A., Feng C., Mochama P.K., Saleem H., Lee Marzano S.Y. // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. Art. 976.
85. Mochama P., Jadhav P., Neupane A., Marzano S.Y.L. // *Viruses*. 2018. V. 10. Art. 214.
86. Jo S.M., Ayukawa Y., Yun S.H., Komatsu K., Arie T. // *J. Gen. Plant Pathol.* 2018. V. 84. P. 395—398.
87. Campo S., Gilbert K.B., Carrington J.C. // *PLoS Pathog.* 2016. V. 12. Art. e1005640.
88. Jeseničnik T., Štajner N., Radišek S., Mishra A.K., Košmelj K., Kunej U., Jakše J. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 2. Art. 900.
89. Feng H., Xu M., Liu Y., Gao X., Yin Z., Voegelé R.T., Huang L. // *For. Pathol.* 2017. V. 47. Art. E12354.
90. Borah M., Konakalla N.C. // *Emerging Trends in Plant Pathology*. Springer, Singapore. 2021. C. 561—575.
91. Dunker F., Trutzenberg A., Rothenpieler J.S., Kuhn S., Pröls R., Schreiber T. et al // *Elife*. 2020. V. 9. Art. e56096.
92. Mascia T., Labarile R., Doohan F., Gallitelli D. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. Art. 2657.
93. Ye W., Jiang J., Lin Y., Yeh K.-W., Lai Z., Xu X., Oelmüller R. // *BMC Plant Biol.* 2019. V. 19. P. 1—16.
94. Raman V., Simon S.A., Demirci F., Nakano M., Meyers B.C., Donofrio N.M. // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2017. V. 30. P. 517—530.
95. Wong-Bajracharya J., Singan V.R., Monti R., Plett K.L., Ng V., Grigoriev I.V. et al // *PNAS USA*. 2022. V. 119. № 3. Art. e2103527119.
96. Bazin J., Khan G.A., Combier J.P., Bustos-Sanmamed P., Debernardi J.M., Rodriguez R. et al. // *Plant J.* 2013. V. 74. P. 920—934.
97. Couzigou J.M., Laouressgues D., André O., Gutjahr C., Guillotin B., Bécard G., Combier J.P. // *Cell Host Microbe*. 2017. V. 21. P. 106—112.
98. Etemadi M., Gutjahr C., Couzigou J.-M., Zouine M., Laouressgues D., Timmers A. et al // *Plant Physiol.* 2014. V. 166. P. 281—292.
99. Wu P., Wu Y., Liu C.C., Liu L.W., Ma F.F., Wu X.Y. et al. // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. Art. 429.
100. Dang Y., Yang Q., Xue Z., Liu Y. // *Eukaryotic Cell*. 2011. V. 10. № 9. P. 1148—1155.
101. Choi J., Kim K.T., Jeon J., Wu J., Song H., Asiegbu F.O., Lee Y.H. // *BMC Genom.* 2014. V. 15. Art. S14.
102. Yadav V., Sun S., Billmyre R.B., Thimmappa B.C., Shea T., Lintner R. et al. // *PNAS USA*. 2018. V. 115. P. 3108—3113.
103. Третьякова П.Я., Соловьев А.А. // *Экологическая генетика*. 2020. Т. 18. № 4. С. 467—481.
104. Matsuo Y., Novianti F., Takehara M., Fukuhara T., Arie T., Komatsu K. // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2019. V. 32. P. 1475.
105. Lee W.S., Fu S.F., Li Z., Murphy A.M., Dobson E.A., Garland L. et al. // *BMC Plant Biol.* 2016. V. 16. Art. 15.
106. Diao P., Zhang Q., Sun H., Ma W., Cao A., Yu R. et al. // *Genes (Basel)*. 2019. V. 10. № 7. Art. 526.
107. Hunter L.J.R., Brockington S.F., Murphy A.M., Pate A.E., Gruden K., MacFarlane S.A., Palukaitis P., Carr J.P. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Art. 23082.
108. Qin L., Mo N., Zhang Y., Muhammad T., Zhao G., Zhang Y., Liang Y. // *Front Plant Sci.* 2017. V. 8. Art. 1068.
109. Prakash V., Chakraborty S. // *Physiol Mol Biol Plants*. 2019. V. 25. № 4. P. 1055.
110. Pradhan M., Pandey P., Baldwin I.T., Pandey S.P. // *Plant Physiol.* 2020. V. 184. № 2. P. 1128—1152.
111. Downen R.H., Pelizzola M., Schmitz R.J., Lister R., Downen J.M., Nery J.R., Dixon J.E., Ecker J.R. // *PNAS USA*. 2012. V. 109. № 32. Art. E2183-91.
112. Maksimov I.V. // *Rus. J. Plant Physiol.* 2009. T. 56. № 6. С. 742—752.
113. Westwood J.H., Mccann L., Naish M., Dixon H., Murphy A.M., Stancombe M.A. et al. // *Mol. Plant Pathol.* 2013. V. 14. P. 158.
114. Panwar V., McCallum B., Bakkeren G. // *Plant Mol. Biol.* 2013. V. 81. P. 595—608.
115. Jahan S.N., Asman A.K., Corcoran P., Fogelqvist J., Vetukuri R.R., Dixelius C. // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 2785—2794.
116. Vega-Arreguin J.C., Jalloh A., Bos J.I., Moffett P. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2014. V. 27. P. 770—780.
117. Song Y., Thomma B.P. // *Mol. Plant Pathol.* 2018. V. 19. P. 77—89.
118. Coburn G.A., Cullen B.R. // *J. Antimicrobial Chemotherapy*. 2003. V. 51/ № 4. P. 753—756.
119. Sang H., Kim J.-I. // *Plant Biotechnol. Rep.* 2020. V. 14. P. 1—8.
120. Cheng W., Song X.-S., Li H.-P., Cao L.-H., Sun Ke., Qiu X.-L. et al // *Plant Biotechnol. J.* 2015. V. 9. P. 1335—1345.
121. Tiwari I.M., Jesuraj A., Kamboj R., Devanna B.N., Bottella J.R., Sharma T.R. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. Art. 7521.
122. Panwar V., Jordan M., McCallum B., Bakkeren G. // *Plant Biotechnol. J.* 2018. V. 16. P. 1013—1023.
123. Tetorya M., Rajam M.V. // *3 Biotech.* 2021. V. 11. Art. 443.
124. Zhang J., Khan S.A., Hasse C., Ruf S., Heckel D.G., Bock R. // *Science*. 2015. V. 347. P. 991—994.
125. Qi T., Zhu X., Tan C., Liu P., Guo J., Kang Z., Guo J. // *Plant Biotechnol. J.* 2018. V. 16. P. 797—807.
126. Nowara D., Gay A., Lacomme C., Shaw J., Ridout C., Douchkov D. et al. // *Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 3130—3141.
127. Acevedo-Garcia J., Spencer D., Thieron H., Reinstädler A., Hammond-Kosack K., Phillips A.L., Panstruga R. // *Plant Biotechnol. J.* 2017. V. 15. № 3. P. 367—378.

128. Várallyay É., Giczey G., Burgyán J. // Arch. Virol. 2012. V. 157. P. 1345–1350.
129. Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Qiu J.-L. // Nat. Biotechnol. 2014. V. 32. P. 947–951.
130. Yara A., Yaeno T., Hasegawa M., Seto H., Montillet J.L., Kusumi K., Seo S., Iba K. // Plant Cell Physiol. 2007. V. 48. P. 1263–1274.
131. Xin M., Wang Y., Yao Y., Xie C., Peng H., Ni Z., Sun Q. // BMC Plant Biol. 2010. V. 10. P. 123–134.
132. Kamthan A., Chaudhuri A., Kamthan M., Datta A. // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. Art. 208.
133. Kouzai Y., Nakajima K., Hayafune M., Ozawa K., Kaku H., Shibuya N., et al. // Plant Mol Biol. 2014. V. 84. № 4-5. P. 519.
134. Johnson E.T., Proctor R.H., Dunlap C.A., Busman M. // Mycotoxin Res. 2018. V. 34. Art. 29.
135. Koch A., Wassenegger M. // New Phytol. 2021. V. 231. № 1. P. 54–59.
136. Biedenkopf D., Will T., Knauer T., Jelonek L., Furch A.C.U., Busche T., Koch A. // ExRNA. 2020. V. 2. Art. 12.
137. Song X.-S., Gu K.-X., Duan X.-X., Xiao X.-M., Hou Y.-P., Duan Y.-B. et al. // Pestic. Biochem. Physiol. 2018. V. 150. P. 1–9.
138. Gebremichael D.E., Haile Z.M., Negrini F., Sabbadini S., Capriotti L., Mezzetti B., Baraldi E. // Plants 2021. V. 10. Art. 650.
139. McLoughlin A.G., Wytinck N., Walker P.L., Girard I.J., Rashid K.Y., de Kievit T. et al. // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. Art. 7320.
140. Werner B.T., Gaffar F.Y., Schuemann J., Biedenkopf D., Koch A.M. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 476.
141. Nerva L., Sandrini M., Gambino G., Chitarra W. // Biomolecules. 2020. V. 10. Art. 200.
142. Hernandez-Soto A., Chacon-Credas R. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. Art. 12148.
143. Casacuberta J.M., Devos Y., du Jardin P., Ramon M., Vaucheret H., Nogué F. // Trends Biotechnol. 2015. V. 33. P. 145–147.
144. Gu K.X., Song X.S., Xiao X.M., Duan X.X., Wang J.X., Duan Y.B. et al. // Pest. Biochem. Physiol. 2019. V. 153. P. 36–46.
145. Jiang P., Chen Y., Wilde H.D. // Sci. Hortic. 2016. V. 201. P. 225–229.
146. Šečić E., Kogel K.H. // Cur. Opin. Biotechnol. 2021. V. 70. P. 136–142.
147. Mumbanza F.M., Kiggundu A., Tusiime G., Tushemereirwe W.K., Niblett C., Bailey A. // Pest Manag. Sci. 2013. V. 69. P. 1155–1162.
148. Hasley J.A.R., Navet N., Tian M. // PLOS One. 2021. V. 16. Art. e0253245.
149. Álvarez-Sánchez A.R., Romo-Quinones C., Rosas-Quijano R., Reyes A.G., Barraza A., Magallón-Barajas F. et al. // Aquac. Res. 2018. V. 49. P. 480–491.
150. Guan R., Chu D., Han X., Miao X., Li H. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V. 9. Art. 753790.
151. Niehl A., Soininen M., Poranen M.M., Heinlein M. // Plant Biotechnol. J. 2018. V. 16. P. 1679–1687.
152. Drinnenberg I.A., Weinberg D.E., Xie K.T., Mower J.P., Wolfe K.H., Fink G.R., Bartel D.P. // Science. 2009. V. 326. P. 544–550.
153. Ding F., Huang X., Gao X., Xie M., Pan G., Li Q. et al. // Nanoscale. 2019. V. 11. № 37. P. 17211–17215.
154. Mitter N., Worrall E.A., Robinson K.E., Xu Z.P., Carroll B.J. // Curr. Opin. Virol. 2017. V. 26. P. 49–55.
155. Jiang C., Fan Z., Li Z., Niu D., Li Y., Zheng M. et al. // Mol. Plant Pathol. 2020. V. 21. P. 854–870.
156. Kang S., Sun D., Qin J., Guo L., Zhu L., Bai Y. et al. // J. Pest Sci. 2022. V. 95. P. 101–114.

## RNA Interference in Plant Protection from Fungal and Oomycet Infection

I. V. Maksimov<sup>a</sup>, \*, M. Yu. Shein<sup>a</sup>, and G. F. Burkhanova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Center of Russian Academy of Sciences, Ufa 450054 Russia

\*e-mail: igor.mak2011@yandex.ru

Phytopathogenic fungi pose a threat to food security, limiting the biological potential of agricultural crops and reducing the quality of products. New plant protection methods based on natural systemic and cellular phytoimmunity are being developed to date, where a unique mechanism, described by the term “RNA interference” (RNAi), occupies a special place. RNAi regulates the expression of target genes in a homologously dependent manner and, with the involvement of a protein complex designated as RISC (RNA-induced silencing complex), on the one hand, it protects plants from pathogens, but on the other hand, pathogens use it as a virulence factor. Cases of bilateral exchange of small RNAs between plants and pathogens affecting them through extracellular vesicles have been described. This review discusses the role of small RNAs, as well as DCL, AGO, and RdR proteins, in the infection of plants with pathogenic fungi and oomycetes, and the prospects for using RNAi in the development of environmentally friendly, modern plant protection products.

**Keywords:** RNA interference, phytoimmunity

УДК 577.121

## ЭФФЕКТ ИНАКТИВАЦИИ ГЛИОКСИЛАТНОГО ШУНТА НА БИОСИНТЕЗ АДИПИНОВОЙ КИСЛОТЫ ШТАММАМИ *Escherichia coli* ПО ОБРАЩЕННОМУ $\beta$ -ОКИСЛЕНИЮ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

© 2023 г. А. Ю. Гулевич<sup>1</sup>, \*, А. Ю. Скороходова<sup>1</sup>, В. Г. Дебабов<sup>1</sup><sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”  
Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

\*e-mail: andrey.gulevich@gmail.com

Поступила в редакцию 28.11.2022 г.

После доработки 12.12.2022 г.

Принята к публикации 30.12.2022 г.

С использованием в качестве базового штамма *Escherichia coli* MG1655 *lacI<sup>Q</sup>*,  $\Delta$ *ackA-pta*,  $\Delta$ *pxxB*,  $\Delta$ *ldhA*,  $\Delta$ *adhE*,  $\Delta$ *fadE*, P<sub>L</sub>-SD<sub>φ10</sub>-*atoB*, P<sub>irc-ideal-4</sub>-SD<sub>φ10</sub>-*fadB*, P<sub>L</sub>-SD<sub>φ10</sub>-*tesB*,  $\Delta$ *yciA* получены штаммы-производные, способные к биосинтезу адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному пути  $\beta$ -окисления жирных кислот. Биосинтез рекомбинантными штаммами целевого соединения обеспечен при первичной конденсации ацетил-КоА и сукцинил-КоА под действием 3-оксоацил-КоА-тиолазы PaaJ и катализе финальной реакции цикла ацил-КоА дегидрогеназами FadE и FabI. Делеция в штаммах генов *sucCD*, кодирующих компоненты сукцинил-КоА-синтазы, не повышала относительной внутриклеточной доступности сукцинил-КоА для целевых биосинтетических реакций и не приводила к росту накопления рекомбинантами адипиновой кислоты. Секретция янтарной и яблочной кислот штаммами с нарушенным циклом трикарбоновых кислот сохранялась практически неизменной, что указывало на активность в клетках реакций глиоксилатного шунта, конкурирующих с реакциями цикла за изоцитрат, необходимый для формирования сукцинил-КоА. При инактивации в штаммах изоцитратлиазы, малатсинтазы А и G, а также бифункциональной киназы/фосфатазы изоцитратдегидрогеназы, за счет делеции генов *aceBAK* оперона и *glcB*, синтез адипиновой кислоты рекомбинантами повышался в три раза и достигал 0.33 мМ.

**Ключевые слова:** адипиновая кислота,  $\beta$ -окисление жирных кислот, глиоксилатный шунт, метаболическая инженерия, сукцинил-КоА, *Escherichia coli*

DOI: 10.31857/S055510992303008X, EDN: BBSGQX

Адипиновая кислота является важным промышленно значимым соединением, способным служить удобным предшественником в последующем синтезе широкого спектра веществ с высокой добавленной стоимостью, включая смазки, пластификаторы и фармацевтические субстанции. При этом, большая часть адипиновой кислоты, ежегодно производящейся в объемах превышающих 3.5 млн тонн, используется для получения нейлона-6,6 [1]. В настоящее время производство адипиновой кислоты основывается на нефтехимическом синтезе с использованием бензола в качестве предшественника [2]. В качестве экологически оправданной альтернативы рассматривался способ, предполагающий первичное биотехнологическое получение из возобновляемых источников углерода *cis,cis*-муконовой кислоты с ее последующей каталитической конверсией в адипиновую [3]. Действительно, возможность микробиологической конверсии глюкозы и глицерина в *cis,cis*-муконовую кислоту была проде-

монстрирована с использованием направленно сконструированных штаммов таких традиционных для промышленной биотехнологии микроорганизмов, как *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae* [4–7]. Кроме того, был предложен потенциальный путь прямой биокаталитической конверсии субстрата в адипиновую кислоту через промежуточное формирование 2-оксоадипата, предполагающий первичную конденсацию ацетил-КоА с 2-оксоглутаратом [8]. Однако экспериментальная реализация соответствующей концепции на сегодняшний день не была продемонстрирована. Многообещающей альтернативой  $\alpha$ -восстановлению 2-оксоадипата является образование адипиновой кислоты из адипил-КоА, сформированного в результате обращения биохимических реакций  $\beta$ -окисления, включающих, в том числе, обратные реакции деградации фенилацетата или деградации жирных кислот. Формирование соответствующего Ко-А-предшественника в последовательности таких реакций предполагает первичную

**Таблица 1.** Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

№	Последовательность
P1	5'-tgcgacagatctctcacctaccaacaatgccc-3'
P2	5'-atgtatatctccttcacggccaatgcttcgttc-3'
P3	5'-gcgtagcaattccgtcacaataaaggcttcacgcatatgtatatctccttcacggccaatg-3'
P4	5'-ctagtaagatcttgaagcctgctttttataactaagtgg-3'
P5	5'-caccgcatcgcgccaccattacagagaagcctgacgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P6	5'-gcatcgcgccaccattacag-3'
P7	5'-gtagcgaccaattggcgtacg-3'
P8	5'-atgaacttcatgatgatcaggcaaaacaacttttcgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P9	5'-ttatttcagaacagtttctcagcttcaccgatctgaagcctgctttttataactaagtgg-3'
P10	5'-ctacgggaccaccaatgtagg-3'
P11	5'-catacagatggccaacctatgc-3'

конденсацию ацетил-КоА и сукцинил-КоА с последующим превращением 3-оксоадипил-КоА в 3-гидроксиадипил-КоА, затем в 2,3-дидегидроадипил-КоА и, в итоге, в адипил-КоА. Гидролиз тиоэфирной связи, ведущий к получению целевого соединения, может катализироваться, в таком случае, тиоэстеразами, обладающими необходимой субстратной специфичностью. В последние годы в клетках *E. coli* был успешно продемонстрирован синтез адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному пути деградации фенилацетата при оверэкспрессии в базовых штаммах как нативных генов *paal*-оперона, так и вспомогательных генов других организмов [8–11]. В качестве таких вспомогательных генов в первую очередь использовались гены тиоэстераз из *Acinetobacter baylyi* [8] и *Mus musculus* [10, 11], а также гены ацил-КоА дегидрогеназ/еноил-КоА редуктаз из *Clostridium acetobutylicum* [10] и *Treponema denticola* [9, 11]. Вместе с тем, не было показано биосинтеза адипиновой кислоты клетками *E. coli* при катализе реакций формирования адипил-КоА ферментами β-окисления жирных кислот (**БОЖК**).

Поскольку от эффективности первичной стадии формирования 3-оксоадипил-КоА напрямую зависит эффективность протекания последующих реакций обращенного β-окисления, были предприняты попытки повышения в клетках соответствующих адипат-секретирующих рекомбинантов внутриклеточной доступности сукцинил-КоА. Этот метаболит является интермедиатом цикла трикарбоновых кислот и, в данной связи, подходит к повышению его внутриклеточной доступности для реакций обращенного β-окисления основывались, в первую очередь, на предотвращении утилизации сформированного сукцинил-КоА в последующих реакциях цикла за счет инактивации сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.5.1) [9] или сукцинил-КоА синтетазы (КФ 6.2.1.5) [12]. При этом, известно, что активность 2-оксоглутарат

дегидрогеназы (КФ 1.2.4.2), ответственной за формирование сукцинил-КоА, в клетках *E. coli* снижена при росте на средах содержащих глюкозу [13], и один из ключевых предшественников соответствующего тиоэфира, изоцитрат, может вовлекаться в реакции глиокилатного шунта, активизирующиеся при интенсивном формировании в клетке ацетил-КоА [14].

Цель работы – конструирование штаммов *E. coli* способных к биосинтезу адипиновой кислоты из глюкозы с участием ферментов β-окисления жирных кислот и оценка влияния инактивации глиокилатного шунта на биосинтез рекомбинантами целевого соединения.

## МЕТОДИКА

**Реактивы.** В работе использовали рестриктазу *Bgl*II, ДНК-полимеразу Taq, T4 ДНК-лигазу (“Thermo Scientific”, Литва), а также высокоточную ДНК-полимеразу Кара HiFi (“Roche”, Швейцария). ПЦР-продукты очищали проведением электрофореза в агарозном геле и выделяли с помощью QIAquick Gel Extraction Kit (“Qiagen”, США). Олигонуклеотиды (“Евроген”, Россия) представлены в табл. 1. Компоненты питательных сред, соли и другие реактивы были произведены фирмами “Panreac” (Испания) и “Sigma” (США).

**Бактериальные штаммы, плазмиды и среды.** Штамм *E. coli* K-12 MG1655 (ВКПМ В-6195) и ранее сконструированные штаммы *E. coli* VOX3.1 Δ4 *P<sub>trc-id-4</sub>-fadE* и VOX3.1 Δ4 *P<sub>trc-id-4</sub>-fabI* [15] с измененной регуляцией экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты аэробного β-окисления жирных кислот и тиоэстеразу II, а также лишённые путей смешанно-кислотного брожения и активности неспецифичной тиоэстеразы YciA, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе штаммов. Использованные в работе бактериальные штам-

мы и плазмиды представлены в табл. 2. Для культивирования бактерий применяли полноценные среды LB, SOB, SOC и минимальную среду M9 [16] с добавлением, при необходимости, ампициллина (100 мкг/мл) или хлорамфеникола (30 мкг/мл).

**Конструирование штаммов.** Введение целевых модификаций в хромосому *E. coli* осуществляли с использованием методики, описанной ранее [17].

Конструирование фрагмента ДНК для замены нативной регуляторной области гена *paal* искусственным генетическим элементом P<sub>L</sub>-SD<sub>φ10</sub>, содержащим промотор P<sub>L</sub> фага лямбда и эффективный сайт связывания рибосом гена φ10 из фага T7, проводили в несколько стадий. На первой стадии, с помощью ПЦР был получен фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, промотор P<sub>L</sub>, последовательность SD гена φ10 из фага T7 и 36 нуклеотидов, комплементарных 5'-концу кодирующей области гена *paal*.

Фрагмент получали в два этапа. На первом этапе, с использованием в качестве матрицы геномной ДНК фага лямбда и праймеров P1 и P2 был получен фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, промотор P<sub>L</sub> и часть последовательности SD гена φ10 из фага T7. Полученный ПЦР-продукт служил матрицей в следующем раунде ПЦР с использованием праймеров P1 и P3. Праймер P3 содержал область комплементарную 3'-концу промотора P<sub>L</sub>, последовательность SD гена φ10 из фага T7 и 36 первых нуклеотидов из рамки считывания гена *paal*. Параллельно осуществляли вторую стадию конструирования фрагмента ДНК. Фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*) и 36 нуклеотидов, гомологичных участку ДНК, непосредственно предшествующему кодирующей области гена *paal*, был получен ПЦР с использованием праймеров P4 и P5 и плазмиды pMW118-(*λattL*-Cm-*λattR*) [18] в качестве матрицы. Полученные фрагменты ДНК были обработаны эндонуклеазой рестрикции *Bgl*II и лигированы T4 ДНК-лигазой. Продукт лигирования амплифицировали с использованием праймеров P3 и P5. Полученный ПЦР-продукт был интегрирован в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46 [17]. Соответствие запланированной и экспериментально полученной нуклеотидной последовательности нового регуляторного элемента, введенного перед кодирующей областью гена *paal*, было подтверждено секвенированием с помощью праймеров P6 и P7.

Линейный фрагмент ДНК для инактивации генов *sucCD*, содержащий маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*), получали при помощи ПЦР с использованием праймеров P8 и P9 и плазмиды pMW118-(*λattL*-Cm-*λattR*) в качестве матрицы. Полученный фрагмент ДНК был интегри-

рован в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46. Факт инактивации генов *sucCD* в хромосомах отобранных интегрантов подтверждали ПЦР-анализом с помощью локус-специфичных праймеров P10 и P11.

Соответствующие индивидуальные генетические модификации были введены в состав хромосом целевых рекомбинантных штаммов с помощью P1-зависимых трансдукций [16]. В случае инактивации генов *aceBAK* и *glcB* использовали ранее полученные препараты P1-трансдуцирующих фагов, содержащих соответствующие целевые маркированные модификации [19]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, из хромосом целевых штаммов, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [20]. Трансформацию штаммов плазмидами осуществляли по стандартной методике.

**Культивирование штаммов.** Рекомбинантные штаммы выращивали в течение ночи в среде M9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37°C. Для микроаэробного культивирования по 5 мл полученных ночных культур разбавляли в 10 раз, добавляя 45 мл среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы, 10 г/л дрожжевого экстракта и 2.5 г/л NaHCO<sub>3</sub>. Полученные культуры инкубировали в колбах объемом 750 мл, закрытых ватными пробками на роторной качалке при 250 об./мин в течение 8 ч при 37°C. Насыщение среды кислородом оценивали в контрольных колбах с соответствующими культурами при инкубации в присутствии резазурина. Для индукции экспрессии генов, находящихся под контролем LacI-зависимого промотора P<sub>trc-ideal-4+</sub> спустя 3 ч от начала инкубации в среды культивирования добавляли изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1.0 мМ.

Клеточные суспензии центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин, в полученных супернатантах определяли концентрации секретированных метаболитов и остаточной глюкозы. Все эксперименты повторялись не менее трех раз.

**Аналитические методы.** Концентрации органических кислот в культуральных жидкостях, освобожденных от биомассы центрифугированием, определяли методом ВЭЖХ с использованием системы "Waters" HPLC system (США). Применяли ион-эксклюзионную колонку Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) ("Phenomenex", США) с детекцией при длине волны 210 нм. В качестве подвижной фазы использовали водный раствор серной кислоты (2.5 мМ) со скоростью потока 0.5 мл/мин. Для измерения концентрации глюкозы система была укомплектована рефрактивным детектором "Waters" 2414 и колонкой Spherisorb-NH2 ("Waters", США). Подвижной фазой служила смесь ацетонитрил-вода в соотношении 75/25 об./об. при скорости потока 1.0 мл/мин.

Таблица 2. Штаммы и плазмиды, сконструированные и использованные в работе

Объект	Генотип	Ссылка
<b>Штамм</b>		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}^{-}fadE$	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI<sup>Q</sup></i> , $\Delta ackA-pta$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta adhE$ , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>atoB</i> , $P_{trc-ideal-4}$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>fadB</i> , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>tesB</i> , $\Delta yciA$ , $P_{trc-ideal-4}$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>fadE</i>	[15]
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}^{-}fabI$	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI<sup>Q</sup></i> , $\Delta ackA-pta$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta adhE$ , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>atoB</i> , $P_{trc-ideal-4}$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>fadB</i> , $\Delta fadE$ , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>tesB</i> , $\Delta yciA$ , $P_{trc-ideal-4}$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>fabI</i>	[15]
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}^{-}fadE P_L$ - <i>paaj</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI<sup>Q</sup></i> , $\Delta ackA-pta$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta adhE$ , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>atoB</i> , $P_{trc-ideal-4}$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>fadB</i> , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>tesB</i> , $\Delta yciA$ , $P_{trc-ideal-4}$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>fadE</i> , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>paaj</i>	Данная работа
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}^{-}fabI P_L$ - <i>paaj</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI<sup>Q</sup></i> , $\Delta ackA-pta$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta adhE$ , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>atoB</i> , $P_{trc-ideal-4}$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>fadB</i> , $\Delta fadE$ , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>tesB</i> , $\Delta yciA$ , $P_{trc-ideal-4}$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>fabI</i> , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>paaj</i>	Данная работа
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}^{-}fadE P_L$ - <i>paaj</i> $\Delta sucCD$	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI<sup>Q</sup></i> , $\Delta ackA-pta$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta adhE$ , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>atoB</i> , $P_{trc-ideal-4}$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>fadB</i> , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>tesB</i> , $\Delta yciA$ , $P_{trc-ideal-4}$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>fadE</i> , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>paaj</i> , $\Delta sucCD$	Данная работа
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}^{-}fabI P_L$ - <i>paaj</i> $\Delta sucCD$	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI<sup>Q</sup></i> , $\Delta ackA-pta$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta adhE$ , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>atoB</i> , $P_{trc-ideal-4}$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>fadB</i> , $\Delta fadE$ , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>tesB</i> , $\Delta yciA$ , $P_{trc-ideal-4}$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>fabI</i> , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>paaj</i> , $\Delta sucCD$	Данная работа
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}^{-}fadE P_L$ - <i>paaj</i> $\Delta aceBAK \Delta glcB$	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI<sup>Q</sup></i> , $\Delta ackA-pta$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta adhE$ , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>atoB</i> , $P_{trc-ideal-4}$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>fadB</i> , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>tesB</i> , $\Delta yciA$ , $P_{trc-ideal-4}$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>fadE</i> , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>paaj</i> , $\Delta aceBAK$ , $\Delta glcB$	Данная работа
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}^{-}fabI P_L$ - <i>paaj</i> $\Delta aceBAK \Delta glcB$	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI<sup>Q</sup></i> , $\Delta ackA-pta$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta adhE$ , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>atoB</i> , $P_{trc-ideal-4}$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>fadB</i> , $\Delta fadE$ , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>tesB</i> , $\Delta yciA$ , $P_{trc-ideal-4}$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>fabI</i> , $P_L$ -SD $_{\phi 10^{-}}$ <i>paaj</i> , $\Delta aceBAK$ , $\Delta glcB$	Данная работа
<b>Плазмида</b>		
pMW118-( <i>lattL</i> -Cm- <i>lattR</i> )	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>lattL</i> - <i>cat</i> - <i>lattR</i>	[18]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , $P_{araB}$ - <i>lgam</i> - <i>bet</i> - <i>exo</i>	[17]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , $P_R$ - <i>lxis-int</i> , <i>cIts857</i>	[19]

Идентификацию и количественный анализ масляной и адипиновой кислот в культуральных жидкостях осуществляли методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Пробоподготовка включала экстракцию целевых аналитов из культуральной жидкости, упаривание экстракта и дериватизацию с получением триметилсилильных производных. Жидко-жидкостная микроэкстракция этилацетатом была использована для экстракции целевых соединений. Перед экстракцией аликвоту образца смешивали с водными растворами внутренних стандартов (валериановой и пимелиновой кислот), 2 М раствором хлорида натрия и доводили до рН 1–2 с помощью 2 М соляной кислоты. Этилацетатный экстракт смешивали с сухим сульфатом натрия, центрифугировали и полученный супернатант упаривали в вакуумном испарителе до минимального объема при 30°C. Силилирование проводили инкубируя остаток после стадии упаривания с N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамидом, содержащим 1% триметилхлорсилана при 60°C в течение 15 мин.

Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили на газовом хроматографе Agilent 6890N, укомплектованном автосамплером 7683B и масс-селективным детектором Agilent 5975 MSD ("Agilent", США). Система была оснащена капиллярной колонкой Agilent DB-5MS длиной 30 м, внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки 0.25 мкм. В качестве газа носителя использовался гелий с постоянной скоростью потока 1.0 мл/мин. Проба объемом 1 мкл вводилась в испаритель в режиме деления потока 1 : 10. Температура испарителя составляла 230°C. Температурная программа термостата колонки: начальная изотерма 2 мин при 60°C с последующим линейным градиентом до 200°C со скоростью 5°C /мин, затем до 250°C со скоростью 15°C /мин, конечная изотерма 5 мин при 250°C. Для ионизации аналитов была использована ионизация электронами (70 eV). Температура ионного источника масс-спектрометра составляла 230°C. Температура интерфейса масс-спектрометра составляла 250°C. Масс-анализатор функционировал в режиме селективного детектирования (145 и 73  $m/z$  для масляной кислоты, 275 и 172  $m/z$  для адипиновой кислоты, 159  $m/z$  для валериановой кислоты, 289  $m/z$  для пимелиновой кислоты). Сбор и обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Agilent MSD ChemStation. Аналитическая система была откалибрована в диапазоне 0.01–0.10 мг/мл для обоих аналитов с пределом детектирования 0.002 мг/мл. Для аппроксимации калибровочных данных использовали взвешенную линейную регрессию, был получен квадрат коэффициента корреляции  $R^2 = 0.993$ . Целевые аналиты идентифицировали, сравнивая полученные данные с характеристиками соответствующих стандартов (время удерживания и масс-спектр).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве базовых штаммов для конструирования производных, способных к биосинтезу адипиновой кислоты из глюкозы с участием ферментов БОЖК и последующей оценки влияния инактивации глиоксилатного шунта на биосинтез рекомбинантами целевого соединения, были использованы ранее сконструированные штаммы *E. coli* VOX3.3  $\Delta 4 P_{irc-id-4}-fadE$  и VOX3.3  $\Delta 4 P_{irc-id-4}-fabI$  (табл. 2) [15]. В данных штаммах пути смешанно-кислотного брожения, конкурирующие с реакциями обращенного БОЖК за ключевые метаболиты предшественники, пировиноградную кислоту и ацетил-КоА, были инактивированы за счет делеций генов *ackA*, *pta*, *poxB*, *ldhA* и *adhE*. Активность ферментов, способных катализировать реакции обращенного БОЖК была повышена в штаммах в результате замены нативных регуляторных областей соответствующих генов, *atoB*, *fadB*, *fadE* и *fabI*, эффективными искусственными регуляторными элементами  $P_{irc-ideal-4}-SD_{\phi 10}$  и  $P_L-SD_{\phi 10}$ . Также, для обеспечения возможности конверсии терминальных КоА-продуктов обращенного БОЖК в соответствующие карбоновые кислоты, в штаммах была усилена экспрессия гена тиоэстеразы II, *tesB*, тогда как ген неспецифичной тиоэстеразы *YciA* был делетирован с целью предотвращения нежелательного гидролиза тиоэфирной связи интермедиатов обращенного цикла. В результате, при ферментации в пробирках штаммы были способны к синтезу из глюкозы до ~0.5 мМ масляной кислоты, в результате однократного функционального обращения БОЖК [15], и могли служить удобными предшественниками для конструирования на их основе модельных продуцентов адипиновой кислоты.

Стехиометрически сбалансированный биосинтез 2 молекул адипиновой кислоты из 3 молекул глюкозы по обращенному БОЖК предполагает расход 4 молекул НАДН. При этом, гликолитическая генерация необходимых предшественников обеспечивает формирование 6 соответствующих восстановленных эквивалентов, аэробная конверсия четырех молекул пировиноградной кислоты в ацетил-КоА — еще четырех, и последующее образование двух сукцинил-КоА в реакциях ЦТК также сопровождается формированием 4 дополнительных НАД(Р)Н. Однако при аэрации основная часть восстановленных эквивалентов, сформированных в ходе катаболизма субстрата, окисляется кислородом, выступающим в качестве финального акцептора электронов, в результате действия дыхательной цепи переноса электронов. С другой стороны, при анаэробнозе, несмотря на сниженное формирование восстановленных эквивалентов за счет конверсии пировиноградной кислоты в ацетил-КоА под действием пируват-формиатлиазы (КФ 2.3.1.54), внутриклеточный окисли-



тельно-восстановительный статус будет препятствовать не только биосинтезу целевого соединения, но и эффективному потреблению субстрата, в силу ингибирования гликолиза избыточным внутриклеточным пулом НАДН [21]. Таким образом, ни полностью анаэробные, ни полностью аэробные условия не могли рассматриваться как оптимальные для биосинтеза адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному БОЖК ранее сконструированными штаммами VOX3.3 Δ4 P<sub>trc-id-4</sub>-*fadE* и VOX3.3 Δ4 P<sub>trc-id-4</sub>-*fabI*. В данной связи в настоящей работе биосинтетический потенциал штаммов оценивали при микроаэробном культивировании. С целью повышения интенсивности формирования в клетках щавелевоуксусной кислоты (ЩУК), необходимой для вовлечения ацетил-КоА в реакции ЦТК, ведущие к образованию сукцинил-КоА, в среды дополнительно вносили 2.5 г/л NaHCO<sub>3</sub>.

В соответствующих условиях культивирования базовые штаммы не секретировали заметных количеств адипиновой кислоты, несмотря на присутствие источника CO<sub>2</sub> в среде (табл. 3). Это могло быть связано как с недостаточной активностью ЦТК, генерирующего сукцинил-КоА, так и с субстратной специфичностью 3-оксоацил-КоА-тиолазы AtoB (КФ 2.3.1.16), ответственной в штаммах за первичную конденсацию ацетил- и ацил-КоА. При этом, присутствие в средах культивирования штаммов значимых количеств янтарной кислоты (табл. 3) свидетельствовало, скорее, в пользу правомочности второго предположения. Действительно, в предшествующих работах [8–11] биосинтез адипиновой кислоты по обращенному β-окислению направленно сконструированными штаммами *E. coli* достигался при усилении в рекомбинантах экспрессии гена другой нативной тиолазы – PaaJ (КФ 2.3.1.174), обладающей подтвержденной способностью к образованию 3-оксоадипил-КоА. В данной связи, экспрессия гена *paaJ* была усилена в базовых штаммах VOX3.3 Δ4 P<sub>trc-id-4</sub>-*fadE* и VOX3.3 Δ4 P<sub>trc-id-4</sub>-*fabI* в результате замены его природной регуляторной области искусственным генетическим элементом P<sub>L</sub>-SD<sub>φ10</sub>, содержащим сильный конститутивный промотор фага лямбда и эффективный сайт связывания рибосом гена 10 из фага T7.

Соответствующие штаммы VOX3.3 Δ4 P<sub>trc-id-4</sub>-*fadE* P<sub>L</sub>-*paaJ* и VOX3.3 Δ4 P<sub>trc-id-4</sub>-*fabI* P<sub>L</sub>-*paaJ* в ходе микроаэробной утилизации глюкозы секретировали в среду около 100 мкМ адипиновой кислоты при пропорциональном снижении накопления масляной кислоты (табл. 3). При этом, как и в случае масляной кислоты, формирование 6-углеродной адипиновой кислоты штаммом VOX3.3 Δ4 P<sub>trc-id-4</sub>-*fabI* было несколько снижено по сравнению со штаммом VOX3.3 Δ4 P<sub>trc-id-4</sub>-*fadE*. Это наблюдение противоречило ранее полученным данным о

предпочтительном формировании в результате функционального обращения БОЖК 6- и 8-углеродных карбоновых кислот штаммами экспрессирующими в качестве ацил-КоА-дегидрогеназы белок FabI [15]. Тем не менее, предшествующие результаты были получены в случае продукции рекомбинантами монокарбоновых кислот и могли не отражать специфичности конкретных ферментов к соответствующим КоА-производным, содержащим ω-карбоксылную группу.

В данной связи следует отметить, что формирование янтарной кислоты штаммами с усиленной экспрессией *paaJ* не снижалось, указывая либо на неспособность штаммов эффективно вовлекать в обращенные реакции БОЖК соответствующий ω-функционализированный тиоэфир, сукцинил-КоА, либо на его сниженную доступность в клетках рекомбинантов. Сукцинил-КоА формируется в ЦТК из 2-оксоглутарата в результате действия 2-оксоглутарат дегидрогеназы и, в дальнейшем, туннелируется в последующие реакции цикла сукцинил-КоА-синтетазой. Таким образом, инактивация последнего фермента потенциально могла повысить внутриклеточную доступность сукцинил-КоА для целевых реакций обращенного БОЖК.

При инактивации в клетках штаммов VOX3.3 Δ4 P<sub>trc-id-4</sub>-*fadE* P<sub>L</sub>-*paaJ* и VOX3.3 Δ4 P<sub>trc-id-4</sub>-*fabI* P<sub>L</sub>-*paaJ* генов *sucCD*, кодирующих компоненты сукцинил-КоА синтетазы, продукция целевого соединения рекомбинантами практически не изменилась, тогда как уровни накопления штаммами янтарной кислоты несколько снизились (табл. 3). Однако это снижение составляло лишь около 20%, указывая на незначительный вклад активности сукцинил-КоА синтетазы в формирование штаммами данного дикарбоксилата. Действительно, известно, что у клеток *E. coli* экспрессия генов *sucABCD* оперона, кодирующих компоненты 2-оксоглутарат дегидрогеназы и сукцинил-КоА синтетазы, резко снижена при росте в богатых и содержащих глюкозу средах [13]. Таким образом, за формирование штаммами VOX3.3 Δ4 P<sub>trc-id-4</sub>-*fadE* P<sub>L</sub>-*paaJ* и VOX3.3 Δ4 P<sub>trc-id-4</sub>-*fabI* P<sub>L</sub>-*paaJ* янтарной кислоты в первую очередь были ответственны, по-видимому, реакции глиоксилатного шунта. Секретция рекомбинантами заметных количеств яблочной кислоты подтверждала это предположение. Ключевые ферменты, катализирующие реакции глиоксилатного шунта, изоцитрат лиаза (КФ 4.1.3.1) и малат синтаза А (КФ 2.3.3.9), кодируются в клетках *E. coli* генами *aceA* и *aceB*, составляющими вместе с геном *aceK*, кодирующим бифункциональную киназу/фосфатазу изоцитрат дегидрогеназы, *aceBAK* оперон. Последний фермент регулирует активность изоцитрат дегидрогеназы, перераспределяя поток углерода между окислительным ЦТК и глиоксилатным шунтом [22]. Экспрессия генов *aceBAK* оперона подвержена

Таблица 3. Концентрации метаболитов, секретируемых сконструированными штаммами при микроэробной утилизации глюкозы\*

Штамм	Глюкоза, мМ	Пировиноградная кислота, мМ	Уксусная кислота, мМ	Яблочная кислота, мМ	Янтарная кислота, мМ	Масляная кислота, мкМ	Адипиновая кислота, мкМ
ВОХ3.3 Δ4 P <sub>ire-id-4</sub> -fadE	41.9 ± 2.4	20.5 ± 1.2	12.4 ± 0.8	0.9 ± 0.1	5.1 ± 0.3	512.1 ± 46.3	н.д.
ВОХ3.3 Δ4 P <sub>ire-id-4</sub> -fabI	42.3 ± 2.1	20.8 ± 1.1	12.6 ± 0.9	1.1 ± 0.1	5.0 ± 0.2	476.6 ± 42.0	н.д.
ВОХ3.3 Δ4 P <sub>ire-id-4</sub> -fadE P <sub>L</sub> -paaJ	41.6 ± 2.0	20.9 ± 1.1	12.2 ± 0.7	0.9 ± 0.1	4.9 ± 0.2	394.3 ± 36.5	108.3 ± 10.5
ВОХ3.3 Δ4 P <sub>ire-id-4</sub> -fabI P <sub>L</sub> -paaJ	42.1 ± 2.3	21.1 ± 1.0	12.8 ± 0.8	1.0 ± 0.1	5.2 ± 0.3	362.7 ± 34.8	101.4 ± 10.2
ВОХ3.3 Δ4 P <sub>ire-id-4</sub> -fadE P <sub>L</sub> -paaJ ΔsucCD	41.3 ± 2.1	21.2 ± 1.0	12.6 ± 0.8	1.2 ± 0.1	4.0 ± 0.2	389.2 ± 35.6	112.1 ± 11.0
ВОХ3.3 Δ4 P <sub>ire-id-4</sub> -fabI P <sub>L</sub> -paaJ ΔsucCD	41.8 ± 2.2	21.4 ± 1.2	12.7 ± 0.9	1.1 ± 0.1	4.1 ± 0.2	366.1 ± 36.4	103.7 ± 9.9
ВОХ3.3 Δ4 P <sub>ire-id-4</sub> -fadE P <sub>L</sub> -paaJ Δace BAK Δglc B	41.5 ± 2.1	21.7 ± 1.2	13.0 ± 1.1	н.д.	1.0 ± 0.1	175.0 ± 16.9	326.5 ± 30.6
ВОХ3.3 Δ4 P <sub>ire-id-4</sub> -fabI P <sub>L</sub> -paaJ Δace BAK Δglc B	42.1 ± 2.3	22.2 ± 1.1	13.3 ± 1.0	н.д.	0.9 ± 0.1	136.4 ± 12.5	332.8 ± 31.3

\* Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов; н.д. — не детектировано.

комплексной транскрипционной регуляции, включающей действие таких белков как IclR, FadR, FruR, ArgAB и CRP-цАМФ [23, 24]. В условиях высокой доступности глюкозы, экспрессия генов *aceBAK* оперона репрессируется специфическим транскрипционным регулятором, белком IclR. При этом, в случае сниженной доступности глюкозы, экспрессия оперона активируется глобальным регулятором CRP-цАМФ [24]. Более того, повышенная интенсивность формирования в клетках ацетил-КоА также способствует активации транскрипции генов *aceBAK* оперона [23]. Следует отметить, что исследуемые штаммы синтезировали значительные количества уксусной кислоты (табл. 3), что предполагало высокий уровень накопления в клетках ацетил-КоА, который, в отсутствие у клеток фосфотрансацетилазы Pta, ацетат киназы AskA и неспецифичной тиоэстеразы YciA, конвертировался в соответствующее производное под действием других клеточных ферментов, способных проявлять тиоэстеразную активность, таких как белки YciA, YbgC и YdiI с широкой субстратной специфичностью в отношении ацил-производных кофермента А [25–27]. Таким образом, с учетом того, что реакции глиоксилатного шунта, ведущие к формированию янтарной и яблочной кислот, протекают без промежуточного формирования сукцинил-КоА, расходуя вместе с тем его предшественник, изоцитрат, гены *aceBAK* оперона были делетированы в штаммах VOX3.3 Δ4 P<sub>irc-id-4</sub>-*fadE* P<sub>L</sub>-*paal* и VOX3.3 Δ4 P<sub>irc-id-4</sub>-*fabI* P<sub>L</sub>-*paal*. Также в штаммах был делетирован ген *glcB*, кодирующий малат синтазу G.

В результате введения в штаммы соответствующих генетических модификаций, секреция яблочной кислоты полученными производными VOX3.3 Δ4 P<sub>irc-id-4</sub>-*fadE* P<sub>L</sub>-*paal* Δ*aceBAK* Δ*glcB* и VOX3.3 Δ4 P<sub>irc-id-4</sub>-*fabI* P<sub>L</sub>-*paal* Δ*aceBAK* Δ*glcB* прекращалась, а накопление янтарной кислоты падало в четыре раза (табл. 3). При этом, штаммы синтезировали адипиновую кислоту в количествах, возросших в три раза (до ~0.3 мМ) на фоне резкого снижения формирования рекомбинантами масляной кислоты. Таким образом, инактивация глиоксилатного шунта способствовала биосинтезу рекомбинантами целевого соединения за счет обеспечения в клетках предпочтительной возможности формирования сукцинил-КоА в реакциях оксидативного ЦТК при исключении вовлечения предшественника в реакции, не связанные с образованием соответствующего тиоэфира. Действительно, сохраняющаяся секреция янтарной кислоты штаммами, лишенными активности глиоксилатного шунта указывала на формирование данного дикарбоксилата в ЦТК из сукцинил-КоА, образованного в результате действия 2-оксоглутарат дегидрогеназы. Вместе с тем, наблюдаемое остаточное формирование сконструированными штаммами масляной кислоты указывало на не полное вовлечение сукцинил-КоА

в реакции обращенного БОЖК. Это могло объясняться как неоптимальной субстратной специфичностью ферментов, вовлеченных в формирование целевого соединения, так и недостаточными уровнями их активности в клетке. В рамках подходов рациональной метаболической инженерии соответствующие проблемы могут быть решены как тонкой оптимизацией экспрессии целевых генов, так и выбором альтернативных генов-мишеней для их экспрессии в перспективных рекомбинантах.

В результате проведенных исследований сконструированы штаммы *E. coli* способные к биосинтезу адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному пути БОЖК. Показано позитивное влияние инактивации глиоксилатного шунта на биосинтез целевого соединения полученными рекомбинантами. Выявлена значимость внутриклеточной доступности сукцинил-КоА, сформированного в реакциях ЦТК для эффективного биосинтеза конечного продукта по обращенному БОЖК. Достигнуты уровни синтеза адипиновой кислоты, превосходящие соответствующие уровни синтеза масляной кислоты, одновременно формируемой штаммами по обращенному β-окислению жирных кислот без участия сукцинил-КоА.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 22-14-00040).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lang M., Li H. // ChemSusChem. 2022. V. 15. № 1. e202101531. <https://doi.org/10.1002/cssc.202101531>
2. Skoog E., Shin J.H., Saez-Jimenez V., Mapelli V., Olsson L. // Biotechnol. Adv. 2018. V. 36. № 8. P. 2248–2263.
3. Thomas J.M., Raja R., Johnson B.F., O'Connell T.J., Sankar G., Khimyak T. // Chem. Commun. 2003. V. 21 № 10. P. 1126–1127.
4. Lin Y., Sun X., Yuan Q., Yan Y. // Metab. Eng. 2014. V. 23. P. 62–69.
5. Zhang H., Li Z., Pereira B., Stephanopoulos G. // Microb. Cell. Factories. 2015. V. 14. № 1. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0319-0>
6. Weber C., Brueckner C., Weinreb S., Lehr C., Essl C., Boles E. // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 8421–8430.
7. Curran K.A., Leavitt J.M., Karim A.S., Alper H.S. // Metab. Eng. 2013. V. 15. P. 55–66.
8. Kallscheuer T., Gätgens J., Lübcke M., Pietruszka J., Bott M., Polen T. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 101. № 6. P. 2371–2382.
9. Yu J.L., Xia X.X., Zhong J.J., Qian Z.G. // Biotechnol. Bioeng. 2014. V. 111. № 12. P. 2580–2586.
10. Babu T., Yun E.J., Kim S., Kim D.H., Liu K.H., Kim S.R., Kim K.H. // Proc. Bioch. 2015. V. 50. № 12. P. 2066–2071.

11. Cheong S., Clomburg J.M., Gonzalez R. // Nat. Biotechnol. 2016. V. 34. № 5. P. 556–561.
12. Zhao M., Huang D., Zhang X., Koffas M.A.G., Zhou J., Deng Y. // Metab. Eng. 2018. V. 47. P. 254–262.
13. Park S.J., Chao G., Gunsalus R.P. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. P. 4138–4142.
14. Skorokhodova A.Y., Gulevich A.Y., Morzhakova A.A., Shakulov R.S., Debabov V.G. // Biotechnol. Lett. 2013. V. 35. № 4. P. 577–583.
15. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 4. С. 330–337.
16. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. // Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Ed., N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
17. Datsenko K.A., Wanner B.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
18. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Дорошенко В.Г., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2005. Т. 39. № 5. С. 823–831.
19. Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 3. С. 244–252.
20. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., Крылов А.А., Минаева Н.И., Полонская З.М., Зименков Д.В., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2009. Т. 43. № 3. С. 547–557.
21. Vemuri G.N., Altman E., Sangurdekar D.P., Khodursky A.B., Eiteman M.A. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 3653–3661.
22. Laporte D.C., Stueland C.S., Ikeda T.P. // Biochimie. 1989. V. 71. № 9–10. P. 1051–1057.
23. Cronan J.E., Laporte D. // Tricarboxylic Acid Cycle and Glyoxylate Bypass, in: Neidhardt F. (Ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, Washington: ASM Press, 1996. P. 206–216.
24. Waegeman H., Beauprez J., Moens H., Maertens J., De Mey M., Foulquié-Moreno M.R., Heijnen J.J., Charlier D., Soetaert W. // BMC Microbiol. 2011. V. 11. № 70. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-70>
25. Clomburg J.M., Vick J.E., Blankschien M.D., Rodríguez-Moyá M., Gonzalez R. // ACS Synth. Biol. 2012. V. 1. P. 541–554.
26. Zhuang Z., Song F., Zhao H., Li L., Cao J., Eisenstein E., Herzberg O., Dunaway-Mariano D. // Biochemistry. 2008. V. 47. № 9. P. 2789–2796.
27. Chen M., Ma X., Chen X., Jiang M., Song H., Guo Z. // J. Bacteriol. 2013. V. 195. № 12. P. 2768–2775.

## Effect of the Glyoxylate Shunt Inactivation on Biosynthesis of Adipic Acid Through the Inverted Fatty Acid $\beta$ -oxidation by *Escherichia coli* Strains

A. Yu. Gulevich<sup>a</sup>, \*, A. Yu. Skorokhodova<sup>a</sup>, and V. G. Debabov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

\*e-mail: andrey.gulevich@gmail.com.ru

Using *Escherichia coli* MG1655 *lacI*<sup>Q</sup>,  $\Delta$ *ackA-pta*,  $\Delta$ *poxB*,  $\Delta$ *ldhA*,  $\Delta$ *adhE*,  $\Delta$ *fadE*, P<sub>L</sub>-SD<sub>φ10</sub>-*atoB*, P<sub>trc-ideal-4</sub>-SD<sub>φ10</sub>-*fadB*, P<sub>L</sub>-SD<sub>φ10</sub>-*tesB*,  $\Delta$ *yciA* as a core strain, the derivatives capable of synthesizing adipic acid from glucose through the inverted fatty acid  $\beta$ -oxidation pathway were obtained. Biosynthesis of the target compound by recombinants was ensured upon the primary condensation of acetyl-CoA and succinyl-CoA by 3-oxoacyl-CoA thiolase PaaJ and the catalysis of the final reaction of the cycle by acyl-CoA dehydrogenases FadE and FabI. Deletion in the strains of *sucCD* genes encoding components of succinyl-CoA synthase did not increase the relative intracellular availability of succinyl-CoA for target biosynthetic reactions and did not lead to an increase in adipic acid accumulation by the recombinants. The secretion of succinic and malic acids by the strains with an impaired tricarboxylic acid cycle remained almost unchanged, indicating the activity in the cells of glyoxylate shunt reactions that compete with the cycle reactions for isocitrate, required for succinyl-CoA formation. When isocitrate lyase, malate synthases A and G, and bifunctional kinase/phosphatase isocitrate dehydrogenase were inactivated in strains due to deletion of the *aceBAK* operon genes and *glcB*, adipic acid synthesis by recombinants increased threefold and reached 0.33 mM.

**Keywords:** adipic acid, *Escherichia coli*, fatty acid  $\beta$ -oxidation, glyoxylate shunt, metabolic engineering, succinyl-CoA

УДК 579.873.21.083.182:574.22

## ВЫЯВЛЕНИЕ “НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ” КЛЕТОК *Mycobacterium tuberculosis* КУЛЬТУРАЛЬНЫМИ МЕТОДАМИ

© 2023 г. Г. Р. Демина<sup>1</sup>, \*, М. О. Шлеева<sup>1</sup>, Д. И. Багаева<sup>1</sup>,  
Г. Н. Вострокнуртова<sup>1</sup>, А. С. Капрельянц<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр  
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: Galyademina@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.07.2022 г.

После доработки 18.08.2022 г.

Принята к публикации 10.09.2022 г.

Выявлены особенности реактивации “некультивируемых” клеток (НК) *Mycobacterium tuberculosis* (МТБ) для последующего размножения в жидкой среде, а также предложен подход количественной детекции таких клеток культуральными методами. После инокулирования, полученных *in vitro* НК МТБ в стандартную жидкую среду Сотона, наблюдалась продолжительная (до 20 сут) лаг-фаза, при которой размножение клеток отсутствовало. В течение лаг-фазы клетки секретируют вещества неустановленной природы, тормозящие или полностью прекращающие реактивацию и рост культур при исходных концентрациях НК выше  $10^7$ – $10^8$  кл./мл. Введение мясопептонного бульона (3.25 г/л) в стандартную среду Сотона со сниженной в 10 раз концентрацией глицерина существенно стимулировало реактивацию и размножение НК при их инокулировании в концентрациях выше порогового значения. Такая модификация состава среды позволяла выявлять до  $10^3$  раз больше клеток в популяции МТБ методом наиболее вероятного числа клеток (НВЧК). Увеличение числа детектируемых НК в популяции (в среднем 2.5 порядка) достигалось также добавлением в среду для реактивации рекомбинантного белка RpfB (5 нг/мл), одного из белков семейства Rpf – факторов реактивации покоящихся бактерий. Возможно, действие Rpf связано с продуктами его ферментативной активности, поскольку увеличение НВЧК в популяции НК наблюдалось также при добавлении продуктов гидролиза пептидогликана (ПГ) микобактерий, полученных совместным действием RpfB и эндопептидазы RipA. Подобный эффект оказывало также добавление озвученных фрагментов пептидогликана (ФПГ) в концентрации до 1 мкг/мл. Полученные результаты могут быть использованы в качестве подходов для оптимизации состава жидких сред и условий культивирования с целью выявления возбудителя туберкулеза в состоянии “некультивируемости” в клинических образцах.

**Ключевые слова:** *M. tuberculosis*, “некультивируемые” клетки, лаг-фаза, реактивация, белки Rpf, фрагменты пептидогликана

**DOI:** 10.31857/S0555109923020058, **EDN:** LLCNVA

В настоящее время диагностика туберкулеза (ТБ) базируется, в том числе, на микробиологическом обнаружении возбудителя с помощью культуральных методов в жидкостях пациента (в основном в мокроте для легочных форм ТБ). Общепринятый “золотой стандарт”, используемый для подтверждения наличия инфекционного агента, предусматривает отбор биопробы, ее внесение в селективную питательную среду, подрашивание клеток возбудителя до достаточно высоких концентраций и заключительную характеристику их видовой принадлежности посредством специфического окрашивания, микроскопии и др. В распространенной в клинике автоматической системе ВАСТЕС наличие МТБ в образцах оценивают по дыхательной активности бактериальных клеток после их длительного (до 20 сут) культивиро-

вания в жидкой среде [1]. Однако на практике, в таких исследованиях проблемой является получение ложноотрицательных результатов, причины которых не совсем ясны. В ряде публикаций эту проблему связывали с так называемой “некультивируемостью” микобактерий, возникающей в результате стресса, в том числе при контакте с макроорганизмом или антибиотиками. В экспериментах *in vitro* было выявлено, что такие НК нуждаются в специальной процедуре реактивации перед их размножением [2], что, вполне вероятно, является необходимой процедурой для выявления бактерий в биопробах пациентов. Наличие таких форм может требовать более длительного времени культивирования для их обнаружения, чем в существующих протоколах. О наличии НК МТБ в биообразцах свидетельствуют данные Медлар с

соавт. [3], которые сообщили, что поврежденные органы (легкие, селезенка) содержали микобактерии, которые могли быть выявлены микроскопически, но не образовывали колоний при высеве на плотные среды. Эти наблюдения подтверждены многими другими авторами [4, 5]. Бикетовым с соавт. было показано, что клетки МТБ, изолированные из культивируемых макрофагов, были неспособны к формированию колоний на агаризованной среде, но могли расти в жидкой среде после инкубации с белком Rpf [6]. Дилон с соавт. продемонстрировали, что в тканях животных с хронической формой туберкулеза лишь 1–5% изолированных микобактерий образовывали колонии на плотных средах, в то же время “оживление” этих клеток в жидкой среде приводило к увеличению численности культивируемых форм в 20–100 раз [7]. Было продемонстрировано наличие НК МТБ в мокроте пациентов [8], которые могли быть реактивированы в жидкой среде только в присутствии веществ неясной природы, содержащихся в фильтрате, полученном из культуры активных клеток МТБ [9].

Таким образом, проблема изначально “некультивируемых” или поврежденных клеток возбудителя туберкулеза, которые являются жизнеспособными и потенциально опасными, но не выявляются существующими культуральными методами, является актуальной для медицинской диагностики. В клинических образцах эти формы МТБ могут составлять значительную часть от всей популяции микобактерий [8].

Цель настоящей работы состоит в изучении особенностей реактивации клеток микобактерий и последующего их размножения на примере НК МТБ, полученных в экспериментальной модели *in vitro*, а также на поиск подходов для детекции таких клеток культуральными методами.

## МЕТОДИКА

**Культивирование *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 и *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.** *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 выращивали на стандартной среде Сотона pH 7.0 (г/л): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0.5, MgSO<sub>4</sub> – 0.5, L-аспарагина – 4.0, глицерина – 60 мл, цитрата железа (III) аммония – 0.05, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> – 2.0, (г/л): 1% ZnSO<sub>4</sub> – 0.1 мл) при 37°C, в колбах с 200 мл среды при перемешивании (200 об./мин). Для предотвращения агрегации клеток в среду вносили Твин-80 (“Sigma”, США) в концентрации 0.05%.

*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (получен из Центрального научно-исследовательского института туберкулеза РАН) выращивали аналогичным образом, однако, кроме Твин-80 (0.05%) среда Сотона включала ростовую добавку ADC (смесь бычьего сывороточного альбумина, глюкозы и каталазы, “Himedia”, Индия) в соотношении 1 : 10.

В отдельных экспериментах в среду вносили определенное количество мясопептонного бульона (МПБ) (“Himedia”, Индия) и изменяли концентрацию глицерина.

Многокомпонентная среда МОД4 была приготовлена согласно авторской рецептуре [10].

**Получение НК МТБ.** Культуру МТБ выращивали 8–11 сут при 37°C с перемешиванием (200 об./мин) в колбах объемом 100 мл, содержащих 40 мл среды Сотона и 0.05%-ный Твин-80 с добавлением ростовой добавки ADC. Эту культуру использовали для посева (конечная концентрация 10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> кл./мл среды) в модифицированную среду Сотона, pH 6.0, с ADC и с тилосаполлом (0.025%) вместо Твин-80. Культуру МТБ инкубировали в течение 40–60 сут при 37°C с перемешиванием (200 об./мин). Периодически проводили измерение pH среды. При повторном достижении значения pH 6.0–6.2 в стационарной фазе, культуру переносили в закрытые пластиковые фальконы на 50 мл и добавляли 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (МЭС) до конечной концентрации 20 мМ. Культуру МТБ хранили в статических условиях при комнатной температуре в темноте от 4 мес до 1 г.

**Оценка метаболической активности МТБ.** Метаболическую активность МТБ оценивали по интенсивности включения в клетки [5.6–<sup>3</sup>H] урацила. К 1 мл культуры добавляли 1 мкл (0.02 мкмоль, 1 мкКи) меченого урацила. Инкубацию культуры с внесенной меткой проводили в течение 20 ч с перемешиванием при 37°C. Клетки отмывали 3 раза 7%-ной ТХУ и 96%-ным этанолом на стеклянных фильтрах GFC (“Whatman”, США), которые затем помещали в сцинтилляционную жидкость (Ultima GOLD™, “PerkinElmer”, США). Уровень радиоактивности измеряли на счетчике LS6500 (“Beckman Coulter”, США).

**Число колониеобразующих единиц (КОЕ).** Число колониеобразующих единиц определяли по высевам на плотную питательную (1.5% агара) среду МПБ (для *M. smegmatis*) или Сотона с ADC (для МТБ) по 100 мкл суспензии из серии последовательных десятикратных разведений исходной культуры. КОЕ для МТБ подсчитывали через 3–4 нед. инкубации при 37°C после посева, определяя его как среднее из результатов подсчета, сделанного в 3 повторностях. КОЕ для *M. smegmatis* определяли через 5 сут инкубации при 37°C. Предел обнаружения КОЕ составлял 10 кл./мл.

**Подсчет наиболее вероятного числа клеток (НВЧК).** Подсчет наиболее вероятного числа клеток в культурах МТБ, содержащих НК, проводили в пластиковых 48-луночных планшетах (“Corning”, США), каждая лунка которого содержала 0.9 мл среды Сотона с добавлением ADC и по 0.1 мл культуры из соответствующего десятикратного серийного разведения. В некоторых экспериментах в среду добавляли МПБ или другие добавки в

различных концентрациях. Каждое разведение было представлено в 3 повторностях. Планшеты инкубировали в течение 2 мес. при 37°C в статическом режиме. При подсчете наиболее вероятного числа реактивированных клеток учитывали лунки с видимым бактериальным ростом. Значение НВЧК в 1 мл и доверительные интервалы определяли по стандартным статистическим таблицам [10].

**Реактивация НК МТБ.** Процедуру реактивации НК МТБ проводили 2 способами: в жидкой среде в 48-луночных планшетах с одновременной оценкой НВЧК (как описано выше) или в колбах с 200 мл среды Сотона с добавкой ADC и другими добавками при 37°C с перемешиванием (100 об./мин). В последнем случае перед инокулированием клетки отмывали от среды культивирования 8–10 раз в фосфатном буфере pH 7.2. Периодически отбирали пробы для измерения оптической плотности при 600 нм (ОП<sub>600</sub>), включения радиоактивного урацила, определения КОЕ и НВЧК. В отдельных экспериментах к среде реактивации добавляли фильтраты, отобранные в разное время из реактивированной культуры МТБ.

**Получение рекомбинантных белков RpfB и RipA.** Литическая трансглюкозилаза RpfB (Resuscitation Promoting Factor B) и эндопептидаза RipA (Resuscitation Promoting Factor Interacting Protein A) были получены из Institute of Biostructures and Bioimaging, С.Н.Р. (Неаполь, Италия) в виде конструкций RpfB<sub>268–362</sub> и RipA<sub>332–472</sub>. Экспрессию белков в клетках *E. coli*, выделение и очистку белков проводили по методике, описанной в статье [11].

**Получение пептидогликана микобактерий.** Получение ПГ микобактерий проводили по методикам, описанным ранее [12, 13] в модификации [11] с использованием культуры *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 и *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

**Получение меченого препарата ПГ.** Меченый флуоресцентным красителем (флуоресцеин-5-изотиоцианат, ФИТЦ, “Sigma”, США) препарат ПГ получали в соответствии с опубликованной методикой [11].

**Получение фрагментов пептидогликана (ФПГ) путем ферментативного гидролиза.** ФПГ получали из меченого и немеченого ПГ путем его гидролиза белками RpfB и RipA (по 20 мкг/мл каждого белка) отдельно и в комбинации в течение 6 сут при 37°C при постоянном перемешивании. Через 6 сут ферментативную реакцию останавливали нагреванием при 80°C в течение 20–40 мин. Нерастворенные и не гидролизованные остатки ПГ удаляли центрифугированием при 10000 g в течение 15 мин.

В случае с меченым ПГ интенсивность флуоресценции супернатанта после центрифугирования измеряли при длине волны возбуждения 492 нм и длине волны испускания 515 нм. Уровень гидролиза оценивали по интенсивности флуоресцен-

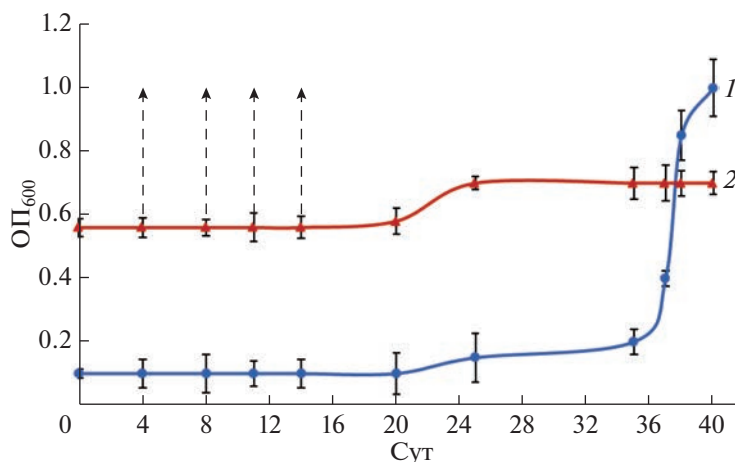
ции супернатанта. При гидролизе немеченого ПГ концентрацию полученных ФПГ определяли фенол-серноокислотным методом [14].

**Получение ФПГ путем ультразвуковой дезинтеграции.** Пептидогликан микобактерий в концентрации 2 мг/мл суспендировали в фосфатном буфере pH 6.0. ПГ озвучивали на ультразвуковом дезинтеграторе HD 2200 (“Sonopuls”, Германия) в течение 1 мин (режим пульсаций – 9 циклов в минуту). Озвученную смесь центрифугировали при 10000 g 15 мин для удаления неразрушенного ПГ, а супернатант, содержащий ФПГ, собирали и лиофилизировали.

**Определение суммарной концентрации ФПГ.** Концентрацию ФПГ определяли фенол-серноокислотным методом Дюбуа [14]. К 500 мкл исследуемого образца добавляли 6 мкл фенола (80%-ный водный раствор) и 500 мкл концентрированной серной кислоты. ОП полученного раствора измеряли при 485 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Эффект “самоингибирования” при реактивации покоящихся клеток *M. tuberculosis*.** В лабораторной практике для выявления МТБ в клинических образцах используют культуральные методы, предполагающие размножение клеток возбудителя в специальных жидких средах. Однако, как ведут себя НК в таких условиях практически не было исследовано. С этой целью в настоящей работе были использованы покоящиеся формы МТБ, утратившие способность расти на стандартных плотных средах. Такие НК МТБ были получены *in vitro* в условиях длительной стационарной фазы при медленном самоокислении жидкой среды и последующего хранения клеток в этой среде [15]. В результате, после 4 мес. пребывания в состоянии покоя, культура в основном была представлена морфологически измененными клетками, обладающими выраженной “некультивируемостью”: КОЕ от 10 до 10<sup>3</sup> кл./мл при общей концентрации клеток 10<sup>9</sup>–10<sup>10</sup> кл./мл [15]. Такие формы бактерий могли быть реактивированы в жидкой среде Сотона с ростовой добавкой ADC, а количество клеток в исходной культуре могло быть определено с помощью метода НВЧК в планшетном варианте с использованием серийных разведений с последующей инкубацией [2, 9]. Однако при воспроизведении подобных экспериментов при инокулировании НК микобактерий в колбы с той же средой было выяснено, что эффективность их реактивации сильно зависит от начальной концентрации клеток. Так, при использовании НК в исходной концентрации 10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> кл./мл (суммарное количество) наблюдалось размножение бактерий в культуре (увеличение ОП) спустя 20–35 сут для разных экспериментов



**Рис. 1.** Изменение ОП<sub>600</sub> культур при реактивации НК МТБ в среде Сотона с АСД: 1 – исходная концентрация клеток  $10^6$  кл./мл, 2 – исходная концентрация клеток  $5 \times 10^7$  кл./мл. Стрелками показаны точки отбора культуры.

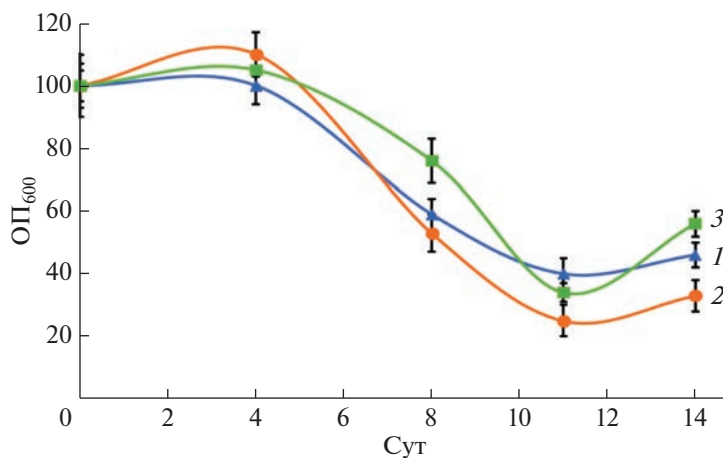
в зависимости от срока хранения НК (рис. 1). В тоже время при инокулировании тех же клеток до оптических плотностей 0.4 и выше (около  $10^7$ – $10^8$  кл./мл) реактивация не происходила вовсе и со временем клетки погибали (рис. 1). Это позволило предположить, что в процессе реактивации НК МТБ секретируют в окружающую среду некие ингибирующие вещества. Для экспериментального подтверждения этого предположения из инкубированных культур НК МТБ (с исходной высокой концентрацией клеток) периодически отбирали пробы (рис. 1), которые затем пропускали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Было изучено действие полученного фильтрата на рост вегетативных клеток МТБ, взятых в экспоненциальной фазе роста. Как оказалось, ингибирующее действие фильтрата, вызывающее торможение роста клеток, зависело от продолжительности инкубации НК в среде Сотона, и достигало максимума при инкубировании в течение 11 сут (рис. 2). Обнаружено также снижение ингибирующей активности фильтрата с увеличением времени инкубации более 11 сут, что могло свидетельствовать об относительной нестойкости секретируемого вещества (рис. 2). Таким образом, была установлена секреция неких антибактериальных веществ НК МТБ в процессе их реактивации. Такое “самоингибирование”, очевидно, удлиняет лаг-фазу и увеличивает время детекции возбудителя в образцах, особенно в условиях их значительной обсемененности. Ранее подобный эффект был отмечен для реактивированной культуры *Micrococcus luteus* [16]. Установление природы этих антибактериальных соединений, способов их инактивации, или ингибирование их синтеза может быть перспективным для ускорения культурального метода детекции МТБ.

**Особенности лаг-фазы при реактивации покоящихся клеток *M. tuberculosis*.** При исследовании реактивации НК МТБ в жидкой среде при исходной концентрации клеток ниже порогового уровня ( $\sim 10^7$  кл./мл) была выявлена двухстадийность этого процесса: быстрое нарастание числа КОЕ на ранних стадиях реактивации (4 сут) и последующая длительная лаг-фаза, предшествующая началу деления клеток до 20 сут (рис. 3). Вероятно, быстрый подъем значения КОЕ не связан с размножением клеток, поскольку, во-первых, значение НВЧК культуры (концентрация клеток, способных к размножению) не изменялось за этот период (рис. 3). Во-вторых, несмотря на изменение в КОЕ, клетки в культуре проявляли фоновую дыхательную активность, которая увеличивалась лишь к началу активного деления клеток (30 сут), и незначительный уровень включения радиоактивного урацила (маркер синтеза РНК) до этого момента (рис. 3). Наконец, скорость изменения КОЕ в этот период соответствует кажущемуся времени генерации  $\sim 1.5$  ч, что значительно ниже известного времени генерации для МТБ (около 20 ч). Очевидно, что резкий подъем КОЕ на начальной стадии реактивации отражает изменения каких-то свойств НК, в результате которых они приобретают способность к росту на плотных средах.

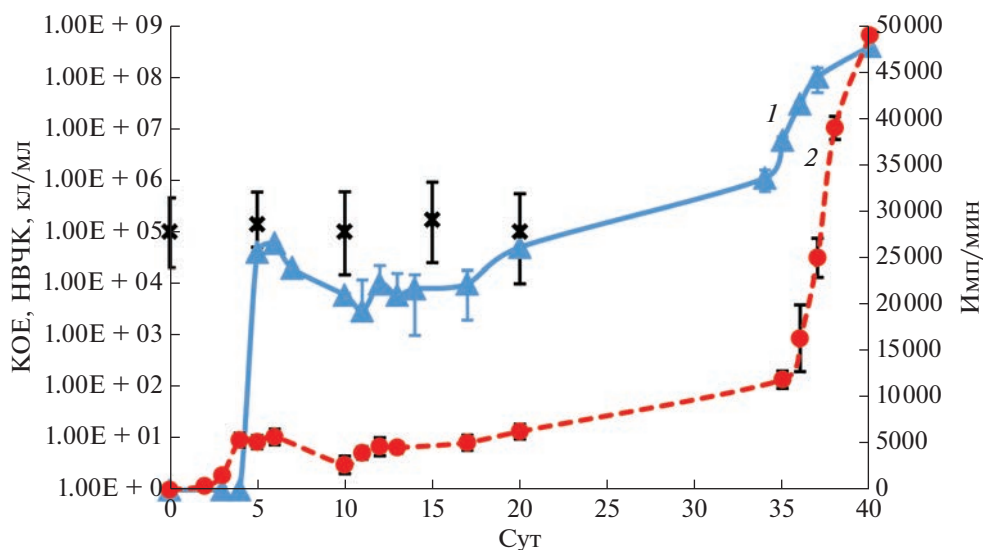
В случае реактивации НК с исходной концентрацией выше пороговой ( $\sim 10^7$  кл./мл) также наблюдалась быстрая стадия увеличения КОЕ, сменяющаяся длительной фазой медленного снижения КОЕ, которое в итоге достигало значений ниже детектируемого уровня (рис. 4).

Таким образом, эти результаты свидетельствовали о наличии продолжительной истинной лаг-фазы при реактивации НК МТБ (при относительно небольших начальных концентрациях), в течение ко-





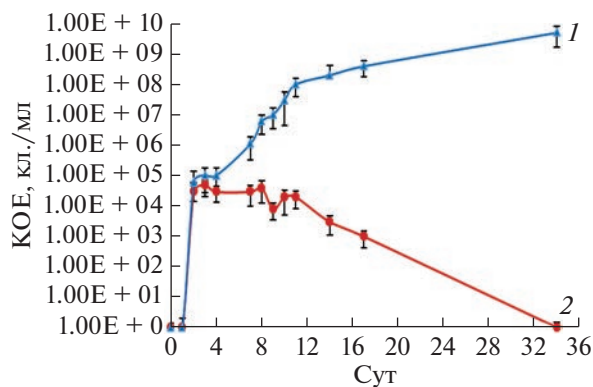
**Рис. 2.** Ингибирование роста активных клеток МТБ в присутствии фильтратов реактивированной культуры МТБ, содержащей НК. На оси абсцисс – время отбора фильтратов из реактивированной культуры. На оси ординат – отношение  $OP_{600}$  активной культуры, выращенной в присутствии фильтратов к таковому без фильтрата (контроль) через 3 сут (1); 4 сут (2) и 7 сут (3) инкубации.



**Рис. 3.** Изменение метаболической активности клеток (2, импульсов/мин мг влажного веса клеток) и КОЕ (1, кл./мл) при реактивации НК МТБ на среде Сотона с добавкой АДС. Крестиками отмечены значения НВЧК. (Исходная концентрация бактерий  $2 \times 10^5$  кл./мл). Показаны стандартные отклонения для КОЕ и включения метки, а также доверительные интервалы на уровне 95% для НВЧК. Приведены результаты типичного из 4 проведенных экспериментов.

торой не происходит размножение, в отличие от кажущейся лаг-фазы, когда при неизменяющейся ОП происходит размножение культивируемых клеток при их малом начальном количестве. Ранее подобная двухстадийность была обнаружена при реактивации НК *M. smegmatis*. Было выяснено, что в течение истинной лаг-фазы, тем не менее, происходит “метаболическая реактивация”, при которой регистрируется увеличение мембранного потенциала, разрушение накопленной в покое трегалозы и изменения в морфологии клеток [17]. Обнаруженная длительная лаг-фаза,

предположительно, связана с несбалансированным метаболизмом клетки в процессе реактивации, при котором возможно накопление промежуточных метаболитов с ингибирующими свойствами, например, таких активных карбонильных соединений, как метилглиоксаль [18]; либо с недостатком неких метаболитов, необходимых для запуска метаболических процессов в клетках (“фенотипическая ауксотрофия”); либо необходимостью присутствия факторов, способствующих делению клеток. В любом случае, обнаруженная истинная лаг-фаза, очевидно, определяет длительность культивиру-



**Рис. 4.** Изменение количества КОЕ (кл./мл) при реактивации НК МТБ на средах: Сотона + ADC + МПБ (1, 3.25 г/л), Сотона + ADC (2). Исходная концентрация бактерий  $2 \times 10^7$  кл./мл.

вания образцов с НК для их детекции культуральными методами.

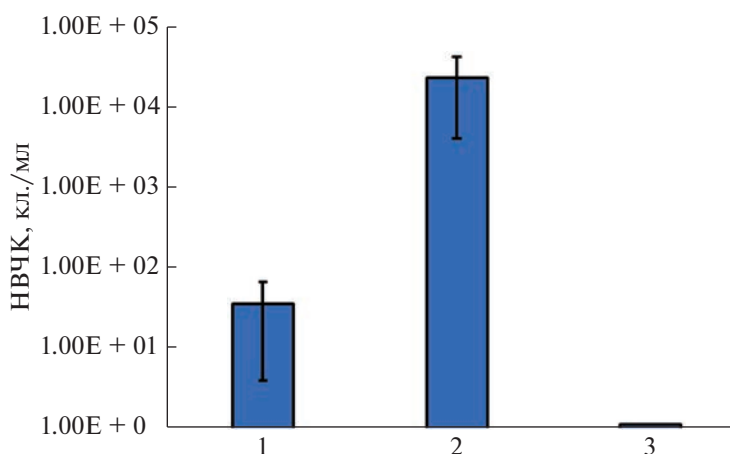
**Модификация среды для стимуляции реактивации НК *M. tuberculosis*.** Для поиска состава среды оптимальной для реактивации НК был проведен скрининг различных добавок, в том числе субстратов и антиоксидантов. В качестве объекта на начальном этапе использовали НК быстрорастущей микобактерии *M. smegmatis*, часто применяемой в качестве модельного микроорганизма для МТБ [19]. НК *M. smegmatis* получали аналогично НК МТБ при медленном закислении среды [20]. В итоге было проверено в качестве добавок 16 веществ в разных концентрациях, потенциально способных влиять на рост микобактерий. Наибольшая стимуляция реактивации, которую оценивали по увеличению КОЕ в течении реактивации, была отмечена при введении в среду Сотона мясоептонного бульона (МПБ) в оптимальной концентрации 3.25 г/л. Найденный эффект МПБ был использован в экспериментах по стимуляции реактивации НК МТБ. В качестве базовой среды использовали среду Сотона с добавкой ADC, в которую инокулировали НК в исходной концентрации выше порогового уровня ( $\sim 10^7$  кл./мл). Как видно из рис. 4, при добавлении в среду МПБ происходило сокращение лаг-фазы (до 2 сут) и быстрое последующее размножение клеток. Эти эксперименты указывают на наличие неких компонентов, содержащихся в МПБ, необходимых для реактивации НК и дальнейшего их размножения.

**Оптимизация культурального метода НВЧК для количественного определения содержания “некультивируемых” форм *M. tuberculosis*.** Выявление возбудителя в образцах путем культивирования в жидкой среде (см. выше), по-существу, является качественным методом, особенно если в популяции содержатся НК. Действительно, в этом случае трудно разделить процессы реактивации НК и

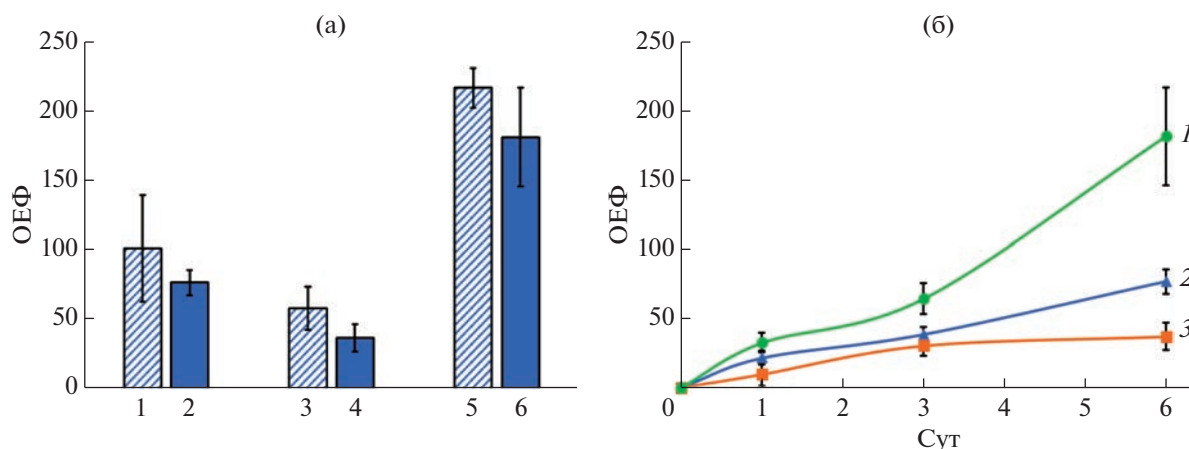
размножения начально культивируемых клеток. В настоящее время метод НВЧК является единственным количественным методом, позволяющим определять в бактериальной популяции концентрацию НК, потенциально способных к размножению. Многочисленные физические методы (например, флуоресцентная микроскопия) или молекулярно-биологические методы (ПЦР или ПЦР в реальном времени) не могут определить способна ли данная бактериальная клетка к делению. В тоже время ясно, что именно способность к делению определяет инфекционный потенциал НК МТБ. В этой связи были предприняты попытки модификации жидкой среды при определении методом НВЧК для повышения его эффективности. Как видно из рис. 5, внесение МПБ (3.25 г/л) в базовую среду Сотона, используемую в методе НВЧК, увеличивало на 2.5 порядка количество детектируемых в исходной популяции клеток, способных к размножению, по сравнению с определением НВЧК без добавки. При этом также было обнаружено, что для максимальной эффективности метода, концентрация глицерина в среде должна быть снижена по сравнению с классической прописью среды Сотона до 0.5%.

В отдельных экспериментах была протестирована полная многокомпонентная среда МОД4, описанная недавно в литературе в качестве эффективной среды для стимуляции роста активной культуры МТБ [10]. Однако реактивация НК и их размножение на данной среде не наблюдались (рис. 5). По-видимому, обогащение среды реактивации метаболизируемыми субстратами оказывает отрицательный эффект на реактивацию и выявление НК МТБ, о чем также свидетельствует необходимость снижения концентрации глицерина (основной субстрат, используемый МТБ) и использование оптимального количества МПБ. Отрицательный эффект повышенных концентраций субстратов в среде напоминает явление гибели голодающей культуры бактерий при добавлении питательного компонента, усиливающего её рост в нормальных условиях (substrate accelerated death) [21].

Другой подход к оптимизации метода НВЧК мог состоять в использовании веществ, способствующих делению клеток на заключительном этапе реактивации НК [11, 22–24]. Как было ранее выяснено, фильтраты активно растущих культур микобактерий способствуют обнаружению НК микобактерий как в образцах, полученных *in vitro* [2, 9], так и в образцах больных ТБ (мокрота) [25]. Однако природа, присутствующих веществ установлена не была. Более того, несмотря на эффективность применения фильтрата для стимуляции реактивации НК, на практике их применение затруднено из-за короткого срока сохранения их реактивирующей активности, даже в замороженном состоянии, и дополнительной трудности



**Рис. 5.** Количество способных к размножению клеток (клет./мл) в культурах МТБ, содержащих НК, определенных методом НВЧК на средах: Сотона + ADC (1), Сотона + ADC + МПБ (2, 3.25 г/л) и МОД4 (3). Указаны доверительные интервалы на уровне 95% для значений НВЧК.

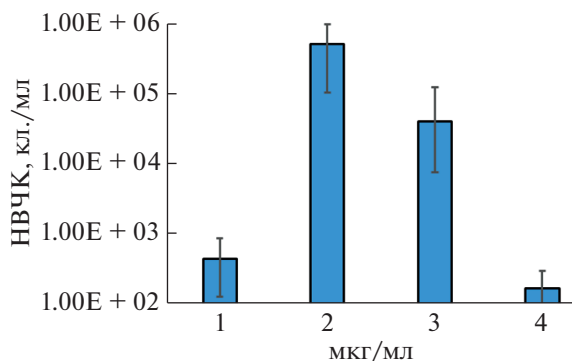


**Рис. 6.** Гидролиз меченых ФИТЦ препаратов ПГ, выделенных из *M. smegmatis* и МТБ (а) белками RpfB (1, 2 соответственно), RipA (3, 4 соответственно) и RpfB + RipA (5, 6 соответственно), динамика гидролиза ФИТЦ-ПГ (б) при 37°C под действием RpfB + RipA (1), RpfB (2); RipA (3). На оси ординат – относительные единицы флуоресценции (ОЕФ) супернатантов, полученных после осаждения негидролизованых препаратов.

получения. В этой связи были предприняты попытки использования активных компонентов, которые могут находиться в фильтрате. Ранее было обнаружено, что секретируемые белки семейства Rpf микобактерий и продукты их ферментативного действия стимулируют реактивацию НК *M. smegmatis* на этапе деления клеток [11, 22]. В настоящем исследовании это явление было проверено на модели НК МТБ. Для этих экспериментов были получены рекомбинантные белки RpfB и RipA [26–28]. Эти белки гидролизуют ПГ с образованием минимальной структуры, ответственной за реактивацию – дисахарид дипептида (N-ацетилглюкозамин-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин), вне зависимости от наличия аминокислоты во втором положении (D-глутамат или D-изоглутамин) [11].

С помощью полученных белков был проведен гидролиз выделенного препарата ПГ из двух источников – МТБ и *M. smegmatis*. Сравнение эффективности гидролиза ПГ из *M. smegmatis* и МТБ в течение 6 сут инкубации ПГ с белками не выявило существенных различий в количестве высвободившихся ФПГ (рис. 6а). Из рис. 6б видно, что при совместном действии двух белков по сравнению с действием отдельных белков, при гидролизе меченого ФИТЦ ПГ МТБ наблюдался синергетический эффект.

ФПГ, полученные после гидролиза ПГ, а также белок RpfB были испытаны в различных вариантах для стимуляции реактивации НК. В присутствии ФПГ и белка RpfB было обнаружено увеличение НК МТБ, способных к реактивации. Хотя уровень



**Рис. 7.** Количество способных к размножению клеток в культурах МТБ, содержащих НК, определенных методом НВЧК на средах: Сотона + АДС (1); Сотона + АДС + RpfB (2, 5 нг/мл); Сотона + АДС + ΦПГ после гидролиза белком RpfB (3, 200 нг/мл); Сотона + АДС + препарат арабиногалактана (4, в качестве контроля, 200 нг/мл). Показано стандартное отклонение данных в сериях от 3 до 10 повторностей.

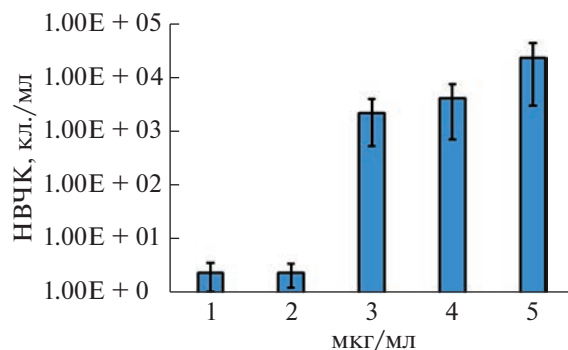
стимуляции варьировал в экспериментах, увеличение эффективности детекции было достоверным и составляло от 2 до 3 порядков (рис. 7).

Поскольку результатом энзиматического действия белков Rpf является разрушение ПГ, действие ФПГ, полученных в результате энзиматического гидролиза сравнили с действием ФПГ, полученных в результате озвучивания. Как оказалось, “ультразвуковые” ФПГ также увеличивают количество детектируемых НК МТБ методом НВЧК (рис. 8).

Таким образом, вполне вероятно, что используемые в вышеперечисленных работах фильтраты оказывали положительное действие за счет присутствия в них ФПГ. Исследования позволили установить, что стимуляция реактивации НК МТБ может быть достигнута заменой фильтрата на продукты гидролиза ПГ, полученные с помощью RpfB и RipA, и даже на ФПГ, полученные при его ультразвуковом разрушении. Обработка ультразвуком намного проще технически, а ФПГ намного стабильнее фильтрата при хранении.

В результате проведенного исследования были установлены особенности ранней стадии реактивации НК МТБ. Выявлены факторы, влияющие на скорость и уровень детекции таких клеток в культурах МТБ. Эти знания могут быть использованы в качестве подходов для усовершенствования микробиологической диагностики туберкулеза при исследовании биологических образцов больных ТБ.

Авторы выражают благодарность В.Д. Никитушкину за участие в работе по получению клеточных стенок микобактерий, а также выражают благодарность А. Ruggiero и R. Berisio (Institute of Biostructures and Bioimaging, C.N.R., Неаполь,



**Рис. 8.** Влияние ФПГ после ультразвуковой обработки ПГ в культурах МТБ, содержащих НК, на количество способных к размножению клеток, определенных методом НВЧК на средах: Сотона + АДС (1, контроль); Сотона + АДС + 0.05 мкг/мл ФПГ (2); Сотона + АДС + 0.1 мкг/мл ФПГ (3); Сотона + АДС + 0.2 мкг/мл ФПГ (4) и Сотона + АДС + 1 мкг/мл ФПГ (5). Доверительные интервалы указаны на уровне 95% для значений НВЧК.

Италия) за предоставленные конструкции белков RpfB и RipA.

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эргешов А.Э., Черноусова Л.Н., Андреевская С.Н. // Вестник РАМН. 2019. Т. 74. № 6. С. 413–422.
2. Shleeva M.O., Bagramyan K., Telkov M.V., Mukamolova G.V., Young M., Kell D.B., Kaprelyants A.S. // Microbiology. 2002. V. 148. № 5. P. 1581–1591.
3. Medlar E.M., Bernstein S., Steward D.M. // Am. Rev. Tuberc. 1952. V. 66. № 1. P. 36–43.
4. Beck F., Yegian D. // Am. Rev. Tuberc. 1952. V. 66. № 1. P. 44–51.
5. Hobby G.L., Auerbach O., Lenert T.F., Small M.J., Comer J.V. // Am. Rev. Tuberc. 1954. V. 70. № 2. P. 191–218.
6. Biketov S.F., Mukamolova G.V., Potapov V., Gilenkov E., Vostroknutova G.N., Kell D.B., Young M., Kaprelyants A.S. // FEMS Immunol Med Microbiol. 2000. V. 29. № 4. P. 233–240.
7. Dhillon J., Lowrie D.B., Mitchison D.A. // BMC Infect. Dis. 2004. V. 4. P. 4–7.
8. Mukamolova G.V., Turapov O., Malkin J., Woltmann G., Barer M.R. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2010. V. 181. P. 174–180.
9. Shleeva M.O., Kudykina Y.K., Vostroknutova G.N., Suzina N.E., Mulyukin A.L., Kaprelyants A.S. // Tuberculosis (Edinb). 2011. V. 91. № 2. P. 146–154.
10. Ghodbane R., Raoult D., Drancourt M. // Sci Rep. 2014. V. 4. P. 4236.

11. Nikitushkin V.D., Demina G.R., Shleeva M.O., Guryanova S.V., Ruggiero A., Berisio R., Kaprelyants A.S. // FEBS J. 2015. V. 282. № 13. P. 2500–2511.
12. Parish T., Stoker N. // Methods in molecular Biology. In Mycobacteria protocols, Humana Press, Totowa, NJ. 1998. P. 91–107.
13. Mahapatra S., Crick D.C., McNeil M.R., Brennan P.J. // J Bacteriol. 2008. V. 190. № 2. P. 655–661.
14. Du Bois A.B., Botelho S.Y., Bedell G.N., Marshall R., Comroe J.H. Jr. // J Clin Invest. 1956. V. 35. P. 322–326.
15. Shleeva M.O., Kudykina Y.K., Vostroknutova G.N., Suzina N.E., Mulyukin A.L., Kaprelyants A.S. // Tuberculosis (Edinb). 2011. V. 91. № 2. P. 146–154.
16. Mukamolova G.V., Kaprelyants A.S., Kell D.B. // Antonie Van Leeuwenhoek. 1995. V. 67. № 3. P. 289–295.
17. Shleeva M.O., Trutneva K.A., Demina G.R., Zinin A.I., Sorokoumova G.M., Laptinskaya P.K., Shumkova E.S., Kaprelyants A.S. // Front Microbiol. 2017. V. 8. P. 524.
18. Nikitushkin V.D., Trenkamp S., Demina G.R., Shleeva M.O., Kaprelyants A.S. // Metabolomics. 2020. V. 16. № 2. P. 24.
19. He Z., De Buck J. // BMC Microbiol. 2010. V. 10. P. 121.
20. Кудыкина Ю.К., Шлеева М.О., Арцатбанов В.Ю., Сузина Н.Е., Капрельянец А.С. // Микробиология. 2011. Т. 80. № 5. С. 625–636.
21. Postgate J.R., Hunter J.R. // Nature. 1963. V. 198. P. 273.
22. Nikitushkin V.D., Demina G.R., Shleeva M.O., Kaprelyants A.S. // Antonie Van Leeuwenhoek. 2013. V. 103. № 1. P. 37–46.
23. Shleeva M.O., Goncharenko A.V., Kudykina Y.K., Young D., Young M., Kaprelyants A.S. // PLoS One. 2013. V. 8. № 12. e82914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082914>
24. Назарова Е.В., Шлеева М.О., Морозова Н.С., Кудыкина Ю.К., Вострокнутова Г.Н., Ружицкий А.О., Селищева А.А., Сорокоумова Г.М., Швец В.И., Капрельянец А.С. // Биохимия. 2011. Т. 76. № 6. С. 781–791.
25. Zainabadi K., Walsh K.F., Vilbrun S.C., Mathurin L.D., Lee M.H., Saito K., Mishra S., Ocheretina O., Pape J.W., Nathan C., Fitzgerald D.W. // Antimicrob. Agents Chemother. 2021. V. 65. № 8. e0060821. <https://doi.org/10.1128/aac.00608-21>
26. Hett E.C., Chao M.C., Steyn A.J., Fortune S.M., Deng L.L., Rubin E.J. // Mol. Microbiol. 2007. V. 66. № 3. P. 658–668.
27. Hett E.C., Chao M.C., Deng L.L., Rubin E.J. // Plos pathogens. 2008. V. 4. № 2. e1000001. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000001>
28. Ruggiero A., Marasco D., Squeglia F., Soldini S., Pedone C., Berisio R. // Structure 2010. V. 18. № 9. P. 1184–1190.

## Detection of “Non-culturable” *Mycobacterium tuberculosis* Cells by Culture Methods

G. R. Demina<sup>a</sup>, \*, M. O. Shleeva<sup>a</sup>, D. I. Bagaeva<sup>a</sup>, G. V. Vostroknutova<sup>a</sup>, and A. S. Kaprelyants<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Bach Institute of Biochemistry, Fundamentals of Biotechnology Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

\**e-mail: Galyademina@yandex.ru*

The specific features of the reactivation of “non-culturable” (NC) *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) cells for the following propagation in liquid medium were defined, as well as the approach for the quantification of these cells by culture methods was suggested. When NC cells obtained in vitro were inoculated into standard Sauton’s liquid medium, a prolonged (up to 20 days) lag-phase is observed, in which no cell propagation is occurred. During the lag-phase, dormant cells secrete substances of unknown nature that inhibit or completely arrest the reactivation and growth of cultures when initial dormant cells concentration is above  $10^7$ – $10^8$  cells/mL. Addition of meat-peptone broth (3.25 g/L) into a standard Sauton’s medium with a 10-fold reduced concentration of glycerol significantly stimulated the reactivation and propagation of the initially dormant cells inoculated at a concentration above the threshold. This modification of the medium composition made it possible to detect up to  $10^3$  times more cells in the MTB population by the method of the Most Probable Number (MPN) of cells. Increased number of the detected dormant cells in the population (up to an average of 2.5 orders of magnitude) was also achieved by adding to the reactivation medium recombinant protein RpfB (5 ng/mL), a protein of the Rpf family – resuscitation promoting factor of dormant bacteria. Perhaps the action of a Rpf enzyme is related to the products of its enzymatic activity, since an increased MPN value in the dormant cells population was also observed when the products of mycobacteria peptidoglycan hydrolysis obtained by the coaction of RpfB and endopeptidase RipA were added. The addition of sonicated peptidoglycan fragments at a concentration up to 1  $\mu$ g/mL had a similar effect. The obtained results may be used as approaches to optimize liquid media composition and culture conditions aiming to identify in clinical samples the pathogen of tuberculosis remain in “non-culturable” state.

**Keywords:** *M. tuberculosis*, dormant cells, “non-culturable” cells, lag-phase, reactivation, Rpf proteins, peptidoglycan fragments



УДК 674.038,630.863

## ПРЕДОБРАБОТКА ТРОСТНИКА С ПОМОЩЬЮ ГЛУБОКИХ ЭВТЕКТИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ЕГО ГИДРОЛИЗУЕМОСТИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЦЕЛЛЮЛАЗ

© 2023 г. М. В. Семенова<sup>1</sup> \*, И. С. Васильева<sup>1</sup>, А. И. Ярополов<sup>1</sup>, А. П. Сеницын<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”  
Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН), Москва, 119071 Россия

\*e-mail: margo@mail.ru

Поступила в редакцию 15.11.2022 г.

После доработки 16.12.2022 г.

Принята к публикации 09.01.2023 г.

Проведена предобработка тростника рядом глубоких эвтектических растворителей (ГЭР) на основе холина хлорида (ХХл) в качестве акцептора водородной связи. Среди доноров водородной связи наиболее эффективными были молочная (МК) и щавелевая кислоты (ЩК). Оптимизированы условия предобработки тростника (соотношение компонентов ГЭР, температура и время воздействия), приводящие к наибольшему выходу восстанавливающих сахаров (ВС) и глюкозы в ходе его гидролиза целлюлазным ферментным препаратом (ФП) на основе *Penicillium verruculosum*. Установлено, что при использовании смеси ХХл и МК (молярное соотношение компонентов 1 : 5) наиболее эффективна предобработка при температуре 80°C в течение 24 ч, а при использовании смеси ХХл и ЩК (молярное соотношение 1 : 1) – при 80°C в течение 6 ч. При этом глубина последующего ферментативного гидролиза предобработанного тростника после 48 ч выдерживания в присутствии ФП *P. verruculosum* В537 составляла 80 и 86% по сухой массе для выбранных смесей ХХл/МК и ХХл/ЩК соответственно.

**Ключевые слова:** тростник, “зеленая” химия, глубокие эвтектические растворители, гидролиз, целлюлазы, *Penicillium verruculosum*

**DOI:** 10.31857/S0555109923030169, **EDN:** BELOAR

Возобновляемая целлюлозосодержащая растительная биомасса является привлекательным сырьем для производства биоэтанола и других полезных продуктов из-за низкой стоимости, изобилия и отсутствия конкуренции с продуктами питания. Традиционная схема переработки растительной биомассы включает измельчение, предварительную обработку, ферментативный гидролиз (осахаривание), ферментацию (брожение) и дистилляцию. Предварительная обработка необходима для снижения устойчивости биомассы к воздействию гидролитических ферментов, обусловленной наличием лигниновой матрицы и кристаллическим состоянием целлюлозы – факторов, препятствующих эффективному гидролизу целлюлазами [1]. Для увеличения реакционной способности биомассы используются различные методы ее предварительной обработки, направленные на разрушение кристаллической структуры целлюлозы, удаление лигнина и увеличение площади поверхности целлюлозы, доступной ферментам. Несмотря на то, что эти методы приводят к увеличению реакционной способности биомассы, они остаются

несовершенными с точки зрения “зеленой химии” и экологичности процесса [2, 3].

Альтернативой могут быть методы предобработки, основанные на использовании глубоких эвтектических растворителей (ГЭР) – они существенно увеличивают реакционную способность сырья [4]. ГЭР обладают рядом преимуществ по сравнению с обладающими теми же характеристиками ионными жидкостями (ИЖ) [5]: простота синтеза, стабильность, конкурентоспособность по цене (согласно примерной оценке стоимость синтеза ГЭР в 5–10 раз ниже стоимости ИЖ [6]), широкой доступностью (например, холин хлорид, ХХл, используется в качестве кормовой добавки при кормлении сельскохозяйственных животных и птицы) и безвредностью для окружающей среды [7].

Термин ГЭР был впервые введен в работе [8]. В зависимости от типа компонентов, участвующих в образовании эвтектической смеси, на сегодняшний день ГЭР подразделяются на четыре типа [9, 10]. Для целей биотехнологии наиболее перспективны ГЭР третьего типа, которые состоят из

акцепторов водородной связи (соли четвертичного аммония или фосфония) и доноров водородной связи (карбоновые кислоты, амиды, спирты и др.). Водородные связи приводят к делокализации заряда между донором и акцептором и температура плавления эвтектической смеси намного ниже по сравнению с индивидуальными соединениями. Наибольший интерес для предобработки растительной биомассы вызывают ГЭР, которые остаются жидкими при комнатной температуре или умеренном нагреве, что не препятствует процессам смешивания и массообмена с твердым растительным сырьем [11].

Важной характеристикой ГЭР является его вязкость, на которую могут влиять разные факторы, включая химическую природу компонентов ГЭР, их молярное соотношение, температура, содержание воды. Например, вязкость ГЭР на основе ХХл уменьшается с повышением температуры и содержания ХХл в определенном диапазоне [12].

Одним из требований к использованию ГЭР для предобработки содержащей целлюлозу биомассы является его способность растворять лигнин. Последний ограничивает ферментативный гидролиз, действуя как физический барьер, препятствуя доступу ферментов к полисахаридному субстрату, а также путем непродуктивного связывания ферментов [13, 14]. Было показано, что кислотные ГЭР (на основе молочной, яблочной, щавелевой и других кислот) наиболее эффективны в данном процессе и приводят к удалению более 90% лигнина из разных видов лигноцеллюлозной биомассы (кукурузных початков, рисовой соломы, лиственной и хвойной древесины) [15, 16].

Тростник относится к злакам, поэтому содержание лигнина в нем велико – от 18 до 26% в разных частях растения. Легкогидролизуемые полисахариды (в основном ксиланы) составляют 20–30%, трудногидролизуемые (целлюлоза) – 19–37% [17]. Варьированием состава ГЭР, температуры и времени предобработки возможно максимально увеличить гидролизуемость массы тростника путем уменьшения содержания в нем лигнина и увеличения доступности целлюлозы для ферментов.

Цель настоящей работы – подбор условий предобработки тростника южного (или обыкновенного), широко распространенного в низовьях Волги.

## МЕТОДИКА

**Ферментные препараты.** В работе были использованы ФП, которые представляли собой лиофильно высушенные культуральные жидкости, полученные на основе штаммов *P. verruculosum* B537 (продуцент целлюлазы) [18] и *P. verruculosum* F-10 (продуцент  $\beta$ -глюкозидазы) [19].

**Реагенты.** В работе использовали тростник обыкновенный из Астраханской области (Россия), грубо измельченный. В качестве субстратов для определения активностей использовали Na-соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), ксилан бука, *n*-нитрофенил- $\beta$ -глюкопиранозид (пНФГ) – производства “Sigma” (США) и микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ, ТУ 20.16.59-001-40693384-209) производства “Кристалл” (Россия). Для приготовления буферных смесей и солевых растворов использовали реактивы фирм “Bio-Rad Laboratories” (США), “Panreac” (Германия), “Helicon” и “Реахим” (Россия). Для получения ГЭР использовали ХХл (“Molekula”, Англия), глицерин (“Panreac Quimica”, Испания), этиленгликоль (“Roth”, Германия), молочную кислоту (МК) (“Acros Organics”, Бельгия), щавелевую кислоту (ЩК) (“ХимМед”, Россия).

**Получение ГЭР.** Все ГЭР получали путем термического смешивания компонентов при постоянном перемешивании в течение 6 ч: ХХл/МК (молярные соотношения 1 : 2 и 1 : 5) – при 40°C; ХХл/ЩК (молярные соотношения 1 : 1 и 1 : 2) – при 60°C; ХХл/пропионовая кислота (молярное соотношение 1 : 2) – при 40°C; ХХл/глицерин (молярное соотношение 1 : 2) – при 50°C; ХХл/этиленгликоль (молярное соотношение 1 : 2) – при 40°C.

**Предобработка тростника ГЭР.** Для выбора оптимальных условий предобработки использовали ГЭР различного состава: нейтральные на основе ХХл и многоатомных спиртов: глицерин, этиленгликоль и кислые на основе ХХл и кислот: МК, ЩК, пропионовая. Также варьировали время и температуру предобработки. В типичном эксперименте к 500 мг тростника добавляли 9.5 г ГЭР (загрузка 5% по массе) и прогревали при различных температурах в течение 1, 2, 3, 6, 7, 9, 12 или 24 ч при перемешивании. Растворы охлаждали до комнатной температуры и добавляли по 10 мл 50% водно-этанольного раствора. Смесь перемешивали, затем центрифугировали при 7000 g. Надосадочную жидкость, содержащую лигнин и компоненты ГЭР, отделяли, осадок многократно промывали водно-этанольной смесью. Следует отметить, что используемый в работе ГЭР ХХл/ЩК (молярное соотношение 1 : 2) при комнатной температуре затвердевал, что затрудняло его отделение от продуктов делигнификации биомассы.

Выход субстрата после предобработки определяли как отношение массы предобработанного тростника после высушивания до постоянного веса к массе исходного тростника (500 мг).

**Определение активности и концентрации ферментов.** За 1 ед. активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль продукта за 1 мин.

**Таблица 1.** Выход субстрата после предобработки и результаты последующего ферментативного гидролиза тростника, предобработанного ГЭР на основе ХХл (акцептор водородной связи) и разных доноров водородной связи (условия предобработки 7 ч при 90°С)

Донор водородной связи	Молярное соотношение (акцептор : донор)	Выход субстрата, %	Концентрация, г/л		ГФГ, %
			ВС	глюкоза	
Контроль*	—	—	2.3 ± 0.2	2.1 ± 0.1	6
Молочная кислота	1 : 2	61	15.7 ± 0.8	14.4 ± 0.7	39
	1 : 5	57	18.4 ± 0.9	16.0 ± 0.8	46
Щавелевая кислота	1 : 1	49	18.0 ± 0.9	17.4 ± 0.8	45
	1 : 2	44	3.5 ± 0.3	3.4 ± 0.2	9
Пропионовая кислота	1 : 2	92	8.2 ± 0.6	7.2 ± 0.3	21
Глицерин	1 : 2	93	3.7 ± 0.2	3.6 ± 0.2	9
Этиленгликоль	1 : 2	90	5.5 ± 0.3	5.2 ± 0.3	14

\* Контроль — тростник без предобработки.

Активность по отношению к МКЦ, КМЦ и ксилану определяли по скорости накопления ВС, анализируемых методом Шомоди-Нельсона; активность по отношению к пНФГл — по скорости накопления *n*-нитрофенола [20].

Содержание белка в ФП определяли методом Лоури, используя БСА в качестве стандарта.

**Ферментативный гидролиз предобработанного тростника.** Гидролиз субстрата (40 г/л по сухой массе в реакционной смеси) проводили под действием двух препаратов ФП В537 (10 мг белка/г субстрата или 0.4 мг/мл в реакционной смеси) и β-глюкозидазы ФП F10 (1 мг белка/г субстрата или 0.04 мг/мл реакционной смеси) в пробирках объемом 2 мл (объем реакционной смеси 1.5 мл) в термостатируемом шейкере. Процесс гидролиза вели в присутствии 0.1 г/л антибиотика ампициллина (“Белмедпрепараты”, Республика Беларусь) в 0.1 М Na-ацетатном буферном растворе pH 5.0 и 50°С.

Из реакционной смеси отбирали аликвоты, в которых определяли концентрацию ВС методом Шомоди-Нельсона и глюкозы с помощью набора “Глюкоза-АГАТ” (ООО “АГАТ”, Россия).

Глубину ферментативного гидролиза (ГФГ) рассчитывали, как отношение концентрации ВС после 48 ч ферментативного гидролиза к исходной концентрации субстрата (40 г/л).

Эксперимент проводился в трех повторах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Предобработка субстрата должна удовлетворять важному условию — эффективно удалять негидролизующую ферментами часть (лигнин), сохраняя целлюлозу и, при необходимости, гемицеллюлозу. Высокие значения выхода предобработанного субстрата 90–93% при использовании пропионо-

вой кислоты, глицерина или этиленгликоля в качестве донора водородной связи в ГЭР (табл. 1) свидетельствовали, по-видимому, о неполном удалении лигнина из тростника в ходе его предобработки. При использовании МК выход субстрата в ходе предобработки составил 57–61%, что указывало на эффективную делигнификацию и, вероятно, частичное удаление гемицеллюлозы. Использование ШК также приводило к удалению лигнина и части гемицеллюлозы в ходе предобработки, выход субстрата составил 44–49%.

На следующем этапе был проведен ферментативный гидролиз полученного предобработанного субстрата. Целлюлазный комплекс ферментов, способный к глубокому гидролизу целлюлозосодержащего сырья до глюкозы, должен включать в себя три основные группы ферментов: целлобио-гидролазы, эндоглюканызы и β-глюкозидазы [1]. Для осуществления биоконверсии предобработанного тростника были использованы ФП на основе штамма *P. verruculosum* В537 [18], содержащий ≈60% целлобио-гидролаз и ≈10% эндоглюканаз. ФП В537 обладал высокими удельными активностями по отношению к МКЦ (860 ед./г белка) и КМЦ (1300 ед./г белка), обусловленными наличием целлобио-гидролаз и эндоглюканаз соответственно. Однако ФП В537 обеднен β-глюкозидазой, о чем свидетельствуют низкое содержание этого фермента (2%) и невысокая активность по отношению к специфическому для β-глюкозидазы субстрату пНФГ (1800 ед./г белка). Для увеличения β-глюкозидазной активности в реакционную смесь добавляли ФП на основе штамма *P. verruculosum* F10 [19] — продуцента β-глюкозидазы, содержащий около 80% этого фермента и характеризующийся высокой активностью по отношению к пНФГ (6110 ед./г белка). Гидролиз целлюлозосодержащего сырья под действием двух ФП В537



(целлобиогидролазы и эндоглюканазы) и ФП F10 ( $\beta$ -глюкозидаза) приводил к высоким выходам глюкозы [21].

Кроме того, ФП B537 содержал ксиланазу (3%) и обладал высокой активностью к ксилану (1980 ед./г белка), что свидетельствует о способности данного препарата гидролизовать гемицеллюлозы.

Важно отметить, что исходный (без предобработки) тростник обладал очень низкой реакционной способностью: после 48 ч ферментативного гидролиза под действием двух ФП B537 и ФП F10 концентрация ВС составила около 2 г/л, что соответствовало ГФГ всего 6%.

При варьировании состава ГЭР предобработку тростника вели при 90°C в течение 7 ч (табл. 1). Наилучшие результаты были получены для смесей ХХл/МК (соотношение 1 : 5 было предпочтительней соотношения 1 : 2) и ХХл/ЩК (соотношение 1 : 1). После 48 ч ферментативного гидролиза концентрация ВС составила около 18 г/л (ГФГ 46%), концентрация глюкозы – 16–17 г/л. При использовании для предобработки смеси ХХл/ЩК с большей долей ЩК (молярное соотношение 1 : 2) полученный предобработанный субстрат имел крайне низкую реакционную способность и ГФГ составила всего 9%, что, возможно, связано со слишком жесткими условиями предобработки.

Среди использованных в работе ГЭР на основе ХХл с органическими кислотами ГЭР с пропионозой кислотой был наименее эффективным: концентрация ВС и глюкозы составили 8.2 и 7.2 г/л соответственно, ГФГ 21%.

Предобработка тростника смесями ХХл с глицерином или этиленгликолем приводила к увеличению доступности субстрата для ферментов и ГФГ после 48 ч гидролиза составляла 9 и 14% соответственно.

Таким образом, очевидно, что использование органических кислот в качестве донора водородной связи в ГЭР по сравнению с полиспиртами более эффективно. Оптимальными смесями для предобработки были выбраны ХХл/МК (молярное соотношение 1 : 5) и ХХл/ЩК (молярное соотношение 1 : 1).

На следующем этапе были подобраны оптимальные температура и время предобработки тростника для выбранных ГЭР. На рис. 1 показаны выходы продуктов ферментативного гидролиза (ВС и глюкозы) тростника, предобработанного смесями ХХл/МК при 60, 80 и 90°C или ХХл/ЩК при 70, 80 и 90°C за различные промежутки времени (1–24 ч).

При предобработке тростника смесью ХХл/МК его гидролиземость увеличивалась с увеличением времени предобработки (до 24 ч). Наибольший выход продуктов ферментативного гидролиза был получен для субстрата, предобработанного при 80°C в течение 24 ч: концентрация ВС и глюкозы

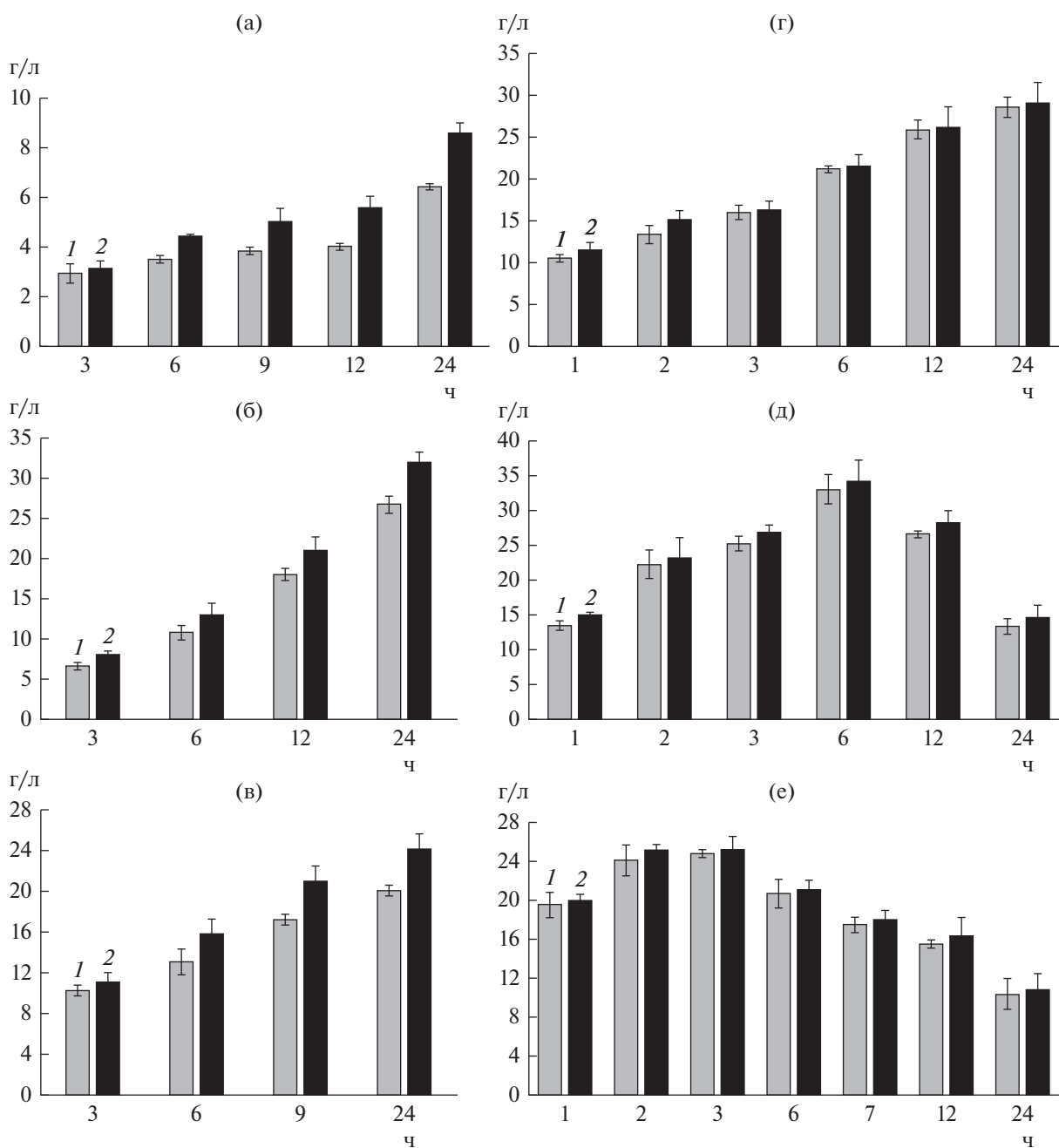
составили 32 и 27 г/л соответственно, ГФГ 80% (рис. 1б). После 24 ч предобработки тростника при 90°C последующий ферментативный гидролиз был менее эффективен, ГФГ 60% (рис. 1в). Однако при небольшом времени (3–6 ч) предобработка при температуре 90°C была эффективнее по сравнению с 80°C. Предобработка тростника смесью ХХл/МК при 60°C была малоэффективной: ГФГ субстрата, предобработанного в течение 24 ч, составила всего 21% (рис. 1а).

Зависимость степени гидролиза полисахаридов тростника от времени его предобработки смесью ХХл/ЩК при 80 и 90°C имела колоколообразную форму с максимумами при 6 ч при 80°C и 2–3 ч при 90°C (рис. 1д и 1е). При этом наибольший выход продуктов ферментативного гидролиза наблюдался для субстрата, предобработанного в течение 6 ч при 80°C: концентрация ВС составила 34 и глюкозы 33 г/л, ГФГ 86% (рис. 1д). При более высокой температуре предобработки (90°C) в течение 2–3 ч из полученного субстрата образовалось 25 г/л ВС и 24 г/л глюкозы, ГФГ составила 63% (рис. 1е). При снижении температуры предобработки тростника до 70°C для получения большего выхода сахаров необходимо было увеличить время обработки до 24 ч; в результате концентрация ВС и глюкозы после ферментативного гидролиза субстрата составила 29 и 28 г/л соответственно, ГФГ – 73%.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования в области синтеза, изучения свойств ГЭР и поиска возможностей их промышленного применения находятся на начальном этапе развития. Привлекательной стороной ГЭР является их принадлежность к “зеленым” растворителям, которые обладают такими преимуществами, как простота синтеза, низкая стоимость (относительно ионных жидкостей), они подвергаются биологическому разложению и нетоксичны [4, 5, 7]. ГЭР могут играть решающую роль в селективной солюбилизации и удалении лигнина из растительной биомассы, сохраняя при этом целлюлозу и гемицеллюлозу интактными и пригодными для их дальнейшей переработки [22].

Считается, что увеличение эффективности ферментативного гидролиза биомассы после ее предварительной обработки ГЭР, в первую очередь, обусловлено делигнификацией и разрушением кристаллической структуры целлюлозы [23]. В работе [24] сравнивались выходы сахаров после ферментативного гидролиза нескольких видов растительного сырья до и после предварительной обработки тремя смесями ХХл/борная кислота, ХХл/глицерин и бетаин/глицерин. Без предобработки эффективность гидролиза уменьшалась в ряду: эвкалиптовая целлюлоза (пульпа) (ГФГ 62%) – МКЦ (49%) – пшеничная солома (18%) – еловые



**Рис. 1.** Концентрация глюкозы (1) и ВС (2) после 48 ч ферментативного гидролиза тростника (40 г/л по сухой массе), предварительно обработанного ХХл/МК при 60 (а), 80 (б) и 90°C (в) или ХХл/ШК при 70 (г), 80 (д) и 90°C (е), после действия ФП В537 (10 мг белка/г субстрата) и F10 (1 мг белка/г субстрата) при 50°C, pH 5.0. На оси абсцисс указано время предобработки.

опилки (8%). Предобработка в ГЭР привела к улучшению выходов ферментативного гидролиза для всех субстратов, при этом тенденция осталась прежней: максимальный выход продуктов гидролиза предобработанной эвкалиптовой целлюлозы (пульпы) составил 100%, 65% – МКЦ, 33% – пшеничной соломы, 20% – еловых опилок. Таким образом, мягкая предварительная обработка ГЭР была эффективна для целлюлозных субстра-

тов (эвкалиптовой целлюлозы, МКЦ), но относительно малоэффективна для пшеничной соломы и еловых опилок.

В данной работе были подобраны условия предобработки тростника ГЭР, в которых ГФГ по выходу ВС увеличивалась от 6% для исходного тростника без предобработки до 80–86% для предобработанного в оптимальных условиях. При

этом основным продуктом гидролиза была глюкоза — она составляла 84 и 97% от всех ВС для смесей ХХл/МК и ХХл/ЩК соответственно, которые использовали в качестве ГЭР.

Большая эффективность кислого ГЭР для предобработки растительной биомассы была отмечена во многих работах [16, 24]. Настоящая работа не является исключением: ГЭР с глицерином или этиленгликолем были менее эффективны, чем ГЭР с органическими кислотами. При этом считается, что чем сильнее кислота, тем больше эффективность ГЭР. Так, при предобработке древесины сосны наибольшие экстракция лигнина и выход продуктов ферментативного гидролиза наблюдались при использовании смеси ХХл с муравьиной кислотой ( $pK_a$  3.75), чем с МК ( $pK_a$  3.86) или с уксусной ( $pK_a$  4.75) при прочих равных условиях [25]. При предобработке пшеничной соломы также предпочтительней была смесь ХХл с ЩК ( $pK_a$  1.2), чем с МК [23]. Предобработка тростника, проведенная в настоящей работе, также подтвердила эту закономерность.

Молярное соотношение донора и акцептора водородной связи также играет важную роль в эффективности предварительной обработки биомассы. Например, при использовании в качестве субстрата смеси целлюлозы и лигнина растворимость последнего улучшалась с увеличением содержания кислоты в смеси ХХл/МК от 1 : 1 до 1 : 9 [26]. Аналогично наблюдалась более высокая солиubilization лигнина из рисовой соломы (от 51 до 60%) при увеличении доли кислоты в соотношении от 1 : 2 до 1 : 5 в смесях ХХл/МК [22]. В другом исследовании увеличение молярного соотношения ХХл/МК с 1 : 2 до 1 : 15 привело к улучшению извлечения лигнина из кукурузных початков с 65 до 93%, но значительного увеличения выхода сахаров при ферментативном гидролизе не произошло (с 79 до 84%), из чего был сделан вывод, что удаление 70% лигнина было достаточным для достижения оптимального выхода продуктов гидролиза [16]. В настоящей работе было показано небольшое увеличение конверсии тростника при увеличении доли кислоты в смеси ХХл/МК (от 1 : 2 до 1 : 5), в то же время увеличение доли кислоты в смеси ХХл/ЩК (от 1 : 1 до 1 : 2), наоборот, приводило к очень существенному уменьшению реакционной способности тростника.

Одним из главных преимуществ использования ГЭР для предобработки растительной биомассы является умеренный нагрев реакционной смеси (до 80–150°C), что минимизировало образование из лигнина токсичных веществ (производных фурфурола, гидроксикислот, алифатических карбоновых кислот) [27]. В таком температурном диапазоне были изучены процессы делигнификации и их влияние на выход ферментативного гидролиза предобработанных в присутствии ГЭР куку-

рузных початков [28]. При использовании смеси ХХл/глицерин с повышением температуры предварительной обработки от 80 до 150°C наблюдалось увеличение ГФГ субстрата от 40 до 92%. При использовании ХХл/мочевина выход продуктов гидролиза также увеличивался, но значительно меньше от 51 до 59% при увеличении температуры предобработки от 80 до 115°C. Однако в диапазоне температур предобработки 80–150°C выход продуктов ферментативного гидролиза кукурузных початков, обработанных в смеси ХХл/имидазол, практически не изменялся и был одинаково высок 92–95%. В аналогичном исследовании [16] сообщалось, что увеличение делигнификации от 18 до 96% наблюдалось при повышении температуры предварительной обработки кукурузных початков смесью ХХл/МК от 70 до 110°C. Однако увеличение выхода продуктов гидролиза (от 45 до 79%) наблюдалось лишь в диапазоне от 70 до 90°C, а затем сохранялось на уровне 78–80%. В настоящей работе изменение температуры и времени предобработки показало, что оптимальной температурой для обработки тростника смесью ХХл/МК является 80°C, причем время предобработки должно быть не менее 24 ч, при этом ГФГ полученного субстрата в растворимые сахара составляло 80%. При использовании смеси ХХл с ЩК (более сильная кислота, чем МК) для получения наибольшего выхода продуктов ферментативного гидролиза надо было либо ограничивать время предварительной обработки при 80°C до 6 ч, либо уменьшать температуру до 70°C, сохраняя время предобработки не менее 24 ч. В первом случае ГФГ полученного субстрата составляла 86%, во втором — 73%.

Таким образом, показана возможность эффективной предобработки тростника с помощью ГЭР на основе ХХл в качестве акцептора водородной связи и МК и ЩК как доноров водородной связи. Оптимизированы условия предобработки тростника: соотношение компонентов ГЭР, температура и время процесса. Это позволило добиться ГФГ предобработанного тростника в результате действия ФП В537 (целлобиогидролаза и эндоглюканаза) и ФП F10 ( $\beta$ -глюкозидаза) 80 и 86% для ГЭР ХХл/МК и ХХл/ЩК соответственно.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гусаков А.В., Синицын А.П. // Химия биомассы: биотоплива и биопластики. М.: Научный мир. 2017. С. 789. ISBN 978-5-91522-451-2.
2. Conde-Mejiaa C., Jimenez-Gutierrez A., El-Halwagi M. // Process Safety and Environmental Protection. 2012. V. 90. P. 189–202. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2011.08.004>
3. Eggeman T., Elander R.T. // Biores. Technol. 2005. V. 96. P. 2019–2025. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.017>

4. *Sattelwal A., Agrawal R., Bhagia S., Das P., Ragauskas A.J.* // *Biofuels Bioprod. Biorefin.* 2017. V. 12. № 1. P. 83–107. <https://doi.org/10.1002/bbb.1818>
5. *Abbott A.P., Boothby D., Capper G., Davies D.L., Rasheed R.K.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. № 29. P. 9142–9147. <https://doi.org/10.1021/ja048266j>
6. *Gorke J.T., Srienc F., Kazlauskas R.J.* // *ACS Symposium Series.* 2010. V. 1038. P. 169–180. <https://doi.org/10.1021/bk-2010-1038.ch014>
7. *Mbous Y.P., Hayyan M., Hayyan A., Wong W.F., Hashim M.A., Looi C.Y.* // *Biotechnol. Adv.* 2017. V. 35. № 2. P. 105–134. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.006>
8. *Abbott A.P., Capper G., Davies D.L., Rasheed R.K., Tambyrajah V.* // *Chem. Commun.* 2003. V. 1. P. 70–71. <https://doi.org/10.1039/B210714G>
9. *Martins M.A.R., Pinho S.P., Coutinho J.A.P.* // *J. Solut. Chem.* 2019. V. 48. P. 962–982. <https://doi.org/10.1007/s10953-018-0793-1>
10. *Smith E.L., Abbott A.P., Ryder K.S.* // *Chemical Reviews.* 2014. V. 114. P. 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>
11. *Oliveira V.K.D., Gregory C., Francois J.* // *Chem-CatChem.* 2015. V. 7. № 8. P. 1250–1260. <https://doi.org/10.1002/cctc.201500134>
12. *Abo-Hamad A., Hayyan M., Alsaadi M.A., Hashim M.A.* // *Chem. Eng. J.* 2015. V. 273. P. 551–567. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.03.091>
13. *Bhagia S., Li H., Gao X., Kumar R., Wyman C.E.* // *Biotechnol. Biofuels.* 2016. V. 9. № 1. P. 245. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0660-5>
14. *Dumitrache A., Tolbert A., Natzke J., Brown S.D., Davison B.H., Ragauskas A.J.* // *Green Chem.* 2017. V. 19. № 9. P. 2275–2285. <https://doi.org/10.1039/c7gc00346c>
15. *Tang X., Zuo M., Li Z., Liu H., Xiong C., Zeng X. et al.* // *ChemSusChem.* 2017. V. 10. № 13. P. 2696–2706. <https://doi.org/10.1002/cssc.201700457>
16. *Zhang C.-W., Xia S.-Q., Ma P.-S.* // *Biores. Technol.* 2016. V. 219. P. 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.026>
17. Количественный химический анализ растительного сырья. / Ред. В.И. Шарков, И.И. Куйбина, Ю.П. Соловьева, Т.А. Павлова. М.: Лесная промышленность, 1976. С. 63–64.
18. *Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravinikov A.G., Osipov D.O., Sinitsyn A.P.* // *Biotechnol. J.* 2010. V. 5. № 8. P. 871–880. <https://doi.org/10.1002/biot.201000050>
19. *Dotsenko G.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Korotkova O.G., Sinitsyn A.P.* // *Process Biochem.* 2015. V. 50. P. 1258–1263. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.008>
20. *Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В.* Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ, Биотехнология. 1990. № 25. С. 148.
21. *Sinitsyn A.P., Osipov D.O., Rozhkova A.M., Bushina E.V., Dotsenko G.S., Sinitsyna O.A. et al.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2014. V. 50. № 8. P. 761.
22. *Kumar A.K., Parikh B.S., Pravakar M.* // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016. V. 23. № 10. P. 9265–9275. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4780-4>
23. *Jablonsky M., Škulcova A., Kamenska L., Vrška M., Štíma J.* // *Biores.* 2015. V. 10. № 4. P. 8039–8047. <https://doi.org/10.15376/biores.10.4.8039-8047>
24. *Wahlstrom R., Hiltunen J., Pitaluga De Souza Nascente Sirkka M., Vuoti S., Krus K.* // *RSC Adv.* 2016. V. 6. № 72. P. 68100–68110. <https://doi.org/10.1039/C6RA11719H>
25. *Lynam J.G., Kumar N., Wong M.J.* // *Biores. Technol.* 2017. V. 238. P. 684–689. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.079>
26. *Francisco M., van den Bruinhorst A., Kroon M.C.* // *Green Chem.* 2012. V. 14. № 8. P. 2153–2157. <https://doi.org/10.1039/C2GC35660K>
27. *Tian D., Chandra R.P., Lee J.-S., Lu C., Saddler J.N.* // *Biotechnol. Biofuels.* 2017. V. 10. № 1. P. 157. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0846-5>
28. *Procentese A., Johnson E., Orr V., Garruto Campanile A., Wood J.A., Marzocchella A., et al.* // *Biores. Technol.* 2015. V. 192. P. 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.053>

## Cane Pretreatment by Deep Eutetic Solvents to Increase its Reactivity During Enzymatic Hydrolysis with Cellulases

M. V. Semenova<sup>a</sup>\*, I. S. Vasil'eva<sup>a</sup>, A. I. Yaropolov<sup>a</sup>, and A. P. Sinitsyn<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: margs@mail.ru

Cane was pretreated with a number of deep eutectic solvents (DES) based on choline chloride (ChCl) as a hydrogen bond acceptor; among hydrogen bond donors, lactic and oxalic acids (LacA and OxA, respectively) were the most effective. Substrate pretreatment conditions (ratio of DES-components, temperature and exposure time) were optimized, leading to the highest yield of reducing sugars (RS) and glucose during subsequent enzymatic hydrolysis with cellulase preparation based on *Penicillium verrucosum*. It was established that in the case of a mixture of ChCl with LacA (the molar ratio of components is 1 : 5) pretreatment should be carried out at 80°C for 24 h, and in the case of a mixture of ChCl with OxA (1 : 1) – at 80°C for 6 hours. The degree of conversion of the pretreated substrate after 48 hours of hydrolysis in the presence of the enzyme preparation (EP) B537 was 80 and 86% by absolutely dry substances for selected mixtures of ChCl/LacA and ChCl/OxA, respectively.

**Keywords:** cane, “green” chemistry, deep eutectic solvents, saccharification, cellulases, *Penicillium verrucosum*

УДК 579.222:579.64:579.262:577.171.4:58.071

## ВЗАИМОСВЯЗЬ СОСТАВА КОРНЕВЫХ ЭКССУДАТОВ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ С МИКРООРГАНИЗМАМИ

© 2023 г. А. И. Шапошников<sup>1</sup>, А. А. Белимов<sup>1</sup> \*, Т. С. Азарова<sup>1</sup>, О. К. Струнникова<sup>1</sup>,  
Н. А. Вишневецкая<sup>1</sup>, Н. И. Воробьев<sup>1</sup>, О. С. Юзихин<sup>1</sup>, Л. А. Беспалова<sup>2</sup>, И. А. Тихонович<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт

сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, 196608 Россия

<sup>2</sup>Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко, Центральная Усадьба КНИИСХ,  
Краснодар, Краснодарский край, 350012 Россия

\*e-mail: belimov@rambler.ru

Поступила в редакцию 15.12.2022 г.

После доработки 09.01.2023 г.

Принята к публикации 10.01.2023 г.

Корни растений выделяют в ризосферу различные органические вещества, которые являются источником питания для микроорганизмов и во многом определяют характер растительно-микробных взаимодействий. У десяти современных сортов пшеницы был определен состав основных фракций корневых экссудатов: аминокислоты, органические кислоты и сахара. Выявлены достоверные качественные и количественные различия между сортами по отдельным компонентам экссудатов, которые обуславливали особенности кластеризации сортов по данному признаку. Обнаружены взаимосвязи между экссудацией и эффективностью взаимодействия растений с ростостимулирующей ризобактерией *Pseudomonas fluorescens* SPB2137 и фитопатогенным грибом *Fusarium culmorum* 30 в лабораторных системах, а также с устойчивостью сортов к заболеваниям в полевых условиях. Численность *P. fluorescens* SPB2137 в корневой зоне положительно коррелировала с количеством многих, выделяемых корнями аминокислот, а также мальтозы. Стимулирующий эффект ризобактерий на рост корней положительно коррелировал с количеством выделяемой глюкозы и мелибиозы. Взаимосвязи между характером корневой экссудации и колонизацией корней или поражаемостью сортов *F. culmorum* 30 не обнаружено. Проведён анализ корреляций между заболеваемостью сортов пшеницы в полевых условиях и интенсивностью экссудации определённых веществ, а также с индексом биокомпозиции экссудации аминокислот. Обсуждается роль компонентов корневых экссудатов в формировании эффективных растительно-микробных систем.

**Ключевые слова:** *Fusarium*, корневые экссудаты, микробно-растительные взаимодействия, *Pseudomonas*, пшеница, ризосфера, симбиоз, *Triticum*, экзометаболиты

DOI: 10.31857/S0555109923030170, EDN: BIFUXA

Пшеница является самой распространенной злаковой культурой в мире [1, 2]. В результате зеленой революции 1940–1970 гг. были созданы высокоурожайные сорта, способствующие решению проблемы нехватки продовольственных ресурсов [3, 4]. В России в настоящее время созданы и возделываются сотни сортов пшеницы, включая интенсивные техногенные сорта с высоким потенциалом продуктивности [5]. Высокая вариабельность почвенно-климатических условий Российских регионов выращивания пшеницы обуславливает необходимость селекции сортов с широким спектром биологического разнообразия и адаптационным потенциалом [5].

На протяжении десятилетий технологии возделывания пшеницы были ориентированы на ин-

тенсивное применение химических удобрений, пестицидов и средств защиты растений, что создало угрозу для экологического состояния почв и окружающей среды [6]. Современная стратегия устойчивого земледелия направлена на создание биологических средств повышения урожайности и здоровья растений, в том числе основанных на биопрепаратах ростостимулирующих ризобактерий [7–10]. Ризобактерии способны повышать доступность элементов минерального питания, фиксировать атмосферный азот, подавлять развитие фитопатогенов, продуцировать фитогормоны и повышать устойчивость растений к абиотическим стрессам [11–14]. Однако в естественных условиях использование биологических препаратов не всегда дает ожидаемый эффект. Для получения ста-

бильного результата необходимо знать механизмы взаимоотношений между интродуцируемыми ризобактериями и растениями в зависимости от генотипов партнеров и условий окружающей среды [10, 15, 16]. Показано, что колонизация корней ростостимулирующими ризобактериями является одним из ключевых факторов их эффективности [17, 18], а интенсивность колонизации и метаболическая активность ризобактерий зависят от состава экзометаболитов, выделяемых корнями растений в ризосферу [19–23].

Корневые экзометаболиты (экссудаты) содержат аминокислоты, сахара, органические кислоты и другие метаболиты и являются основным легкодоступным источником органического вещества в ризосфере, необходимого для развития микроорганизмов [24, 25]. Корневые экссудаты действуют как хемоаттрактанты, привлекающие к корням почвенные бактерии и грибы [18, 25–28], в том числе фитопатогенные [29]. Корневая экссудация является определяющим фактором в формировании структуры микробных сообществ ризосферы различных видов растений [24, 30–35], в том числе пшеницы [36, 37]. Выделяемые корнями пшеницы аминокислоты легко усваивались почвенными микроорганизмами и способствовали колонизации ризосферы [38]. Экссудация органических кислот корнями пшеницы привлекала в ризосферу ростостимулирующие бактерии [39]. Вторичные экзометаболиты корней бензоксаиноиды, обладающие защитными функциями, модифицировали грибное и бактериальное сообщество в ризосфере пшеницы [40]. С другой стороны, микроорганизмы влияют на интенсивность экссудации корнями органических соединений [23, 24, 41]. Так, для пшеницы описано повышение экссудации аминокислот [42] и органических кислот [43] под действием ризобактерий. Интродукция консорциума ризобактерий в ризосферу стимулировала экссудацию у трех современных сортов пшеницы, которые различались по интенсивности выделения аминокислот, органических кислот и сахаров [44]. Такая реакция растений может способствовать размножению полезных микроорганизмов и вытеснению фитопатогенов из корневой зоны.

Таким образом, накопленная информация свидетельствует о важной роли корневой экссудации в формировании микробных сообществ в ризосфере [45–47]. Однако обусловленные корневыми экссудатами механизмы функционирования и реализации ростостимулирующих функций полезных микроорганизмов, а также роль экссудатов в устойчивости растений к фитопатогенам, остаются мало изученными.

Цель работы – оценка взаимосвязей между особенностями корневой экссудации пшеницы разных сортов и эффективностью взаимодействия

растений с микроорганизмами, а также идентифицировать компоненты корневых экссудатов, которые играют важную роль в формировании эффективных и устойчивых растительно-микробных систем. Для этого в работе были использованы десять современных сортов пшеницы и контрастные по воздействию на растения микроорганизмы, а именно ростостимулирующая ризобактерия и фитопатогенный грибок.

## МЕТОДИКА

**Объекты исследования.** Растительный материал представлен следующими современными высокопродуктивными сортами мягкой (*Triticum aestivum* L.) и твердой (*Triticum durum* Desf.) пшеницы селекции Национального центра зерна им. П.П. Лукьяненко: Безостая-1, Веда, ГРОМ, Курьер, Ласка, Лебедь, Лига-1, Лилек, Таня и Фортуна. Краткая характеристика сортов представлена в табл. 1. В работе использованы штаммы ростостимулирующих бактерий *Pseudomonas fluorescens* SPB2137, обладающий антифунгальной активностью, продуцирующий ауксины и активно колонизирующий корни пшеницы [48] и штамм фитопатогенного гриба *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc. № 30, вызывающий корневые гнили и фузариоз колоса зерновых культур [49]. Микроорганизмы получены из Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства (ВКСМ) (Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, Россия).

**Получение корневых экссудатов.** Семена поверхностно стерилизовали 6 мин в 0.1%-ном  $\text{HgCl}_2$ , многократно промывали стерильной водой и проращивали 2 сут в чашках Петри в темноте при 24°C. Равномерно проросшие семена высаживали по 10 штук в стерильные стеклянные сосуды с 100 мл деионизированной воды на сетки из нержавеющей стали так, чтобы воды касались только корни проростков. Проростки культивировали в климатической камере ADAPTIS-A1000 (“Convigon”, Великобритания) при освещении 200 мклк  $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ , 16-часовом фотопериоде с минимальной/максимальной температурами 18/22°C. Для контроля стерильности на 3 сут из каждого сосуда отбирали по 0.1 мл раствора и высевали на чашки Петри с агаризованной средой Vasto *Pseudomonas* F (BPF, “Difco”, Нидерланды). Через 5 сут растения вынимали из сосудов, высушивали и определяли сухую массу побегов и корней. Растворы, содержащие корневые экссудаты, фильтровали под вакуумом через нейлоновые фильтры с порами 0.45 мкм (“Corning”, США) и упаривали под вакуумом до объема 5 мл на ротационном испарителе BUCHI R-200 (“BUCHI Labortechnik AG”, Швейцария). Из полученных концентратов кор-

Таблица 1. Характеристика использованных в работе сортов пшеницы

Характеристика	Сорт									
	Безостая-1	Веда	ГРОМ	Курьер	Ласка	Лебедь	Лига 1	Лилек	Таня	Фортуна
Вид	<i>T.a.</i>	<i>T.a.</i>	<i>T.a.</i>	<i>T.a.</i>	<i>T.d.</i>	<i>T.a.</i>	<i>T.a.</i>	<i>T.d.</i>	<i>T.a.</i>	<i>T.a.</i>
Год допуска к использованию	1959	2005	2010	2012	2011	2009	2009	2009	2005	2006
Тип развития	ОЗ	ОЗ	ОЗ	ЯР	ОЗ	ОЗ	ОЗ	ЯР	ОЗ	ОЗ
Группа качества	СИ	СИ	ЦЕ	ЦЕ	1	ЦЕ	СИ	1	ФИ	ФИ
Группа спелости	СР	СР	СР	СР	СР	СР	СР	РА	РА	ПО
Высота, см	115	90	85	100	87	105	88	105	85	90
Потенциальная урожайность, т/га	7	10	12	6	8	9,5	10	5	12,5	12
Поражаемость грибными болезнями в полевых условиях, %										
Бурая ржавчина	65	12	70	12	27	12	4	5	27	15
Желтая ржавчина	38	17	13	17	4	4	17	7	2	3
Стеблевая ржавчина	58	0	65	7	57	8	5	0	28	23
Мучнистая роса	40	10	17	7	5	17	3	7	5	23
Септориоз	47	20	77	3	5	37	43	0	30	43
Фузариоз	7	6	7	4	8	5	7	3	4	6
Твёрдая головня	68	66	77	61	2	60	59	13	37	45
Средние значения	46	19	47	16	15	20	20	5	19	23

Примечание: *T.a.* – *Triticum aestivum* L., *T.d.* – *Triticum durum* Desf., ОЗ – озимый, ЯР – яровой, СИ – сильный, ЦЕ – ценный, ФИ – филлер, СР – среднеспелый, РА – ранний, ПО – поздний.

невых экссудатов отбирали аликвоты 100 мкл для анализа аминокислот. Остальной раствор пропускали через колонку с ионообменной смолой Dowex® 50WX8 hydrogen form 100–200 mesh (“Sigma-Aldrich”, США) для получения образцов органических кислот и сахаров путем выпаривания досуха под вакуумом с последующим растворением остатка в 1 мл деионизированной воды.

#### Хроматографический анализ корневых экссудатов.

Перед хроматографическим анализом образцы фильтровали центрифугированием в микропробирках с мембранными нейлоновыми фильтрами с порами 0.2 мкм Costar® Spin-X® (“Corning”, Германия). Для определения состава корневых экссудатов использовали систему ультра-производительной жидкостной хроматографии (UPLC) Waters Acquity UPLC H-class (“Waters”, США). Органические кислоты разделяли на колонке Supelcogel™ C-610H (5 мкм, 30 см, 7.8 мм, “Sigma-Aldrich”) с обнаружением на УФ-детекторе при длине волны 220 нм. В качестве подвижной фазы использовали 0.1%-ную H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> при скорости потока 0.7 мл/мин при температуре колонки 24°C. Определение сахаров проводили методом рефрактометрии с использованием детектора Waters 2414 и аминоколонки Supelcosil™ LC-NH<sub>2</sub>, (5 мкм, 25 см, 4.6 мм, “Sigma-Aldrich”). В качестве по-

движной фазы использовали 75%-ный ацетонитрил, скорость потока 1 мл/мин при температуре колонки 31°C. Для определения состава аминокислот (за исключением L-триптофана) использовали высокочувствительный метод AccQ-Tag (“Waters”, США) согласно стандартному протоколу производителя. Анализ L-триптофана проводили с использованием колонки Waters UPLC RP-18 Shield (1.7 мкм, 5 см, 2.1 мм, “Waters”) с обнаружением на флуоресцентном детекторе ( $E_{ex} = 280$  нм,  $E_{em} = 350$  нм). В качестве подвижной фазы использовали смесь деионизированной воды (качества Milli-Q) и ацетонитрила (LiChrosolv, марка HPLC). Для создания оптимальных условий хроматографического анализа в воду и ацетонитрил добавляли муравьиную кислоту до концентрации 0.1%. Хроматографическое разделение осуществляли в линейном градиенте от 99 до 80% воды в течение 5 мин с последующей промывкой колонки 80%-ным ацетонитрилом в течение 3 мин и уравниванием колонки при содержании воды 99% в течение 3.5 мин. Скорость потока составляла 0.3 мл/мин при температуре колонки 30°C.

**Взаимодействие растений с *Pseudomonas fluorescens*.** Для оценки колонизации корней ризобактериями *P. fluorescens* SPB2137 семена поверхностно стерилизовали, проростки выращивали в

стерильных стеклянных сосудах как описано выше. При посадке семян в раствор вносили ризобактерии в количестве  $10^5$  кл./мл. По окончании эксперимента измеряли массу корней и надземной части растений, а также готовили 10-кратные разведения питательного раствора в стерильной водопроводной воде. Корни гомогенизировали в стерильной ступке, суспендировали в стерильной водопроводной воде и таким же образом готовили 10-кратные разведения. Аликвоты разведений высевали на агаризованную среду состава (г/л): пептон – 10; гидролизат казеина – 10;  $K_2HPO_4$  – 1;  $MgSO_4$  – 1; pH 7.0. После инкубирования в течение 5 сут при 28°C подсчитывали колониеобразующие единицы (КОЕ).

#### Взаимодействие растений с *Fusarium culmorum*.

Для приготовления инокулюма штамм *F. culmorum* № 30 выращивали на агаризованной среде Чапека в течение 14 сут при 24°C. Макроконидии смывали стерильной водой, осаждали центрифугированием (1000 г, 10 мин) и суспендировали в стерильной воде. Семена пшеницы поверхностно стерилизовали в течение 30 с в 96%-ном этаноле и 30 мин в 0.1%-ном растворе  $AgNO_3$ . Затем семена многократно промывали стерильной водой и проращивали в течение 2 сут на влажной фильтровальной бумаге в стерильных чашках Петри. Проклюнувшиеся семена пшеницы высаживали в пластиковые сосуды (10 семян в сосуд), содержащие 200 г стерильного вермикулита, увлажненного 500 мл питательного раствора (г/л):  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  – 1.2;  $KNO_3$  – 0.5;  $KH_2PO_4$  – 0.14;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.5. В опытных сосудах в питательный раствор добавляли суспензию макроконидий гриба *F. culmorum* 30 в количестве  $2 \times 10^5$  макроконидий/мл. Для каждого варианта опыта подготавливали по 6 сосудов.

Растения выращивали 14 сут в фитотроне ADAPTIS-A1000 (“Convigon”, Великобритания) с относительной влажностью 60% при 2-уровневом режиме освещенности и температуры: ночь – темнота, 18°C, 8 ч, день – 400 мклк  $m^{-2} s^{-1}$ , 23°C, 16 ч. Влажность вермикулита поддерживали на уровне 60% полной влагоёмкости регулярным поливом и взвешиванием сосудов. На 14 сут культивирования растения вынимали из вермикулита и интенсивность колонизации корней грибом *F. culmorum* оценивали методом иммунофлуоресценции как описано ранее [49]. Для этого сухие корни мацерировали в воде, окрашивали нейтральным красным для гашения неспецифического свечения тканей корня и проводили иммунофлуоресцентное окрашивание. Образованные образцы корней просматривали под люминесцентным микроскопом Axiolab (“Carl Zeiss”, Германия). Количество *F. culmorum* на корнях учитывали по частоте встречаемости колоний гриба в поле зрения микроскопа. Интенсивность фузариозной корневой

гнили оценивали в баллах. Максимальный балл поражения – 4 (погибшие растения). Баллы 1–3 – разная степень побурения корней.

**Математическая обработка данных.** Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica версии 10 (TIBCO Software Inc., США). Для оценки различий между средними значениями использовали однофакторный дисперсионный анализ и критерий НСР Фишера.

Для построения тепловой карты (HeatMap) использованы данные о количестве корневых экссудатов пшеницы с помощью среды разработки программного обеспечения RStudio (<https://www.rstudio.com/>). Для этого данные были нормализованы с использованием функции scale (<https://www.rdocumentation.org/packages/base/versions/3.6.2/topics/scale>) входящей в стандартный пакет RStudio. Для изображения тепловой карты использовали библиотеку pheatmap v1.0.12.2 (<https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/index.html>).

В работе использованы материалы работ по оценке поражаемости изучаемых сортов пшеницы грибными болезнями на искусственном инфекционном фоне в полевых условиях Краснодарского края в среднем за 2017–2021 годы (не опубликованные данные Национального центра зерна им. П.П. Лукьяненко). Оценка поражаемости растений болезнями проводилась по стандартным методикам [50].

Для изучения связи профилей экссудации аминокислот с поражаемостью растений фитопатогенами были вычислены индексы биоразнообразия Шеннона (*IndShen*) и индексы доминирования Симпсона (*IndSimp*) [51], а также индексы биокомпозиции (индексы фрактальности, *IndBcom*) [52]. Значения *IndBcom* вычислялись с помощью фрактальной нейронной сети (ФНС), специально созданной под решаемую задачу [53]. Было проведено глубокое обучение ФНС [54] и определены *IndSimp*, *IndShen*, *IndBcom* по эмпирическим данным экссудации аминокислот растениями пшеницы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Сортовые особенности корневой экссудации.** Сорты существенно различались по общему количеству выделяемых корнями аминокислот и имели выраженные различия в количестве многих индивидуальных компонентов этой фракции экссудатов (табл. 2). Максимальное количество выделяемых корнями аминокислот обнаружено у сортов Безостая-1, Ласка и Лилёк, а минимальное количество у сортов Веда, Курьер и Лига-1. Как правило, экссудация всех аминокислот у этих сортов была повышена или понижена соответ-



**Таблица 2.** Количество выделенных корнями аминокислот различными сортами пшеницы

Сорт	Компоненты эксудатов, мкМоль/г сухих корней						
	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	His	Ile
Безостая-1	141 ± 12cd	178 ± 69abc	391 ± 105bc	246 ± 43bcd	169 ± 6ef	75 ± 30bc	325 ± 53de
Веда	103 ± 9bc	70 ± 27ab	130 ± 35a	115 ± 20ab	54 ± 2b	31 ± 12abc	100 ± 16ab
Гром	66 ± 25abc	100 ± 39abc	344 ± 92abc	277 ± 49cd	153 ± 6e	40 ± 16abc	310 ± 50cde
Курьер	16 ± 1a	19 ± 7a	95 ± 25a	380 ± 67de	25 ± 1a	10 ± 4a	33 ± 5a
Ласка	201 ± 77de	249 ± 97c	441 ± 118c	439 ± 78e	165 ± 6ef	79 ± 31c	284 ± 46cde
Лебедь	45 ± 4ab	115 ± 45abc	210 ± 56ab	123 ± 22ab	119 ± 5d	44 ± 17abc	191 ± 31bc
Лига-1	11 ± 5a	48 ± 19ab	161 ± 43ab	99 ± 17a	81 ± 3c	14 ± 5a	64 ± 10a
Лилёк	275 ± 24e	200 ± 78bc	487 ± 130c	427 ± 75e	126 ± 5d	23 ± 9ab	387 ± 63e
Таня	46 ± 18ab	97 ± 38abc	192 ± 51ab	173 ± 31abc	17 ± 1a	24 ± 10ab	111 ± 18ab
Фортуна	37 ± 14ab	82 ± 32ab	223 ± 60abc	297 ± 52cde	75 ± 3c	31 ± 12abc	262 ± 43cd

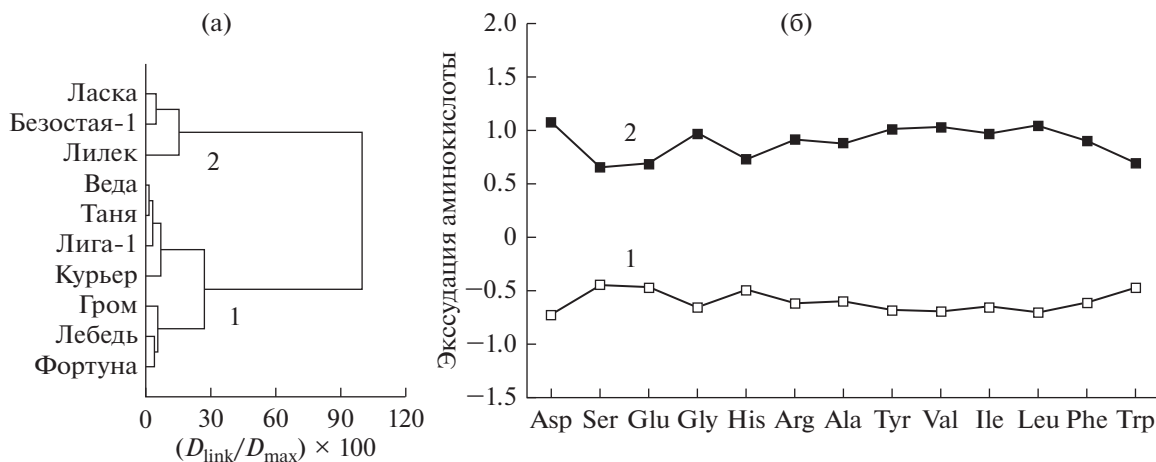
Сорт	Компоненты эксудатов, мкМоль/г сухих корней						
	Leu	Phe	Ser	Trp	Tyr	Val	Сумма
Безостая-1	498 ± 98ef	526 ± 194bc	362 ± 234ab	320 ± 86bc	283 ± 143ab	475 ± 104cd	3988 ± 484e
Веда	146 ± 29abc	119 ± 44a	490 ± 329ab	50 ± 17a	54 ± 27ab	150 ± 33ab	1611 ± 163abc
Гром	449 ± 89def	297 ± 110abc	732 ± 492ab	101 ± 36a	192 ± 97ab	435 ± 96cd	3495 ± 70e
Курьер	47 ± 9a	34 ± 12a	180 ± 121a	72 ± 25a	40 ± 20a	57 ± 12a	1006 ± 21a
Ласка	478 ± 94def	639 ± 236c	1084 ± 729ab	374 ± 125c	351 ± 177b	517 ± 113cd	5299 ± 11f
Лебедь	270 ± 53bcd	367 ± 136abc	232 ± 156a	213 ± 67abc	162 ± 82ab	292 ± 64abc	2383 ± 312cd
Лига-1	95 ± 19ab	124 ± 46a	215 ± 145a	137 ± 46ab	26 ± 13a	97 ± 21ab	1172 ± 16ab
Лилёк	538 ± 106f	377 ± 140abc	2240 ± 1505b	321 ± 107bc	250 ± 126ab	573 ± 126d	6224 ± 783f
Таня	157 ± 31abc	176 ± 65ab	645 ± 433ab	106 ± 38ab	114 ± 57ab	163 ± 36ab	2022 ± 196bcd
Фортуна	319 ± 63cde	188 ± 69ab	818 ± 550ab	271 ± 89abc	96 ± 48ab	318 ± 70bc	3017 ± 126de

Примечание: Указаны средние значения ± стандартные ошибки. Латинскими буквами обозначены достоверные различия между сортами для каждого компонента (критерий НСР Фишера,  $P < 0.05$ ,  $n = 2$ ).

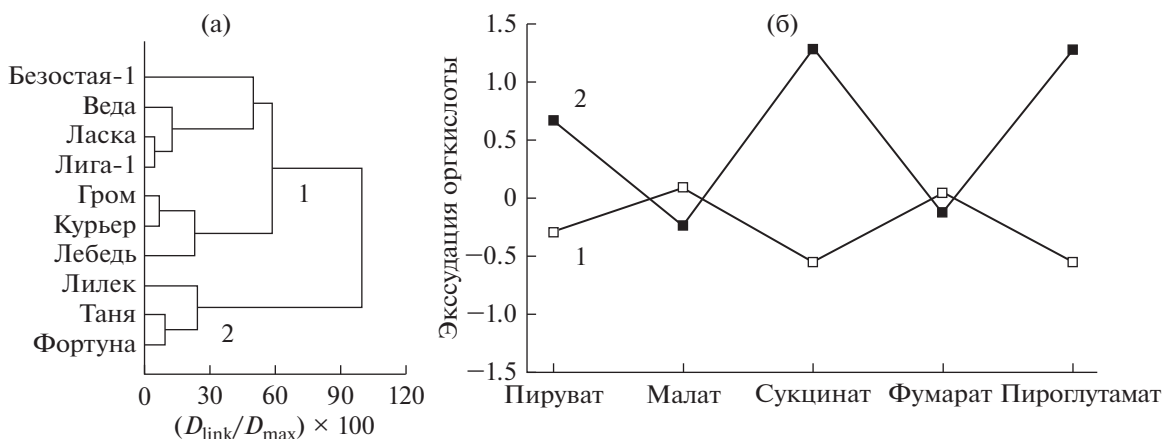
ственно. Исключение составил Курьер, который имел высокую эксудацию глутаминовой кислоты на фоне низких значений для других аминокислот. Сорта с высокой эксудацией аминокислот (Безостая-1, Ласка и Лилёк) образовывали обособленный кластер по данному параметру, в то время как сорта с низкой эксудацией группировались вместе с сортами, имеющими средний уровень эксудации аминокислот (рис. 1а). Данные кластеры различались по стандартизированным величинам количества многих аминокислот, за исключением треанина (рис. 1б). Средние абсолютные значения количества аминокислот для данных кластеров, по которым достоверно различались кластеры, указаны в табл. 3. Сумма выделяемых корнями аминокислот сортов кластера № 1 была в 2.5 раза меньше, чем у кластера № 2 (табл. 3).

По суммарному количеству выделяемых корнями органических кислот достоверных различий между сортами не обнаружено (табл. 4), но сорта различались количественно и по составу от-

дельных компонентов. Например, пируват выделялся корнями сортов Безостая-1 и Веда в следовых количествах, а максимальные величины были у сортов Лебедь, Лилёк и Фортуна. Пироглутамат обнаружен только в эксудатах сортов Безостая-1, Лилёк, Таня и Фортуна (табл. 4). Малат являлся доминирующим компонентом, и влияние сорта на его эксудацию не было существенным, за исключением различий между сортами Безостая-1 и Лилёк. При кластеризации сортов по характеру эксудации органических кислот образовывались два кластера (рис. 2а). Кластер №1 характеризовался низкими стандартизированными величинами количества всех органических кислот, а кластер № 2 объединил сорта Фортуна, Таня и Лилёк с высокой эксудацией пирувата, сукцината и пироглутамата (рис. 2б). Достоверные различия средних абсолютных значений количества органических кислот для данных кластеров выявлены только для сукцината и пироглутамата (табл. 3).



**Рис. 1.** Кластеризация (кластеры 1 и 2) сортов пшеницы по количеству аминокислот в экссудатах (а) и средние значения по двум основным кластерам по каждой аминокислоте (б). Для кластеризации использованы стандартизированные безразмерные величины компонентов экссудатов, метод Варда и квадраты Эвклидовых расстояний.  $(D_{link}/D_{max}) \times 100$  – расстояния на шкале выражены в диапазоне от 0 до 100%.



**Рис. 2.** Кластеризация (кластеры 1 и 2) сортов пшеницы по количеству органических кислот (оргкислот) в экссудатах (а) и средние значения двух основных кластеров по каждой оргкислоте (б): I – пируват, II – малат, III – сукцинат и т.д. Для кластеризации использованы безразмерные стандартизированные величины компонентов экссудатов, метод Варда и квадраты Эвклидовых расстояний.  $(D_{link}/D_{max}) \times 100$  – расстояния на шкале выражены в диапазоне от 0 до 100%.

Высокой экссудацией всех обнаруженных сахаров обладали сорта Курьер, Ласка, Лебедь и Фортуна, которые достоверно отличались от остальных сортов по суммарному количеству компонентов этой фракции (табл. 5). Это обусловило группировку сортов в два гомогенных кластера (рис. 3а) с низкими (кластер № 1) и высокими (кластер № 2) стандартизированными величинами количества всех сахаров (рис. 3б). Полученные кластеры достоверно различались по средним абсолютным значениям количества сахаров (табл. 3).

Характеристика сортов суммарно по всем изученным фракциям экссудатов наглядно представлена на рис. 4. Сорта Безостая-1, Гром, Ласка и Лилек образовали кластер А, характеризующийся вы-

сокой экссудацией многих аминокислот, входящих в кластер В. Однако эта группа сортов была гетерогенна по экссудации органических кислот и сахаров, распределяясь в кластеры Д и Е. Основной причиной такой гетерогенности были сорта Лилек, корни которого выделяли много глутаминовой кислоты, аланина, серина, пирувата, сукцината и пироглутамата (кластер Е), и Ласка с относительно высокой экссудацией сахаров (кластер Д). Сорта Веда, Курьер, Лебедь, Лига-1, Таня и Фортуна образовали кластер Б, который объединил их в основном благодаря низкой экссудации аминокислот, включая глутаминовую кислоту, аланин и серин (рис. 4). По экссудации аминокислот наиболее контрастными сортами

**Таблица 3.** Абсолютные средние значения по отдельным компонентам корневых экссудатов для групп генотипов пшеницы, входящих в разные кластеры

Аминокислоты (мкМоль/г сухих корней)	Кластер 1 (Веда, Гром, Курьер, Лебедь, Лига-1, Тая, Фортуна)	Кластер 2 (Безостая-1, Ласка, Лилёк)
Аспарагиновая к-та	194 ± 26	440 ± 56***
Серин	473 ± 121	1229 ± 557
Глутаминовая к-та	209 ± 30	371 ± 50*
Глицин	75 ± 13	153 ± 9***
Гистидин	27 ± 5	59 ± 16*
Аргинин	76 ± 12	209 ± 39***
Аланин	46 ± 11	205 ± 47***
Тирозин	98 ± 23	295 ± 70**
Валин	216 ± 38	522 ± 54***
Изолейцин	153 ± 28	332 ± 31**
Лейцин	212 ± 39	505 ± 46***
Фенилаланин	117 ± 27	514 ± 99**
Триптофан	136 ± 31	338 ± 84*
Сумма	2179 ± 250	5268 ± 450***
Органические кислоты (мкМоль/г сухих корней)	Кластер 1 (Безостая-1, Веда, Гром, Курьер, Ласка, Лебедь, Лига-1)	Кластер 2 (Лилёк, Тая, Фортуна)
Пируват	80 ± 24	155 ± 34
Малат	1688 ± 367	1465 ± 520
Сукцинат	100 ± 45	656 ± 99***
Фумарат	52 ± 7	51 ± 3
Пироглутамат	2 ± 2	33 ± 10***
Сумма	1922 ± 373	2360 ± 544
Сахара (ммоль/г сухих корней)	Кластер 1 (Курьер, Ласка, Лебедь, Фортуна)	Кластер 2 (Безостая-1, Веда, Гром, Лига-1, Лилёк, Тая)
Ксилоза	0.03 ± 0.02	0.39 ± 0.06***
Фруктоза	8 ± 1	16 ± 1***
Глюкоза	16 ± 2	69 ± 10***
Мальтоза	4.5 ± 0.6	9,4 ± 1.2***
Мелибиоза	2.7 ± 0.3	7,0 ± 1.1***
Сумма	32 ± 2	102 ± 11***

Примечание: кластеры указаны на рис. 1, 2 и 3. Названия входящих в кластеры сортов указаны для каждой фракции экссудатов. Указаны средние значения ± стандартные ошибки. Звёздочками указаны достоверные различия между кластерами по каждому компоненту экссудатов (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; критерий  $t$ -Стьюдента).

были Лилёк и Ласка (высокая экссудация), Курьер и Лига-1 (низкая экссудация), что соответствовало данным табл. 2. Сорта с высокой экссудацией сахаров (Курьер, Лебедь и Фортуна), выделявшие много сахаров, группировались в зоне кластеров Б и Д, но сорт Ласка не попадал в эту группу из-за высокой экссудации аминокислот.

**Корневая экссудация и взаимодействие растений с микроорганизмами.** Штамм *P. fluorescens* SPB2137 наиболее активно колонизировал корни пшеницы сортов Ласка и Лилёк, а его максимальная численность в питательном растворе была при культивировании сортов Безостая-1, Ласка и Фортуна (табл. 6). Корневые экссудаты сорта

**Таблица 4.** Состав и количество органических кислот, выделяемых корнями пшеницы

Сорт	Компоненты экссудатов (мкМоль/г сухих корней)					
	малат	пироглутамат	пируват	сукцинат	фумарат	сумма
Безостая-1	3215 ± 1246b	17 ± 10a	2 ± 1a	Н.о.	43 ± 1b	3277 ± 1237a
Веда	1370 ± 472ab	Н.о.	2 ± 1a	Н.о.	95 ± 4f	1467 ± 477a
Гром	1161 ± 439ab	Н.о.	69 ± 28b	Н.о.	38 ± 1b	1268 ± 468a
Курьер	1268 ± 407ab	Н.о.	60 ± 25b	388 ± 65ab	20 ± 1a	1736 ± 497a
Ласка	1482 ± 543ab	Н.о.	114 ± 47bc	Н.о.	69 ± 2e	1665 ± 592a
Лебедь	1496 ± 552ab	Н.о.	236 ± 97c	Н.о.	27 ± 1a	1758 ± 650a
Лига-1	1824 ± 661ab	Н.о.	76 ± 31b	314 ± 52a	72 ± 2e	2285 ± 747a
Лилёк	780 ± 296a	41 ± 25b	207 ± 85c	924 ± 154c	59 ± 2d	2010 ± 512a
Таня	1402 ± 512ab	19 ± 11a	120 ± 49bc	519 ± 87b	43 ± 1b	2073 ± 638a
Фортуна	2214 ± 1109ab	38 ± 23b	138 ± 57bc	526 ± 88b	52 ± 2c	2967 ± 1231a

Примечание. Н.о. – не обнаружено. Указаны средние значения ± стандартные ошибки. Латинскими буквами обозначены достоверные различия между сортами для каждого компонента (критерий НСР Фишера,  $P < 0.05$ ,  $n = 2$ ).

**Таблица 5.** Состав и количество сахаров, выделяемых корнями пшеницы

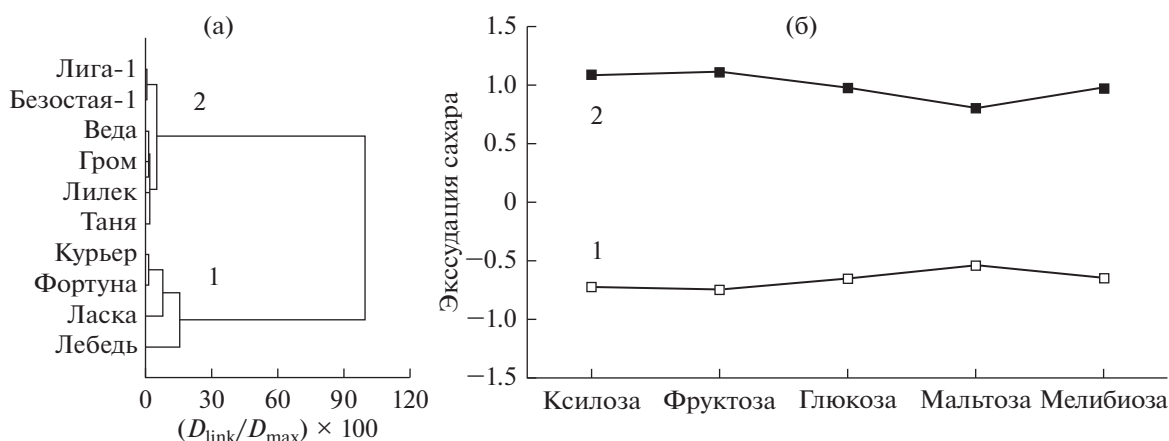
Сорт	Компоненты экссудатов (мМоль/г сухих корней)					
	глюкоза	ксилоза	мальтоза	мелибиоза	фруктоза	сумма
Безостая-1	12.9 ± 0.4ab	Н.о.	7.4 ± 0.7c	2.4 ± 0.7ab	9.3 ± 1.7a	32.0 ± 2.1ab
Веда	11.5 ± 0.4a	Н.о.	1.9 ± 0.2a	1.3 ± 0.4a	9.5 ± 1.7a	24.1 ± 1.9a
Гром	17.8 ± 0.6b	Н.о.	4.3 ± 0.4b	2.6 ± 0.7ab	7.1 ± 1.3a	31.8 ± 1.6a
Курьер	42.2 ± 1.4d	0.47 ± 0.18b	7.2 ± 0.7c	5.5 ± 1.7ab	17.8 ± 3.3b	72.7 ± 3.7d
Ласка	67.3 ± 2.3f	0.29 ± 0.11ab	12.7 ± 1.2d	5.1 ± 1.4ab	17.9 ± 3.3b	103.1 ± 5.4f
Лебедь	109.9 ± 3.7g	0.39 ± 0.15b	12.0 ± 1.1d	10.2 ± 3.1c	14.2 ± 2.6ab	146.4 ± 4.3g
Лига-1	25.7 ± 0.9c	Н.о.	6.9 ± 0.7c	3.5 ± 0.9a	8.5 ± 1.6a	44.5 ± 2.2c
Лилёк	10.6 ± 0.4a	Н.о.	3.6 ± 0.3ab	3.2 ± 1.0ab	7.5 ± 1.4a	24.9 ± 1.1a
Таня	20.4 ± 0.7b	0.17 ± 0.07a	2.7 ± 0.3ab	3.4 ± 0.9ab	8.9 ± 1.6a	35.3 ± 1.7bc
Фортуна	55.6 ± 1.9e	0.42 ± 0.16b	5.6 ± 0.5c	7.1 ± 1.9bc	16.1 ± 3.0b	84.4 ± 3.5e

Примечание. Н.о. – не обнаружено. Указаны средние значения ± стандартные ошибки. Латинскими буквами обозначены достоверные различия между сортами для каждого компонента (критерий НСР Фишера,  $P < 0.05$ ,  $n = 2$ ).

Ласка были наиболее благоприятны для размножения *P. fluorescens* SPB2137, а Лига-1 в наименьшей степени поддерживал популяцию этого штамма на корнях и в растворе. Количество ризобактерий на корнях положительно коррелировало с количеством выделяемых корнями аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, валина, гистидина, глутаминовой кислоты, серина, тирозина, триптофана, фенилаланина и общего количества аминокислот (г варьировал от +0.66 до +0.84;  $P$  варьировала от 0.039 до 0.002;  $n = 10$ ). Группа сортов, входящих в кластер № 2 с высокой экссудацией аминокислот (рис. 1а), достоверно превосходила сорта кластера № 1 по количеству *P. fluorescens* SPB2137 на корнях и в питательном растворе (рис. 5). Положительная корреляция была также между численностью бактерий в растворе и экс-

судацией мальтозы ( $r = +0.65$ ;  $P = 0.043$ ;  $n = 10$ ). Однако количество ризобактерий не коррелировало с интенсивностью экссудации органических кислот. Достоверное положительное влияние ризобактерий на рост корней наблюдалось только у сорта Лебедь (табл. 6), но корреляции между численностью ризобактерий и воздействием на рост корней изучаемых сортов не обнаружено. Особенностью сорта Лебедь была максимальная экссудация глюкозы и мелибиозы (табл. 5, рис. 4). Стимулирующий эффект ризобактерий на рост корней положительно коррелировал с количеством выделяемой глюкозы ( $r = +0.68$ ;  $P = 0.031$ ;  $n = 10$ ) и мелибиозы ( $r = +0.64$ ;  $P = 0.047$ ;  $n = 10$ ).

В лабораторных экспериментах наиболее активная колонизация корней штаммом *F. culmorum* 30 была у сорта Фортуна, а минимальные значения



**Рис. 3.** Кластеризация (кластеры 1 и 2) сортов пшеницы по количеству сахаров в экссудатах (а) и средние значения двух основных кластеров по каждому сахару (б). Кластеры указаны цифрами 1 и 2. Для кластеризации использованы безразмерные стандартизированные величины компонентов экссудатов, метод Варда и квадраты Евклидовых расстояний.  $(D_{link}/D_{max}) \times 100$  – расстояния на шкале выражены в диапазоне от 0 до 100%.

количества микроколоний гриба обнаружены у сортов Курьер, Лебедь и Лилёк (табл. 6). Интенсивность колонизации грибом корней не коррелировала с показателями корневой экссудации. Сорта Ласка и Лига-1 имели максимальные баллы по заболеваемости корней (табл. 6), но существенно различались по активности экссудации. Наиболее устойчивыми к данному штамму гриба были сорта Безостая-1, Веда и Лилёк, а чувствительными были Ласка и Лига-1 (табл. 6). Взаимосвязи между вызываемой штаммом *F. culmorum* 30 заболеваемостью сортов и характером корневой экссудации не

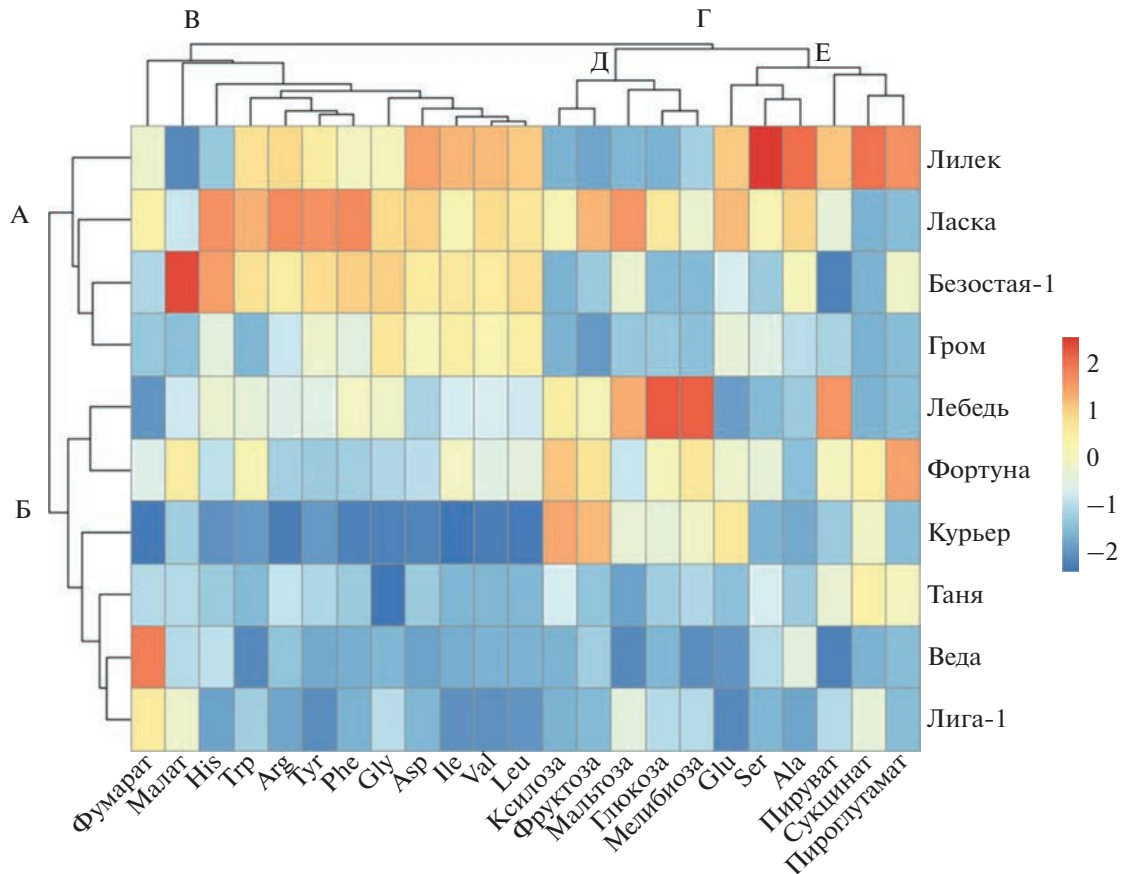
обнаружено. Например, Ласка относилась к сортам с высокой экссудацией, а Лига-1 – к сортам с низкой экссудацией (рис. 4). Обнаружена негативная корреляция между численностью бактерий *P. fluorescens* SPB2137 на корнях в модельных экспериментах и заболеваемостью септориозом ( $r = -0.80$ ;  $P = 0.006$ ;  $n = 10$ ) и твердой головней ( $r = -0.76$ ;  $P = 0.011$ ;  $n = 10$ ) в полевых условиях Краснодарского края.

Корреляционный анализ между заболеваемостью изучаемых сортов пшеницы в полевых условиях Краснодарского края и параметрами интен-

**Таблица 6.** Параметры взаимодействия сортов пшеницы с *P. fluorescens* 2137 в гидропонной культуре и *F. culmorum* 30 в вермикулитной культуре

Сорт	<i>P. fluorescens</i> 2184				<i>F. culmorum</i> Л30	
	количество бактерий, $10^6$ КОЕ /сосуд			эффект на биомассу корней, %	количество микроколоний на 1 см корня	заболеваемость корней, баллы
	на корнях	в растворе	сумма			
Безостая-1	48 ± 5a	218 ± 9e	266 ± 14d	+11 ± 1bc	4.6 ± 0.8bc	0.8 ± 0.1a
Веда	49 ± 2a	68 ± 6abc	117 ± 4ab	+1 ± 1a	5.1 ± 0.6bc	0.6 ± 0.2a
Гром	36 ± 4a	40 ± 3ab	76 ± 7a	+13 ± 3c	4.6 ± 0.4bc	1.8 ± 0.2bc
Курьер	40 ± 5a	48 ± 5abc	88 ± 2a	+1 ± 1a	1.9 ± 0.2a	1.8 ± 0.2bc
Ласка	134 ± 2b	454 ± 59f	588 ± 57e	+6 ± 1abc	4.3 ± 0.9bc	2.8 ± 0.2d
Лебедь	51 ± 1a	105 ± 5cd	155 ± 4b	+41 ± 7d*	1.5 ± 0.3a	1.6 ± 0.3b
Лига-1	29 ± 1a	29 ± 5a	58 ± 5a	+13 ± 3c	4.6 ± 0.6bc	2.3 ± 0.1cd
Лилёк	141 ± 21b	94 ± 9bcd	235 ± 12cd	+4 ± 2ab	3.2 ± 0.6a	0.6 ± 0.2a
Таня	38 ± 4a	46 ± 5ab	84 ± 9a	+4 ± 1ab	6.5 ± 0.7c	2.0 ± 0.2bc
Фортуна	36 ± 3a	138 ± 11d	174 ± 14bc	+2 ± 2a	10.1 ± 1.6d	1.7 ± 0.1b

Примечание. Указаны средние значения ± стандартные ошибки. Латинскими буквами обозначены достоверные различия между сортами для каждого компонента. Звездочка указывает на достоверный эффект микроорганизма на биомассу или длину корней растений относительно соответствующего контроля без инокуляции (критерий НСР Фишера,  $P < 0.05$ ,  $n$  варьирует от 5 до 12 в зависимости от параметра и сорта).



**Рис. 4.** Тепловая карта интенсивности корневой экссудации компонентов изучаемых фракций сортами пшеницы. Используются стандартизированные значения параметров экссудации: красным цветом показаны высокие значения, а синим цветом — низкие (указано на цветной шкале справа). Слева и сверху представлены кластерные диаграммы, группирующие сорта и параметры экссудации, соответственно. Кластеры указаны буквами А, Б, В, Г, Д и Е.

сивности экссудации органических кислот обнаружил ряд взаимосвязей, которые выражались в следующем: негативная корреляция пирувата с желтой ржавчиной ( $r = -0.74$ ;  $P = 0.015$ ;  $n = 10$ ) и сукцината с фузариозом ( $r = -0.77$ ;  $P = 0.009$ ;  $n = 10$ ), но позитивная корреляция малата с желтой ржавчиной ( $r = +0.64$ ;  $P = 0.046$ ;  $n = 10$ ) и мучнистой росой ( $r = +0.82$ ;  $P = 0.004$ ;  $n = 10$ ), а также позитивная корреляция суммарной экссудации органических кислот с мучнистой росой ( $r = +0.68$ ;  $P = 0.029$ ;  $n = 10$ ). Заболеваемость твердой головнёй отрицательно коррелировала с экссудацией аминокислот аланина, аргинина, серина и триптофана ( $r$  варьировал от  $-0.64$  до  $-0.72$ ;  $P < 0.05$ ;  $n = 10$ ). Заболеваемость стеблевой ржавчиной положительно коррелировала с экссудацией гистидина, тирозина и треанина ( $r$  варьировал от  $+0.63$  до  $+0.74$ ;  $P < 0.05$ ;  $n = 10$ ). Заболеваемость фузариозом также положительно коррелировала с экссудацией гистидина ( $r = +0.65$ ;  $P < 0.042$ ;  $n = 10$ ).

Индексы Симпсона, Шеннона и биокомпозиции экссудации аминокислот корнями растений, рассчитанные с помощью фрактальной нейронной

сети, представлены в табл. 7. Индексы Симпсона ( $r = -0.77$ ;  $P = 0.009$ ;  $n = 10$ ), Шеннона ( $r = +0.73$ ;  $P = 0.021$ ;  $n = 10$ ) и биокомпозиции ( $r = -0.87$ ;  $P = 0.003$ ;  $n = 10$ ) достоверно коррелировали с уровнем поражаемости растений пшеницы фузариозом. Дополнительно индекс биокомпозиции достоверно коррелировал ( $r = -0.63$ ;  $P = 0.049$ ;  $n = 10$ ) с уровнем поражаемости растений стеблевой ржавчиной.

Сравнение состава выделяемых корнями аминокислот выявило достоверные различия в количественном отношении, но качественный состав этих экссудатов был одинаковым для всех сортов (табл. 2). Вероятно, это было обусловлено принадлежностью изучаемых растений к одному виду. Достоверные сортовые различия обнаружены также по количеству многих органических кислот и сахаров в экссудатах, при этом сорта различались и по спектру компонентов этих фракций (табл. 4, 5). Известно, что общее количество корневых экссудатов и их компонентов существенно варьирует в зависимости от сорта (генотипа) растения. Внутривидовые различия по данному при-

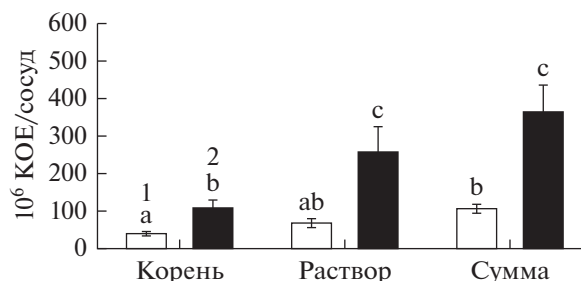
знаку описаны для пшеницы [44], риса [55], гороха [56], картофеля [41, 57], сои [58]. Выявлены различия у генотипов пшеницы, представляющих разные этапы эволюции этого вида, а именно корни современного сорта Karahan выделяли больше аминокислот и сахаров по сравнению с диким злаком *Aegilops squarrosa* и местным турецким сортом Albostan [59]. Авторы предположили, что высокая активность корневой экссудации органических веществ может стимулировать развитие ризосферной микрофлоры. Другие авторы связывают особенности экссудации тетраплоидной пшеницей органических веществ с доместикацией и селекционными манипуляциями, но наблюдаемые феномены в отношении биологии ризосферы не обсуждают [60, 61]. Полученные результаты согласуются с опубликованными ранее данными и свидетельствуют о высоком внутривидовом полиморфизме растений, включая мягкую пшеницу, и способности формировать специфический паттерн корневых экссудатов.

Известно, что микроорганизмы способны модулировать состав и интенсивность экссудации корнями растений различных фракций органических соединений, таких как аминокислоты [38, 41, 42, 58], органические кислоты [24, 39, 43, 44, 58] и сахара [44, 58]. При этом описываемые эффекты проявлялись в стимуляции процесса экссудации. Однако открытыми остаются вопросы о том, в какой степени и почему определённый спектр компонентов экссудатов формируется растением под действием микроорганизмов, а также какую роль играют определённые компоненты в симбиотических взаимодействиях.

**Таблица 7.** Индексы биоразнообразия Шеннона (*IndShen*), доминирования Симпсона (*IndSimp*) и биокомпозиции (*IndBcom*) экссудации аминокислот и их корреляции с уровнем заболеваемости фузариозом растений пшеницы в полевых условиях

Сорт	<i>IndSimp</i>	<i>IndShen</i>	<i>IndBcom</i>
Безостая-1	0.02	0.95	0.59
Веда	0.09	0.86	0.74
Гром	0.05	0.88	0.61
Курьер	0.11	0.81	0.69
Ласка	0.04	0.91	0.58
Лебедь	0.02	0.95	0.68
Лига-1	0.05	0.89	0.62
Лилек	0.15	0.78	0.91
Таня	0.12	0.82	0.78
Фортуна	0.08	0.85	0.71
Стандартная ошибка среднего	±0.007	±0.03	±0.03
Коэффициенты корреляции			
Фузариоз	-0.77*	0.73*	-0.87*
Стеблевая ржавчина	-0.48	0.48	-0.63*

\* Достоверные значения коэффициентов корреляции ( $P < 0.05$ ,  $n = 10$ ).



**Рис. 5.** Колонизация корней и количество *P. fluorescens* 2137 в питательном растворе у сортов пшеницы, входящих в различающиеся по интенсивности экссудации аминокислот кластеры. Кластер 1 объединяет сорта Веда, Гром, Курьер, Лебедь, Лига-1, Таня и Фортуна; кластер 2 – сорта Безостая-1, Ласка и Лилек (рис. 1а). Кластеры указаны цифрами 1 и 2. Указаны средние значения ± стандартные ошибки. Различные латинские буквы указывают на достоверные различия между вариантами (критерий НСР Фишера,  $P < 0.05$ ,  $n$  варьирует от 6 до 14 в зависимости от кластера).

В работе выявлена положительная корреляция между численностью популяции ростостимулирующей бактерии *P. fluorescens* SPB2137 в корневой зоне и интенсивностью экссудации корнями пшеницы аминокислот. При этом удалось идентифицировать конкретные аминокислоты, высокая экссудация которых сопровождалась увеличением численности *P. fluorescens* SPB2137. Однако такой взаимосвязи между растениями и показателями развития фитопатогенного гриба *F. culmorum* 30 не обнаружено. Это указывало на важную роль ами-



нокислот в развитии полезной микрофлоры в ризосфере. В то же время, количество выделяемого корнями глицина, который не поддерживал размножение ризобактерий, коррелировало с поражаемостью растений различными фитопатогенами в полевых условиях. Органические кислоты имели меньшее значение для развития популяции *P. fluorescens* SPB2137 на корнях и в питательном растворе, поскольку корреляции численности ризобактерий с этими экссудатами не обнаружено. Но сорта с интенсивной экссудацией малата оказались более чувствительны к мучнистой росе в полевых условиях. Сахара, а именно глюкоза и мелибиоза, являлись важными компонентами экссудации для проявления стимулирующего действия ризобактерий на рост корней пшеницы. Это, вероятно, было связано с их высокой ценностью для ризобактерий в качестве легкодоступного источника углерода и энергии. Полученные результаты показали, что формирование популяций микроорганизмов и реакция растений на инокуляцию обусловлены сложным паттерном комплекса корневых экссудатов. Более того, для реализации взаимодействий растений и микроорганизмов важен баланс компонентов экссудатов. Это продемонстрировано в работе путем расчета количественных соотношений между фракциями экссудатов. Соотношение количества аминокислот к органическим кислотам положительно коррелировало с численностью *P. fluorescens* SPB2137 на корнях пшеницы ( $r = +0.64$ ;  $P = 0.045$ ;  $n = 10$ ), а отношение органических кислот к сахарам отрицательно коррелировало с заболеваемостью растений *F. culmorum* 30 ( $r = -0.67$ ;  $P = 0.033$ ;  $n = 10$ ).

Интерес представляли обнаруженные негативные корреляции между численностью бактерий *P. fluorescens* SPB2137 на корнях в модельных экспериментах и заболеваемостью растений септориозом и твердой головней в полевых условиях Краснодарского края. Эти эксперименты подтвердили, что сорта с низкой способностью поддерживать высокую популяцию биоконтрольных бактерий в ризосфере более чувствительны к этим болезням. В какой степени эта зависимость обусловлена корневой экссудацией, отстает открытым. Корреляционный анализ показал, что сорта с высокой экссудацией аминокислот обеспечивали более активное размножение биоконтрольных бактерий и более устойчивы к твердой головне. Однако поражаемость сортов стеблевой ржавчиной положительно коррелировала с экссудацией некоторых аминокислот. Наличие противоположных корреляций и связанные с этим противоречивые результаты свидетельствовали о сложных процессах взаимодействия компонентов растительно-микробных систем, обусловленных корневой экссудацией. Вектор этих процессов зависит от состава и количества отдельных компонентов экссудатов, вида и питательных особенностей микроорганиз-

мов, а также от ряда неопределяемых в данных экспериментах свойств обоих партнеров.

Информация о роли отдельных компонентов экссудатов в наблюдаемых эффектах весьма ограничена. Показано, что аланин и некоторые вторичные метаболиты пшеницы могут привлекать потенциально полезную микрофлору, относящуюся к семействам *Rhizobiaceae* и *Burkholderiaceae* [62]. Предположение о более высокой привлекательности органических кислот по сравнению с аминокислотами для ассоциативного азотфиксатора *Azospirillum brasilense* не подтвердилось, поскольку численность его популяции на корнях пшеницы и люцерны (растений с низкой и высокой экссудацией этих веществ) была одинаковой [63]. Эти данные поддерживают гипотезу о важной роли аминокислот в растительно-микробных взаимодействиях. Следует подчеркнуть, что аминокислота триптофан является ключевым микробным субстратом для биосинтеза фитогормона 3-индолилуксусной кислоты и стимуляции роста растений ризобактериями [64–66]. Другой аминокислотой, играющей определяющую роль в повышении устойчивости растений к стрессам благодаря микроорганизмам, является 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат [67, 66]. Перспективным представляется более глубокое изучение взаимодействия растений с микроорганизмами, обусловленное другими аминокислотами.

Фрактальный принцип формообразования живых организмов является фундаментальным принципом [68, 69]. Этот принцип регламентирует степенное соотношение числа молекул различных аминокислот в профилях экссудации [51]. Фрактальный принцип реализован во фрактальной нейронной сети (ФНС), которая использовалась для обработки данных экссудации аминокислот различных сортов растений и вычисления индексов Симпсона, Шеннона, фрактальной биокомпозиции [53, 70]. ФНС рассчитывает индексы, анализируя отклонение реальных профилей аминокислотной экссудации от идеальной фрактальной модели [71] и используя рекурсивную методику обучения ФНС на фактических эмпирических данных [54].

Обнаружено, что *IndBcon* принимает значения в промежутке 0.59–0.91 (табл. 7). При этом максимальное значение *IndBcom* = 0.91 растений пшеницы сорта Лилек соответствует самой низкой их заболеваемости фузариозом (3 балла, рис. 1). Возможно, снижение предрасположенности к заболеванию фузариозом этих растений является следствием повышения защитных барьеров в растениях за счет повышения уровня согласованности и биокомпозиции внутренних биохимических процессов.

Следует подчеркнуть, что проблема расшифровки молекулярных механизмов взаимодействия рас-



тений, в том числе пшеницы, с фитопатогенами чрезвычайно важна и сложна [72, 73]. Имеются доказательства о взаимной координации поведения партнеров (хозяина и патогена), направленной на обеспечение сосуществования и ко-эволюцию [74]. Аналогичные закономерности описаны и для мутуалистических симбиозов растений с микроорганизмами [75]. Возможно, изучение особенностей корневой экссудации как фактора регуляции растительно-микробных взаимодействий внесет вклад в решение этой проблемы.

Полученные результаты поддерживают мнение исследователей о том, что путём регуляции корневой экссудации можно повысить конкурентоспособность и активность ростостимулирующих ризобактерий, уменьшить привлекательность данной экологической ниши для фитопатогенов и повысить устойчивость растений к различным абиотическим стрессам [43, 76, 77]. Выявленные ключевые компоненты экссудатов (некоторые аминокислоты, глюкоза и мелибиоза) могут быть использованы в качестве биохимических маркеров для селекции самодостаточных растительно-микробных систем, отвечающих требованиям современного устойчивого земледелия. Сорты Лилёк и Курьер, наиболее контрастные по экссудации аминокислот, и различающиеся также по экссудации органических кислот и сахаров (рис. 4) могут послужить моделью для изучения роли этих веществ в растительно-микробных взаимодействиях.

Авторы благодарны П.С. Ульяничу (ВНИИС-ХМ) за помощь в построении рис. 4.

Работа по культивированию растений и анализу корневых экссудатов выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 15-04-09023). Математическая и биоинформатическая работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-26-00341).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Byerlee D., Moya P.* Impacts of International Wheat Breeding Research in the Developing World, 1966–1990. / Eds. P.W. Heisey, M.A. Lantican, and H.J. Dubin. International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), D.F., Mexico, 1993. 87 p.
2. *Pingali P.* // PNAS. 2012. V. 109. № 31. P. 12302–12308.
3. *Raeboline A., Nelson L.E., Ravichandran K., Antony U.* // J. Ethnic Foods. 2019. V. 6. Article 8. <https://doi.org/10.1186/s42779-019-0011-9>
4. *Pearce S.* // J. Exp. Bot. 2021. V. 72. № 2. P. 157–160.
5. *Sharma R.C., Morgounov A., Akin B., Bespalova L., Lang L., Litvinenko M., et al.* // Crop Sci. 2014. V. 54. № 6. P. 2469–2480.
6. *Li S., Zhang C., Li J., Yan L., Wang N., Xia L.* // Plant Commun. 2021. V. 2. № 4. P. 100211.
7. *Elkoca E., Turan M., Donmez M.F.* // J. Plant Nutr. 2010. V. 33. P. 2104–2119.
8. *Vessey J.K.* // Plant Soil. 2003. V. 255. P. 571–586.
9. *Ryan P.R., Dessaux Y., Thomashow L.S., Weller D.M.* // Plant Soil. 2009. V. 321. P. 363–383.
10. *Кожемяков А.П., Белоброва С.Н., Орлова А.Г.* // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 3. С. 112–115.
11. *Chandran H., Meena M., Swapnil P.* // Sustainability. 2021. V. 13. Article 10986. <https://doi.org/10.3390/su131910986>
12. *Beneduzi A., Ambrosini A., Passaglia L.M.P.* // Genet. Mol. Biol. 2012. V. 35. P. 1044–1051.
13. *Chaluvadi S., Bennetzen J.L.* // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. Article 1183. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01183>
14. *Kudoyarova G., Arkhipova T., Korshunova T., Bakaeva M., Loginov O., Dodd I.C.* // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. Article 1368. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01368>
15. *Mohanram S., Kumar P.* // Ann. Microbiol. 2019. V. 69. P. 307–320.
16. *Weller D.M., Thomashow L.S.* // Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms. / Eds. O’Gara F., Dowling D.N., Boesten B. Weinheim, New York: VCH Publisher Inc., 1994. P. 1–18.
17. *Whipps J.M.* // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. P. 487–511.
18. *Belimov A., Kojemiakov, A., Chuvarliyeva C.* // Plant Soil. 1995. V. 173. P. 29–37.
19. *Lugtenberg B., Kamilova F.* // Annu. Rev. Microbiol. 2009. V. 63. P. 541–556.
20. *Bürgmann H., Meier S., Bunge M., Widmer F., Zeyer J.* // Environ. Microbiol. 2005. V. 7. P. 1711–1724.
21. *Lugtenberg B.J.J., Dekkers L., Bloemberg G.V.* // Annu. Rev. Phytopathol. 2001. V.39. P. 461–490.
22. *Кравченко Л.В., Азарова Т.С., Леонова–Ерко Е.И., Шапошников А.И., Макарова Н.М., Тихонович И.А.* // Микробиология. 2003. Т. 72. № 1. С. 48–53.
23. *de Werra P., Huser A., Tabacchi R., Keel C., Maurhofer M.* // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77 № 8. P. 2807–2812.
24. *Lynch J.M., Whipps J.M.* // Plant Soil. 1990. V. 129. P. 1–10.
25. *Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S, Vivanco J.M.* // Ann. Rev. Plant Biol. 2006. V. 57. P. 233–266.
26. *de Weert S., Vermeiren H., Mulders I.H.M., Kuiper I., Hendrickx N., Bloemberg G.V., Vanderleyden J., De Mot R., Lugtenberg B.J.J.* // Mol. Plant-Microbe Interact. 2002. V. 15. P. 1173–1180.
27. *Rudrappa T., Czymmek K.J., Pare P.W., Bais H.P.* // Plant Physiol. 2008. V. 148. P. 1547–1556.
28. *Ling N., Raza W., Ma J., Huang Q., Shen Q.* // Eur. J. Soil Biol. 2011. V. 47. P. 374–379.
29. *Tan S., Yang C., Mei X., Shen S., Raza W., Shen Q., Xu Y.* // Appl. Soil Ecol. 2013. V. 64. P. 15–22.
30. *Ren L., Huo H., Zhang F., Hao W., Xiao L., Dong C., Xu G.* // Plant Signal. Behav. 2016. V. 11. № 6. Article e1187357. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1187357>
31. *Perry L.G., Alford E.R., Horiuchi J., Paschke M., Vivanco J.M.* // The Rhizosphere (Second Edition). / Eds. Pinton, R.,

- Varanini, Z., Nannipieri P. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007. P. 297–330.
32. Broeckling C.D., Broz A.K., Bergelson J., Manter D.K., Vivanco J.M. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. № 3. P. 738–744.
  33. Кравченко Л.В., Шапошников А.И., Макарова Н.М., Азарова Т.С., Львова К.А., Костюк И.И., Ляпунова О.А., Тихонович И.А. // *Физиология растений.* 2011. Т. 58. № 5. С 1–6.
  34. Stringlis I.A., Yu K., Feussner K., de Jonge R., Van Bentum S., Van Verk M.C., Berendsen R.L., Bakker P.A.H.M., Feussner I., Pieterse C.M.J. // *PNAS.* 2018. V. 115. № 22. P. E5213–E5222.
  35. Cotton T.E.A., Pe'triacq P., Cameron D.D., Meselmani M.A., Schwarzenbacher R., Rolfe S.A., Ton J. // *ISME J.* 2019. V. 13. P. 1647–1658.
  36. Huang A.C., Jiang T., Liu Y.X., Bai Y.C., Reed J., Qu B., Goossens A., Nützmänn H.W., Bai Y., Osbourn A. // *Science.* 2019. V. 364. № 6440. eaau6389. <https://doi.org/10.1126/science.aau6389>
  37. Prudence S.M., Newitt J.T., Worsley S.F., Macey M.C., Murrell J.C., Lehtovirta–Morley L.E., Hutchings M.I. // *Environ. Microbiome.* 2021. V. 16. Article 12. <https://doi.org/10.1186/s40793-021-00381-2>
  38. Shi J.B., Gong X.Y., Khashi u Rahman M., Tian Q., Zhou X.G., Wu F.Z. // *Plant Soil Environ.* 2021. V. 67. P. 721–728.
  39. Owens A.G., Jones D.L. // *Soil Biol. Biochem.* 2001. V. 33. P. 651–657.
  40. Chen S., Waghmode T.R., Sun R., Kuramae E.E., Hu C., Liu B. // *Microbiome.* 2019. V. 7. Article 136. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0750-2>
  41. Hu L., Robert C.A.M., Cadot S., Zhang X., Ye M., Li B., Manzo D., Chervet N., Steinger T., van der Heijden M.G.A., Schlaeppi K., Erb M. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. Article 2738. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05122-7>
  42. Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Shaposhnikov A.I., Azarova T.S., Makarova N.M., Davies W.J., Tikhonovich I.A. // *Ann. Appl. Biol.* 2015. V. 167. P. 11–25.
  43. Phillips D.A., Fox T.C., King M.D., Bhuvaneshwari T.V., Teuber L.R. // *Plant Physiol.* 2004. V. 136. P. 2887–2894.
  44. Kawasaki A., Dennis P.G., Forstner C., Raghavendra A.K.H., Mathesius U., Richardson A., Delhaize E., Gilliham M., Watt M., Ryan P.R. // *Plant Physiol.* 2021. V. 187. P. 2279–2295.
  45. Yahya M., Islam E.U., Rasul M., Farooq I., Mahreen N., Tawab A., Irfan M., Rajput L., Amin I., Yasmin S. // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Article 744094. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.744094>
  46. Sasse J., Martinoia E., Northen T. // *Trends Plant Sci.* 2018. V. 25. № 1. P. 25–41.
  47. Tsunoda T., van Dam N.M. // *Pedobiologia.* 2017. V. 65. P. 58–67.
  48. Pang Z., Chen J., Wang T., Gao C., Li Z., Guo L., Xu J., Cheng Y. // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. Article 621276. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.621276>
  49. Кравченко Л.В., Макарова Н.М., Азарова Т.С., Про-воров Н.А., Тихонович И.А. // *Микробиология.* 2002. Т. 71. № 4. С. 521–525.
  50. Струнникова О.К., Шахназарова В.Ю., Вишневецкая Н.А., Ручий А.С., Чижевская Е.П. // *Микология и фитопатология.* 2013. Т. 47. № 3. С. 196–203.
  51. Мэгарран Э. Экологическое разнообразие и его измерение. М.: Мир, 1992. 184 с.
  52. Городничев Р.М., Пестрякова Л.А., Ушницкая Л.А., Левина С.Н., Давыдова П.В. Методы экологических исследований. Основы статистической обработки данных: учебно-методическое пособие. Якутск: Издательский дом СВФУ, 2019. 94 с.
  53. Мандельброт Б. Фрактальная геометрия природы. М.: Институт компьютерных исследований, 2002. 656 с.
  54. Сергеев А.П., Тарасов Д.А. Введение в нейросетевое моделирование: учебное пособие Екатеринбург: Изд-во Уральского университета, 2017. 128 с.
  55. Гудфеллоу Я., Бенджио И., Курвилль А. Глубокое обучение. М.: ДМК Пресс, 2018. 652 с.
  56. Naher U.A., Radziah O., Halimi M.S., Shamsuddin Z.H., Mohd Razi I. // *Res. J. Microbiol.* 2008. V. 3. P. 580–587.
  57. Кузмичева Ю.В., Шапошников А.И., Азарова Т.С., Петрова С.Н., Наумкина Т.С., Борисов А.Ю., Белимов А.А. и др. // *Физиология растений.* 2014. Т. 61. № 1. С. 121–128.
  58. Inceoglu Ö., Salles J.F., van Elsas J.D. // *Microb. Ecol.* 2012. V. 63. P. 460–470.
  59. Kuzmicheva Y.V., Shaposhnikov A.I., Petrova S.N., Makarova N.M., Tychinskaya I.L., Puhalsky J.V. et al. // *Plant Soil.* 2017. V. 419. P. 83–96.
  60. Шапошников А.И., Морзунов А., Акин Б., Макарова Н.М., Белимов А.А., Тихонович И.А. // *Сельскохозяйственная биология.* 2016. Т. 51. № 1. С. 58–78.
  61. Beleggia R., Rau D., Laidò G., Platani C., Nigro F., Fraggasso M., De Vita P., Scossa F., Fernie A.R., Nikoloski Z., Papa R. // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. P. 1740–1753.
  62. Iannucci A., Fraggasso M., Beleggia R., Nigro F., Papa R. // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. Article 2124. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02124>
  63. Qu Q., Li Y., Zhang Z., Cui H., Zhao Q., Liu W., Lu T., Qian H. // *J. Hazard Mater.* 2021. V. 411. Article 125137. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125137>
  64. O'Neal L., Vo L., Alexandre G. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2020. V. 86. № 15. Article e01026-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01026-20>
  65. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нептросов Л.И. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2006. Т. 42. № 2. С. 133–143.
  66. Patten C.L., Blakney A.J., Coulson T.J. // *Crit. Rev. Microbiol.* 2013. V. 39. № 4. P. 395–415.
  67. Сырова Д.С., Шапошников А.И., Юзихин О.С., Белимов А.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2022. Т. 58. № 1. С. 3–22.
  68. Glick B.R., Biljana T., Czarny J., Cheng Z., Duan J., McConkey B. // *Crit. Rev. Plant Sci.* 2007. V. 26. P. 227–242.
  69. Богатых Б.А. Фрактальная природа живого: системное исследование биологической эволюции и природы сознания. М.: Книжный дом “ЛИБЕКОМ”, 2012. 256 с.

70. Мандельброт Б. Фрактальная геометрия природы. М.: Институт компьютерных исследований, 2002. 656 с.
71. Гафаров Ф.М., Галимянов А.Ф. Искусственные нейронные сети и приложения: учебное пособие. Казань: Изд-во Казанского университета, 2018. 121 с.
72. Воробьев Н.И., Селина М.В. // Пермский аграрный вестник. 2021. № 4(36). С. 92–99.
73. Keller B., Wicker T., Krattinger S.G. // Annu. Rev. Phytopathol. 2018. V. 56. P. 67–87.
74. Wulff B.B., Krattinger S.G. // Curr. Opin. Biotechnol. 2022. V. 73. P. 270–275.
75. Dracatos P.M., Haghdoost R., Singh D., Park R.F. // New Phytol. 2018 V. 218. № 2. P. 453–462.
76. Проворов Н.А., Тихонович И.А., Воробьев Н.И. // Генетика. 2016. Т. 52. № 2. С. 137–145.
77. Rengel Z. // Plant Soil. 2002. V. 245. P. 59–70.
78. Wang J., Li R., Zhang H., Wei G., Li Z. // BMC Microbiol. 2020. V. 20. Article 38. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-1708-z>

## Relationship between the Composition of Root Exsudates and the Efficiency of Interaction of Wheat Plants with Microorganisms

A. I. Shaposhnikov<sup>a</sup>, A. A. Belimov<sup>a, \*</sup>, T. S. Azarova<sup>a</sup>, O. K. Strunnikova<sup>a</sup>, N. A. Vishnevskaya<sup>a</sup>, N. I. Vorobyov<sup>a</sup>, O. S. Yuzikhin<sup>a</sup>, L. A. Beshpalova<sup>b</sup>, and I. A. Tikhonovich<sup>a</sup>

<sup>a</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, 196608 Russia

<sup>b</sup>National Grain Center named after P.P. Lukyanenko, Central Estate of KNIISH, Krasnodar, Krasnodar Territory, 350012 Russia

\*e-mail: belimov@rambler.ru

Plant roots secrete various organic substances into the rhizosphere, which are a source of nutrition for microorganisms and largely determine the nature of plant-microbe interactions. The composition of the main fractions of root exudates in ten modern varieties of wheat was determined: amino acids, organic acids and sugars. Reliable qualitative and quantitative differences between varieties for individual components of exudates were revealed, which determined the peculiarities of cultivar clustering on this trait. Relationships between exudation and the effectiveness of plant interaction with the growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* SPB2137 and the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum* 30 in laboratory systems, as well as with the resistance of varieties to diseases in the field, were found. The number of *P. fluorescens* SPB2137 in the root zone positively correlated with the amount of many amino acids, as well as maltose, secreted by the roots. The stimulating effect of rhizobacteria on root growth positively correlated with the amount of released glucose and melibiose. The relationship between the nature of root exudation and root colonization or the susceptibility of varieties to *F. culmorum* 30 was not found. The analysis of correlations between the incidence of wheat varieties in the field and the intensity of exudation of certain substances, as well as with the biocomposition index of amino acid exudation, was carried out. The role of root exudate components in the formation of effective plant-microbial systems is discussed.

**Keywords:** *Fusarium*, root exudates, plant-microbe interactions, *Pseudomonas*, wheat, rhizosphere, symbiosis, *Triticum*, exometabolites

УДК 581.1,633.358,577.13

## НАРИНГЕНИН МОДУЛИРУЕТ АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ПЛАНКТОННОЙ КУЛЬТУРЕ И БИОПЛЕНКАХ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

© 2023 г. А. М. Гончарова<sup>1</sup>, \*, Л. А. Ломоватская<sup>1</sup>, А. С. Романенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения  
Российской академии наук (СИФИБР СО РАН), Иркутск, 664033 Россия

\*e-mail: alvlad87@mail.ru

Поступила в редакцию 17.11.2022 г.

После доработки 30.12.2022 г.

Принята к публикации 09.01.2023 г.

Изучено влияние нарингенина на рост планктонной культуры, плотность биопленок и активность трансмембранной формы аденилатциклазы в клетках *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Исследования показали, что нарингенин практически не влиял на рост планктонной культуры этих бактерий, в то время как плотность биопленок снижалась по мере увеличения концентрации нарингенина. Показано, что в клетках планктонной культуры и в биопленках нарингенин активировал трансмембранную форму аденилатциклазы. Причем в планктонной культуре такое влияние было более выраженным. Предполагается, что активация нарингенином ризобияльной трансмембранной аденилатциклазы осуществляется с помощью рецепторного механизма.

**Ключевые слова:** нарингенин, цАМФ, аденилатциклаза, биопленка, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

**DOI:** 10.31857/S0555109923030078, **EDN:** AZRTOB

Известно, что фенольные соединения играют важную роль в жизнедеятельности различных организмов. Одним из таких является нарингенин, относящийся к классу флавононов. У растений это соединение выполняет роль антимикробного агента и антиоксиданта, а также является предшественником катехина [1]. Весьма важная роль принадлежит нарингенину как сигнальной молекуле при взаимодействии бобовых с ризобияльными бактериями. Так, нарингенин из корневых экссудатов гороха (*Pisum sativum*) индуцирует активацию *nod*-генов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, направленную на синтез ризобияльных Nod-факторов (NF) – специфических молекул хитоолигосахаридной природы, играющих важную роль на начальных этапах бобово-ризобияльного симбиоза [2]. Также в молекулярном диалоге бобовых и ризобий существенное значение имеют сигнальные молекулы бактерий, в частности циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) – продукт функционирования аденилатциклазы и вторичный мессенджер аденилатциклазной сигнальной системы [3]. Кроме хорошо известной роли этого вторичного мессенджера в регуляции генов катаболической репрессии [4], цАМФ ризобий принимает участие в становлении бобово-ризобияльного симбиоза. Показано, что в *Sinorhizobium meliloti* на ранних этапах взаимодействия с *Medicago sativa* дей-

ствует сигнальный регуляторный каскад, состоящий из трех рецепторо-подобных аденилатциклаз, Сгp-регулятора транскрипции и целевого гена. Каскад специфически активируется растительным сигналом в период органогенеза клубенька, а его инактивация приводит к гипернодуляции и абортированию инфекционных нитей [5].

При этом остается неясным, может ли нарингенин выступать в роли растительного сигнального индуктора и активатора ризобияльной аденилатциклазы.

Как известно, предпочтительным способом существования бактерий, в том числе ризобий, в окружающей среде являются биопленки, так как именно такая форма организации обеспечивает им большую устойчивость, а также возможность коммуникации и обмен информацией между клетками бактерий, в том числе, при взаимодействии с организмом хозяина [6].

В настоящий момент отсутствуют сведения о влиянии нарингенина на численность *R. leguminosarum* bv. *viciae* в планктонной культуре и плотность формируемых ими биопленок.

Цель настоящей работы – изучение влияния нарингенина на динамику роста планктонной культуры и плотность биопленок, а также активность трансмембранной формы аденилатциклазы

(ТАЦ, КФ 4.6.1.1) и концентрацию цАМФ в клетках *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

## МЕТОДИКА

В работе использовали бактерии *R. leguminosarum* bv. *viciae* – эффективный для азотфиксации штамм 1022, полученный из Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства (ВКСМ, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург, Россия).

**Культивирование бактерий.** Планктонную культуру бактерий выращивали в термостате при температуре 26°C в конических колбах объемом 100 мл на среде (рН 7.0), содержащей гороховый отвар (30 г сухого гороха/л), глюкозу – 15 г/л и CaCO<sub>3</sub> – 5 г/л. Титр бактерий определяли на планшетном спектрофотометре “АИФР-01 Униплан” (ВНИИ оптико-физических измерений, Москва, Россия) при 655 нм. В качестве контроля при измерении титра бактерий использовали питательную среду аналогичного состава, но без бактерий.

Для исследования использовали бактерии в стационарной фазе роста. Биопленки готовили в чашках Петри с полиэтиленовыми дисками. В чашки Петри вносили по 8 мл планктонной культуры бактерий с титром  $0.3 \times 10^8$  кл./мл и культивировали на среде с гороховым отваром в течение 3 сут при 27°C. Затем среду удаляли, добавляли 8 мл такой же чистой среды и продолжали культивирование в тех же условиях еще в течение 3 сут. Для определения плотности биопленки среду удаляли, фиксировали 96%-ным этиловым спиртом на полиэтиленовом диске и окрашивали 0.1%-ным кристаллическим фиолетовым и трижды промывали дистиллированной водой. Далее добавляли 2 мл воды, инкубировали в течение 2 мин и измеряли интенсивность окраски полученного раствора на спектрофотометре при 495 нм. Плотность биопленки была пропорциональна интенсивности окраски раствора [7].

Нарингенин (“Sigma-Alcorich” США), растворенный в минимальном объеме метанола, добавляли в среду культивирования бактерий после автоклавирования. Использовали нарингенин в следующих конечных концентрациях: 500 пМ, 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 1 мкМ. Контролем служила культура бактерий, выращенная без добавления нарингенина. Предварительные эксперименты показали, что сам по себе метанол в концентрации 10 мкл/30 мл среды не оказывал влияния на рост бактерий. Для искусственного снижения уровня цАМФ в клетках бактерий использовали сурамин – ингибитор трансмембранной аденилатциклазы. В работе 500 мкМ сурамина добавляли к среде, в

которой выращивали планктонную культуру и культивировали 5 сут. В отдельных экспериментах сурамин добавляли в среду вместе с нарингенином.

**Определение активности трансмембранной аденилатциклазы и концентрации цАМФ.** Активность ТАЦ определяли в мембранной фракции бактериальных клеток, как планктонной культуры, так и в биопленках, не фиксированных спиртом по методу, описанному в работе [8], и выражали в наномолях цАМФ/мг белка в мин.

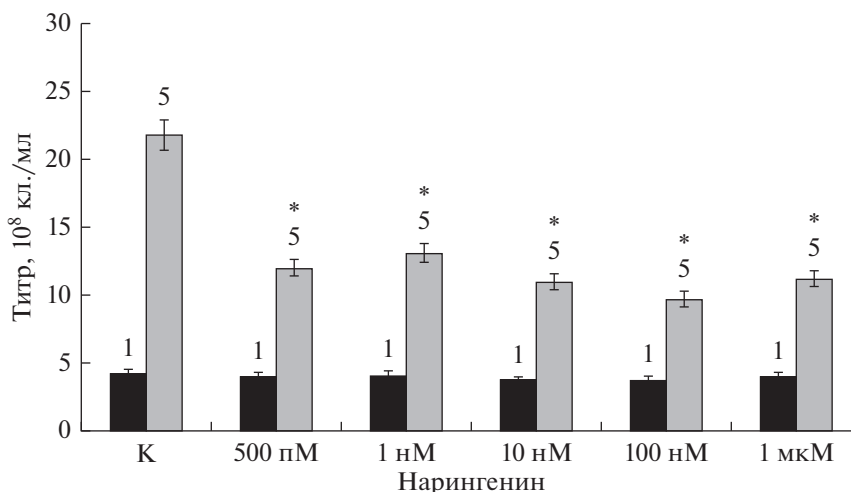
Содержание цАМФ определяли методом иммуноферментного анализа в супернатанте, полученном в результате центрифугирования при 10500 g гомогената клеток бактерий отмытых и разрушенных на ультразвуковом соникаторе “Branson Ultrasonic corp” (США) [8]. Белок определяли по методу Брэдфорда [9].

Эксперименты проводили в трех биологических повторностях. При определении титра бактерий и плотности биопленок использовали восемь аналитических повторностей. В экспериментах по изучению активности компонентов аденилатциклазной сигнальной системы бактерий учитывали десять аналитических повторностей для каждой биологической. Для статистической обработки результатов использовали программу Sigma-Plot, с помощью которой вычисляли среднее арифметическое значение и среднее квадратическое отклонение. Достоверность различий между значениями вычисляли по критерию Дункана, критерию Даннета и двухвыборочному t-критерию Стьюдента при  $P \leq 0.05$ . На графиках приведены средние значения и среднее квадратическое отклонение. Достоверно различающиеся значения на графиках отмечены звездочками.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние нарингенина на динамику роста планктонной культуры и плотность биопленок *R. leguminosarum* bv. *viciae*.** Для исследования влияния нарингенина на рост планктонной культуры и биопленок использовали несколько концентраций нарингенина: 500 пМ, 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 1 мкМ. Все испытанные концентрации почти не оказывали влияния на рост планктонной культуры *R. leguminosarum* bv. *viciae* в течение 4 сут эксперимента, на пятые сут плотность ризобияльной культуры снижалась на 40–50% по сравнению с контролем (рис. 1).

В то же время на формирование биопленок нарингенин оказывал другой эффект: их плотность возрастала под действием самой низкой из испытываемых концентраций, 500 пМ, но с увеличением концентрации этого соединения наблюдалось снижение плотности биопленок (рис. 2).



**Рис. 1.** Влияние нарингенина на рост планктонной культуры *R. leguminosarum* bv. *viciae*: 1 – первые сут роста бактерий, 5 – 5 сут роста бактерий. Контроль (К) – планктонная культура без добавления нарингенина. \*Различия статистически значимы ( $P \leq 0.05$ ) при сравнении вариантов опыта с нарингенином с контролем по критерию Стьюдента. Различия вариантов опыта с различными концентрациями нарингенина между собой по критерию Дункана ( $P \leq 0.05$ ) статистически не значимы. ( $n = 3$ ,  $m \pm S.E$ ).

По данным литературы, нарингенин метаболизируется *R. leguminosarum* bv. *viciae* с образованием флороглюцина, *n*-кумаровой кислоты и *n*-гидроксibenзойной кислот [10]. Так как действующая концентрация нарингенина как сигнальной молекулы была мала, то содержание продуктов его метаболизма также было низким и не могло оказывать токсическое воздействие на бактерии.

**Влияние нарингенина на активность аденилатциклазы и концентрацию цАМФ в планктонной культуре и биопленках *R. leguminosarum* bv. *viciae*.** Исследования показали, что уровень эндогенного цАМФ бактерий в планктонной культуре в стационарной стадии роста и в зрелых биопленках существенно различался, в последнем варианте концентрация этой сигнальной молекулы была в 4 раза ниже по сравнению с планктонной культурой (табл. 1). Добавление различных концентраций нарингенина к планктонной культуре и биопленкам приводило к повышению уровня эндогенного цАМФ (табл. 1).

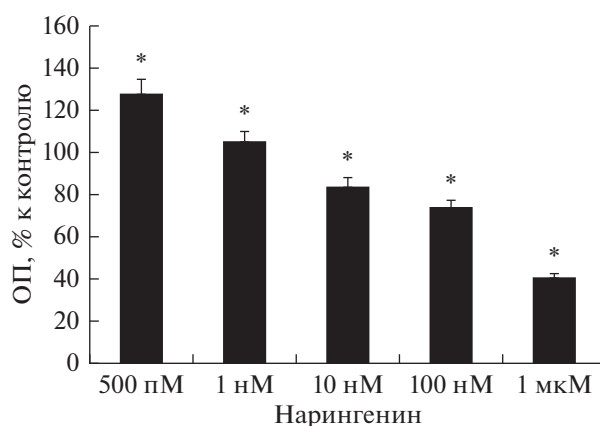
Для изучения влияния нарингенина на активность тАЦ в планктонной культуре и биопленках *R. leguminosarum* bv. *viciae* использовали как самую низкую, 500 пМ, так и самую высокую – 1 мкМ концентрации нарингенина. Обе концентрации нарингенина активировали тАЦ как в клетках планктонной культуры, так и в биопленках. Однако в планктонной культуре такое влияние было более выраженным (рис. 3).

Для проверки гипотезы о лиганд-рецепторном механизме активации тАЦ нарингенином к планктонной культуре добавляли 500 мкМ сурамина [11]. Известно, что активация тАЦ от мембранных рецепторов происходит с участием

ГТФ-связывающих белков (G-белков). Сурамин разобщает связь мембранного рецептора с G-белком, таким образом ингибируя активность тАЦ [12].

Культивирование планктонной культуры бактерий с сурамином в течение 5 сут снижало активность этого фермента более чем на 70% (рис. 4). Однако инкубация с сурамином и 1 мкМ нарингенина также в течение 5 сут повышала активность тАЦ до 250% от контроля (рис. 4).

Растительно-бактериальный азотфиксирующий симбиоз начинается с обмена сигналами



**Рис. 2.** Влияние нарингенина на плотность биопленок *R. leguminosarum* bv. *viciae* (оптическая плотность (ОП), % к контролю.). Контролем служили биопленки без добавления нарингенина. \*Различия статистически значимы ( $P \leq 0.05$ ) при сравнении между собой вариантов опыта с различными концентрациями нарингенина по критерию Дункана.  $n = 3$ ,  $m \pm S.E$ .

**Таблица 1.** Влияние нарингенина на концентрацию цАМФ в клетках *R. leguminosarum* bv. *viciae*

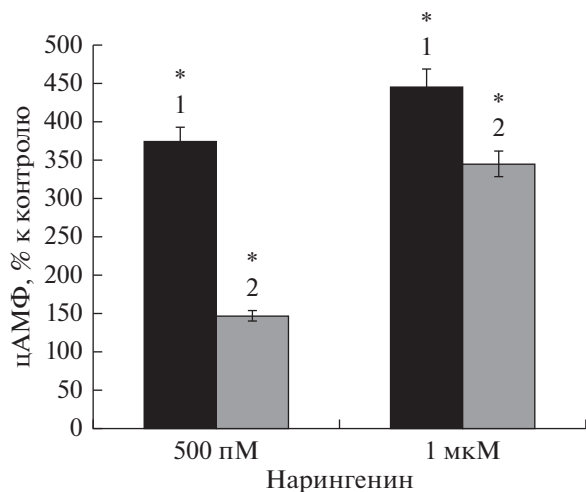
Нарингенин, концентрация	Формы организации бактерий			
	планктонная культура		био пленка	
	цАМФ, нМ/мг белка	% к контролю	цАМФ, нМ/мг белка	% к контролю
Контроль	23 ± 2.1	100	5.5 ± 0.9	100
500 пМ	38* ± 3.4	165	12.2* ± 1.2	222
1 нМ	45* ± 4.3	196	12.5* ± 1.2	227
10 нМ	50* ± 5.1	217	13* ± 1.2	236
100 нМ	73* ± 7.2	317	17.5* ± 1.8	318
1 мкМ	100* ± 9.6	435	19* ± 1.7	345

\* Различия статистически значимы ( $P \leq 0.05$ ) по критерию Даннета при сравнении экспериментов с внесением всех концентраций нарингенина с контролем без нарингенина,  $n = 3$ ,  $m \pm S.E.$

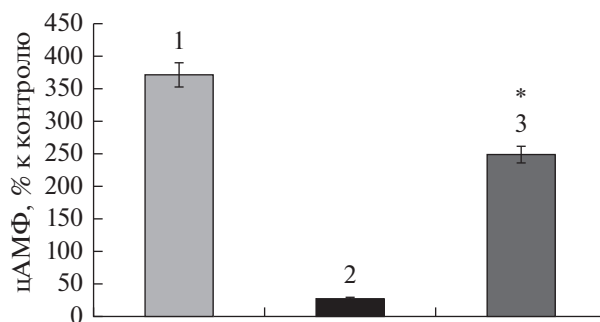
между макро- и микросимбиотом. На ранних этапах взаимодействия растения выделяют в ризосферу флавоноиды, один из которых, нарингенин, необходим для индукции транскрипции генов ключевых факторов образования клубеньков у бактерий рода *Rhizobium* – Nod-факторов [13, 14]. Nod-факторы запускают комплекс специфических ответов в эпидерме, перицикле и коре корня растения, тем самым обеспечивая основу для последующего проникновения ризобий в клетки растений, развития инфекции и морфогенеза клубеньков [15].

Следует отметить, что в литературе нет однозначного мнения об оптимальных действующих концентрациях нарингенина. По некоторым дан-

ным, на индукцию *nod*-генов и рост культуры *R. leguminosarum* bv. *viciae* наибольший активирующий эффект оказывает нарингенин в концентрации 0.5 мкМ [16]. В тоже время, по данным других авторов, различная степень активации этих же генов достигается в диапазоне концентраций нарингенина 2.5–100 нМ [17]. Экзогенный нарингенин в концентрации от 2 до 4 мМ стимулировал скручивание корневых волосков и увеличивал количество образовавшихся клубеньков у гороха. При добавлении 40 мМ нарингенина образование клубеньков ингибировалось [16, 18]. Одной из причин такого разброса данных могла служить способность нарингенина в значительных количествах накапливаться в цитоплазматической мембране *R. leguminosarum* bv. *viciae*, таким образом достигая необходимой эффективной концентрации [17]. В проведенных экспериментах все концентрации нарингенина (500 пМ–1 мкМ) почти не оказывали влияния на численность бактерий в планктонной культуре. Снижение титра *R. leguminosarum* bv. *viciae* на 5 сут, вероятно, связано с влиянием про-



**Рис. 3.** Влияние нарингенина на активность тАЦ (цАМФ, % к контролю) в клетках планктонной культуры (1) и био пленках *R. leguminosarum* bv. *viciae* (2). Контролем служили планктонная культура/био пленки без добавления нарингенина.  $n = 3$ ,  $m \pm S.E.$  \*Различия статистически значимы ( $P \leq 0.05$ ) по двухвыборочному *t*-критерию Стьюдента при сравнении между собой вариантов опыта: с планктонной культурой и био пленкой.



**Рис. 4.** Влияние нарингенина (1, 1 мкМ) и сурамина (2, 500 мкМ) и их смеси (3) на активность тАЦ (цАМФ, % к контролю) планктонной культуры *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Контролем служила планктонная культура без добавок. \*Различия статистически значимы ( $P \leq 0.05$ ) при сравнении вариантов 2 и 3 по *t*-критерию Стьюдента;  $n = 3$ ,  $m \pm S.E.$



дуктов распада нарингенина (рис. 1). В тоже время в биопленках самая низкая концентрация нарингенина (500 пМ) оказывала стимулирующий эффект, в результате чего повышалась плотность пленки, а высокая концентрация существенно снижала ее (рис. 2). Такое воздействие представляется вполне логичным, поскольку эффективность нарингенина как сигнальной молекулы, по-видимому, проявлялось уже в низких концентрациях.

Известно, что рост бактерий как в планктонной культуре, так и в биопленках регулируется различными аутоиндукторами [17]. Но кроме них, важная роль в развитии бактериального сообщества принадлежит и сигнальным молекулам, в том числе цАМФ [20, 21]. Судя по полученным данным, планктонная культура и биопленки значительно различались по концентрации эндогенного цАМФ и нарингенин оказывал определенное влияние на этот показатель. При этом в планктонной культуре под воздействием нарингенина уровень цАМФ возрастал, однако титр практически не менялся, тогда как в биопленках при увеличении концентрации нарингенина их плотность снижалась, а уровень цАМФ возрастал. Это подтверждает существование особенностей воздействия цАМФ на бактерии в различных формах культивирования [22]. Вероятно, нарушение оптимальной концентрации эндогенного цАМФ в биопленках *R. leguminosarum* bv. *viciae*, но не в планктонной культуре, оказывало негативный эффект на их плотность. Это подтверждается данными о влиянии цАМФ на синтез экзополисахаридов бактерий. Эти метаболиты являются неотъемлемой частью матрикса биопленок и нарушение их синтеза отрицательно сказывается на их формировании: цАМФ через ряд каскадных реакций оказывает влияние на индукцию генов LuxS-AI-синтазы, отвечающей за синтез аутоиндуктора – 2-диэфирифурозил-бората и гена *pssA*, кодирующего глюкозил-изопренилфосфаттрансферазу, участвующую в синтезе экзополисахаридов (ЭПС) и в формировании биопленок [20]. Особенно важна роль биопленок на ранних этапах взаимодействия с растениями, потому что в этой форме бактерии более эффективно могут избегать негативного влияния растительных метаболитов, в то же время повышается активность факторов вирулентности [23]. При этом показано, что переход обратимого прикрепления бактерий к необратимому за счет снижения гидрофобности клеток также связан с концентрацией эндогенного цАМФ [23].

Поскольку нарингенин активировал тАЦ, а сурамин, разобщающий связь рецептора с G-белком, ингибировал ее активность, можно предположить, что тАЦ может быть одним из компонентов рецептора к нарингенину у бактерий. Подтверждением этому могут служить данные литературы о том, что у *Sinorhizobium meliloti* при контакте с *Medicago sativa* активируются три рецептороподобные адени-

латциклазы, регулятор транскрипции и целевой ген [5]. Можно предположить, что у бактерий, так же как и у растений [24], тАЦ функционирует в виде многофункциональных молекулярных комплексов, в состав которых входит и рецепторный домен. Несмотря на то, что результаты по ингибированию/активации тАЦ были получены на планктонной культуре, можно считать, что такой же механизм функционирует и в биопленках, поскольку ранее его присутствие также было показано и в биопленках ризобий [25].

Таким образом, можно сделать вывод, что нарингенин через активацию рецептора способен стимулировать ризобияльную тАЦ и, соответственно, влиять на цАМФ-зависимые процессы в биопленках *R. leguminosarum* bv. *viciae*, что расширяет и углубляет современные представления о взаимодействиях между бобовыми и *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вейко А.Г. // Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2020. Т. 19. № 5. С. 27–39.
2. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 1. С. 3–14.
3. Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Рыкун О.В. // Микробиология. 2015. Т. 84. № 4. С. 404–404.
4. Green J., Stapleton M.R., Smith L.J., Artymiuk P.J., Kahramanoglou C., Hunt D.M., Buxton R.S. // Microbiology. 2014. V. 18. P. 1–7.
5. Tian C.F., Garnerone A.M., Mathieu–Demazière C., Masson–Boivin C., Batut J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. № 17. P. 6751–6756.
6. Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W. // Annual Rev. Microbiol. 2002. V. 56. № 1. P. 187–209.
7. Плакунов В.К., Журина М.В., Беляев С.С. // Микробиология. 2008. Т. 77. № 5. С. 581–589.
8. Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V., Dudareva L.V. // Plant Cell Rep. 2011. V. 30. № 1. P. 125–132.
9. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1–2. P. 248–254.
10. Rao J.R., Cooper J.E. // J. Bacteriol. 1994. V. 176. № 17. P. 5409–5413.
11. Деркач К.В., Шнаков А.О., Кузнецова Л.А., Плещева С.А., Успенская З.И., Перцева М.Н. // Цитология. 2002. Т. 44. С. 1129–1133.
12. Dessauer C.W. // Trends Pharmacol. Sci. 1999. V. 20. № 5. P. 205–210.
13. Bundles A.N.V. // Biology of the Rhizobiaceae: International Review Cytology. V. 13. 2013. P. 247.
14. Meneses N., Taboada H., Dunn M.F., Vargas M.D.C., Buchs N., Heller M., Encarnación S. // Archives Microbiol. 2017. V. 199. № 5. P. 737–755.
15. Овцына А.О., Тихонович И.А. // Экологическая генетика. 2004. Т. 2. № 3. С. 14–24.
16. Tsvetkova G., Teofilova T., Georgiev G.I. // Gen. Appl. Plant Physiol. 2006. Special is. P. 67–71.



17. *Recourt K., Van Brussel A.A., Driessen A.J., Lugtenberg B.J.* // J. Bacteriol. 1989. V. 171. № 8. P. 4370–4377.
18. *Novak K., Chovanec P., Škrdleta V., Kropáčová M., Lisá L., Němcová M.* // J. Exper. Bot. 2002. V. 53. № 375. P. 1735–1745.
19. *Fuqua W.C., Parsec M.R., Greenberg E.P.* // Annu. Rev. Gen. 2001. V. 35. P. 439–468.
20. *Ono K., Oka R., Toyofuku M., Sakaguchi A., Hamada M., Yoshida S., Nomura N.* // Microbes Environ. 2014. V. 29. № 1. P. 104–106.
21. *Lory S., Wolfgang M., Lee V., Smith R.* // International J. Medical Microbiology. 2004. V. 293. № 7–8. P. 479–482.
22. *Waters C.M., Bassler B.L.* // Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 2005. V. 21. № 1. P. 319–346.
23. *Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Kuzakova O.V.* // Yale Review Edification Sci. 2015. V. 6. P. 522–539.
24. *Al-Younis I., Moosa B., Kwiatkowski M., Jaworski K., Wong A., Gehring C.* // Frontiers Plant Science. 2021. P. 1709.
25. *Ломоватская Л.А., Гончарова А.М., Макарова Л.Е., Филинова Н.В., Романенко А.С.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 3. С. 313–319.

## Naringenin Modulates Adenylate Cyclase Activity in Planktonic Culture and Biofilm *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

A. M. Goncharova<sup>a, \*</sup>, L. A. Lomovatskaya<sup>a</sup>, and A. S. Romanenko<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (SIFIBR SB RAS), Irkutsk, 664033 Russia

\*e-mail: alvlad87@mail.ru

The effect of naringenin on the growth of plankton culture, biofilm density, and activity of the transmembrane form of adenylate cyclase in the cells of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* has been studied. The studies performed showed that naringenin had practically no effect on the growth of the planktonic culture of these bacteria, while the density of biofilms decreased as the concentration of naringenin increased. It was shown that naringenin activated the transmembrane form of adenylate cyclase in planktonic culture cells and biofilms. Moreover, in the planktonic culture, this effect was more significant. It is assumed that the activation of rhizobial transmembrane adenylate cyclase by naringenin is carried out using a receptor mechanism.

**Keywords:** naringenin, cAMP, adenylate cyclase, biofilm, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

УДК 577.212

## МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ РАСТЕНИЙ ДЛЯ МЕТАГЕНОМНОГО АНАЛИЗА НА ПРИМЕРЕ ВИНОГРАДА *Vitis amurensis* RUPR.

© 2023 г. К. В. Киселев<sup>1</sup>, Н. Н. Нитяговский<sup>1</sup>, О. А. Алейнова<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Федеральный научный центр Биоразнообразия Наземной Биоты Восточной Азии, ДВО РАН, Владивосток, 690022 Россия

\*e-mail: aleynova@biosoil.ru

Поступила в редакцию 04.10.2022 г.

После доработки 16.11.2022 г.

Принята к публикации 29.12.2022 г.

Предложен новый метод выделения ДНК из растений, на примере дикорастущего винограда *Vitis amurensis* Rupr., для дальнейшей подготовки библиотек для метагеномного анализа эндофитов. Метод основан на выделении ДНК недорогостоящим ЦТАБ-методом с дополнительной стадией очистки ДНК с использованием кремнеземных спин-колонок (ЦТАБ-спин метод). Проведен сравнительный анализ результатов метагеномного анализа эндофитов на ДНК, выделенной предложенным ЦТАБ-спин методом и с использованием коммерческого набора ZymoBIOMICS DNA Miniprep (Zymo Research, США). Установлено, что при использовании ЦТАБ-спин метода количество последовательностей участка *16S* рРНК и многообразие родов бактерий было в 2.8 и 1.2 раза больше соответственно, чем при использовании набора ZymoBIOMICS. В то же время, количество последовательностей участка межгенного спейсера *ITS1* и биоразнообразие эндофитных грибов значительно не отличались при экстракции ДНК двумя способами. Таким образом, предложенный метод выделения ДНК для метагеномного анализа является доступной и эффективной альтернативой коммерческим наборам по выделению ДНК растений для методов секвенирования нового поколения.

**Ключевые слова:** виноград, ДНК, метагеном, секвенирование нового поколения, бактерии, грибы, эндофиты, *Vitis amurensis*, NGS

**DOI:** 10.31857/S055510992303011X, **EDN:** BBUGBY

Методы секвенирования нового поколения (next-generation of sequencing, NGS) – это технология массового параллельного секвенирования, обеспечивающая сверхвысокую пропускную способность, масштабируемость и скорость [1]. С помощью NGS миллиарды фрагментов нуклеиновых кислот могут быть секвенированы одновременно и независимо. Технология используется для определения последовательности нуклеотидов в геномах или целевых областях ДНК или РНК. NGS произвела революцию в биологических науках, позволив лабораториям выполнять широкий спектр прикладных задач и изучать биологические системы на новом уровне, который выходит за рамки возможностей традиционных технологий секвенирования ДНК [2].

В последнее десятилетие количество публикаций, где используется секвенирование нового поколения выросло в десятки раз, что говорит о востребованности данного метода в науке. Быстрый прогресс в технологии NGS и одновременное развитие инструментов биоинформатики позволили как малым, так и крупным исследовательским группам создавать *de novo* черновики после-

довательностей генома для любого интересующего организма [3]. Помимо использования NGS для крупномасштабного секвенирования всего генома [4], эти технологии могут быть использованы для высокопроизводительного секвенирования всего транскриптома [5], секвенированием всего экзома [6], направленным или кандидатным секвенированием генов [7, 8], секвенирование метилирования генома [9] и метагеномным NGS (Metagenomic Next Generation Sequencing, mNGS) [10].

mNGS – это секвенирование всех нуклеиновых кислот в образце, который может содержать смешанные популяции микроорганизмов. mNGS позволяет определить какие микробы и в каких пропорциях присутствуют в исследуемых образцах. Возможность секвенирования и идентификации нуклеиновых кислот из множества различных таксонов для метагеномного анализа создает новую мощную исследовательскую платформу, которая может одновременно идентифицировать генетический материал из совершенно разных царств организмов [11]. Применение mNGS обладает широкими возможностями, включая диагностику инфекционных заболеваний, отслеживание вспы-

шек, эпиднадзор за инфекционным контролем, обнаружение мутаций и патогенов, а также изучение сообществ микроорганизмов населяющие различные растения и животных [12, 13].

Как правило, успех выполнения mNGS-секвенирования во многом зависит от качества выделенной ДНК. Для выделения геномной ДНК растений обычно используют дорогостоящие коммерческие наборы, такие как DNeasy Plant Mini Kit (50 образцов, “Qiagen”, Германия) [14], QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (50 образцов, “Qiagen”, Германия) [15], PowerSoil® DNA Isolation Kit (50 образцов, “MoBio Inc.”, США) [16], ZymoBIOMICS DNA miniprep kit (50 образцов, “Zymo Research”, США) [17].

Цель работы – сравнительный анализ эндوفитных сообществ бактерий и грибов дикорастущего винограда *Vitis amurensis* Rupr. с помощью mNGS секвенирования ДНК, выделенной из разных органов винограда с помощью разработанного в данной работе метода и коммерчески-доступного набора ZymoBIOMICS DNA miniprep kit.

## МЕТОДИКА

**Растительный материал и условия поверхностной стерилизации.** Ткани двух лиан дикорастущего винограда *V. amurensis* – молодые стебли длиной 7–8 см с тремя здоровыми листьями и зрелыми ягодами, были отобраны в неохраямой природной зоне в районе г. Владивостока (Россия) в сентябре 2021 г. Образцы растений были доставлены в лабораторию в течение 30 мин.

Образцы винограда промывали под проточной водой с мылом. В стерильных условиях взвешивали 0.2 г каждого органа винограда. Затем взвешенные образцы промывали в 70%-ном этаноле в течение 2 мин, 1 мин в 10%-ном растворе пероксида водорода и затем стерильной водой 5 раз.

**Выделение ДНК.** Для работы использовали образцы винограда *V. amurensis* из двух лиан, собранных в июле и сентябре 2021 г. (всего 4 биологические повторности). ДНК выделяли из 11 образцов винограда (4 образца листа и 4 образца стебля из двух лиан винограда, 2 образца ягоды и 1 образец семян из одной лианы винограда) с помощью ЦТАБ-спин метода и коммерческого набора ZymoBIOMICS DNA miniprep (“Zymo Research”, США). Один биологический эксперимент имел 2 аналитические повторности.

Взвешивали 30, 50 и 100 мг поверхностно стерилизованного образца винограда, переносили его для измельчения в стерильную ступку. Ступки и пестик стерилизовали автоклавированием (121°C, 0.21 МПа, 20 мин).

После измельчения образца в ступке с помощью набора ZymoBIOMICS DNA miniprep выделяли ДНК в соответствии с протоколом произво-

дителя. В случае ЦТАБ-спин метода к измельченному образцу добавляли 800 мкл ЦТАБ-буфера (100 мМ трис pH 7.5, 1.4 М NaCl, 40 мМ ЭДТА pH 7.5, 1% цетилтриметиламмоний бромид, ЦТАБ), перемешивали до однородного состояния и инкубировали в течение 1 ч при 60°C в термостате “Гном” (“ДНК-технология”, Россия). Затем добавляли 300 мкл хлороформа, осторожно перемешивали и центрифугировали в течение 10 мин при 4°C и 16100 g (5415R, “Eppendorf”, Германия). Далее, 420 мкл супернатанта отбирали в отдельные пробирки и добавляли 950 мкл 96%-ного этанола, выдерживали при –20°C в течение ночи, а затем центрифугировали 10 мин при 4°C и 16100 g. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок высушивали до полного испарения этанола при комнатной температуре (30 мин).

Далее осадок растворяли в 100 мкл дистиллированной воды. Важно отметить, что полученный раствор ДНК уже можно использовать для амплификации отдельных генов в случае геноспецифических ПЦР [18] или для изучения метилирования ДНК [19]. Однако попытки использовать ее для получения библиотек участков генов 16S и *ITS1* были безуспешны, мы не наблюдали характерных ПЦР продуктов, поэтому были добавлены стадии очистки ДНК на кремниевых спин-колонках (например, C1002-50 IC-XL, “Zymo Research”). Для одного образца использовали две колонки, на каждую колонку наносили по 50 мкл полученного водного раствора ДНК, центрифугировали 30 с при 4°C и 6900 g. Далее добавляли 200 мкл “Раствора для очистки ДНК” (GuSCN, 5 М; ЭДТА, pH 8.0, 0.1 М) и центрифугировали при тех же условиях. После удаления супернатанта к осадку добавляли 700 мкл промывочного раствора (80%-ный этанол; 10 мМ трис-HCl, pH 7.5) и снова центрифугировали. Следующим шагом переносили колонки в новые 1.5 мл пробирки и центрифугировали 1 мин при 4°C и 6900 g для удаления промывочного раствора. После колонки переносили в новые 1.5 мл пробирки и оставляли на столе при комнатной температуре на 5 мин для испарения остатка промывочного раствора. Далее на первую колонку наносили 50 мкл элюирующего раствора (5 мМ трис-HCl, pH 7.5), инкубировали 1 мин на столе при комнатной температуре и центрифугировали 30 с при 6900 g, затем полученным элюатом (элюирующим раствором, прошедшим через первую колонку) промывали первую колонку еще раз. После первую колонку удаляли и в ту же пробирку ставили вторую колонку, которую промывали полученным элюатом дважды. В результате ДНК с двух колонок была очищена и элюирована в 50 мкл элюирующего раствора.

Качество и количество ДНК оценивали с помощью спектрофотометра P300 (“IMPLEN”, США).

**Подготовка библиотеки и секвенирование.** Образцы ДНК были отправлены в компанию “Евроген” (Россия) для высокопроизводительного секвенирования с использованием технологии Illumina. Библиотеки были подготовлены для секвенирования в соответствии с протоколом, описанным в руководстве “Подготовка библиотеки для метагеномного секвенирования 16S” (часть № 15044223 Rev. B; Illumina). Участки бактериальной 16S рНК амплифицировали с использованием праймеров 515F (5'GGT AAT ACG KAG GKK GCD AGC) и 806R (5'RTG GAC TAC CAG GGT ATC TAA), модифицированных для растений *Vitis* sp. [20]. Участки межгенного спейсера *ITS1* эндофитных грибов амплифицировали с использованием праймеров ITS1f (5'CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A) и ITS2 (5'GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC) [21].

Далее библиотеки очищали и эквимоллярно смешивали с использованием набора нормализующих пластин SequalPrep™ (ThermoFisher, Cat № A10510-01). Контроль качества полученных библиотечных пулов проводился с помощью анализатора фрагментов, а количественный анализ проводился с помощью qPCR.

Пул библиотек секвенировали на Illumina MiSeq (2 × 250 парных концов) с использованием набора реагентов MiSeq v2 (500 циклов). Файлы FASTQ были получены с помощью программного обеспечения для преобразования bcl2fastq v2.17.1.14 (Illumina). Библиотека phage PhiX использовалась для управления параметрами секвенирования. Большинство считываний, относящихся к ДНК фага, были удалены во время демультиплексирования.

Последовательности бактерий и грибов были депонированы в NCBI под регистрационными номерами PRJNA813962 и PRJNA874841, также в базе данных лаборатории биотехнологии Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Россия ([https://biosoil.ru/downloads/biotech/Vitis%20metagenom/2021-09=Vitis\\_amurensis\\_endophytes\\_16s](https://biosoil.ru/downloads/biotech/Vitis%20metagenom/2021-09=Vitis_amurensis_endophytes_16s); [https://biosoil.ru/downloads/biotech/Vitis%20metagenom/2021-09=Vitis\\_amurensis\\_endophytes\\_ITS](https://biosoil.ru/downloads/biotech/Vitis%20metagenom/2021-09=Vitis_amurensis_endophytes_ITS)).

**Вычислительный анализ.** Парные прочтения NGS были предварительно обработаны с использованием программ QIIME 2 [22] и DADA2 [23]. В результате предварительной обработки парные прочтения были объединены, и из данных высокопроизводительного секвенирования были удалены химерные последовательности и оставшиеся последовательности ДНК фага PhiX. Таксономическую идентификацию последовательностей ДНК проводили алгоритмом QIIME 2 Scikit-learn [24] с использованием предварительно обученных классификаторов Silva 138 (99% OTUs из области последовательностей 515F/806R) для эндофитных бактерий

[25] и UNITE (99% OTUs из области последовательностей ITS1f/ITS2) для эндофитных грибов [26]. Далее, из анализа были исключены последовательности хлоропластной и митохондриальной ДНК, не определенные до ранга “отдел” последовательности, и последовательности ДНК, относящиеся к археям и эукариотам.

Полученные данные были обработаны с использованием языка R. Библиотеку phyloseq [27] и пакет tidyverse [28] использовали для предварительной фильтрации и подготовки данных. Таксоны для столбчатой гистограммы и визуализационной диаграммы UpSet были отфильтрованы на основе относительной численности >0.1% для каждого биокомпартамента. На столбчатых графиках объединяли таксономические ранги, которые были относительно малочисленны (<0.1% по каждому фактору), в одну группу, называемую “другие”. Данные о альфа-разнообразии на основе индекса Шеннона и бета-разнообразии на основе статистики “несходство Брея-Кёртиса” были получены с использованием пакета Vegan (доступно онлайн: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>) [29]. Данные о различиях по методу Брея-Кёртиса были преобразованы в равномерную глубину выборки и представлены в виде ординационных диаграмм с помощью метода неметрического многомерного шкалирования (Non-metric multidimensional scaling, NMDS). Для анализа данных альфа-разнообразия между группами был проведен тест суммы рангов Уилкоксона. Статистическая проверка данных о бета-разнообразии была выполнена с использованием теста Permutanova (999 перестановок), включенного в пакет Vegan [29]. Для графического представления результатов использовались библиотеки ggplot2 [28] и ComplexHeatmap [30].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Количество и качество выделенной ДНК.** Первоначально выделяли ДНК из 30, 50 и 100 мг поверхностно стерилизованного листа винограда *V. amurensis* двумя описанными способами. В итоге все пробы ДНК растворяли в 50 мкл элюирующего раствора, поэтому можно напрямую сравнивать как концентрации, так и количества выделенной ДНК разными способами.

Оказалось, что при использовании ЦТАБ-спин метода концентрация и количество выделенной ДНК было в 2.2-3.5 раза выше, чем при использовании ZymoBIOMICS (табл. 1). Более того, в обоих методах навеска 50 мг показала наилучшие результаты, поэтому далее в работе использовали именно 50 мг образца. Затем выделяли ДНК из 50 мг стеблей, ягод и семян винограда и было показано, что также ЦТАБ-спин метод был более эффективен (табл. 1). Важно отметить, что во всех пробах, выделенных ЦТАБ-спин ме-

**Таблица 1.** Концентрация ДНК, выделенной из листьев, стеблей, ягод и семян винограда *Vitis amurensis* разными способами\*

Метод выделения	Орган винограда	Концентрация ДНК, мкг/мкл	Количество ДНК, мкг
30 мг, ZymoBIOMICS	Лист	0.006 ± 0.003 <sup>c</sup>	0.30 ± 0.15 <sup>c</sup>
50 мг, ZymoBIOMICS	Лист	0.012 ± 0.005 <sup>bc</sup>	0.60 ± 0.25 <sup>bc</sup>
50 мг, ZymoBIOMICS	Стебель	0.005 ± 0.002 <sup>c</sup>	0.25 ± 0.10 <sup>c</sup>
50 мг, ZymoBIOMICS	Ягода	0.005 ± 0.003 <sup>c</sup>	0.25 ± 0.15 <sup>c</sup>
50 мг, ZymoBIOMICS	Семена	0.004 ± 0.002 <sup>c</sup>	0.20 ± 0.10 <sup>c</sup>
100 мг, ZymoBIOMICS	Лист	0.007 ± 0.004 <sup>c</sup>	0.35 ± 0.20 <sup>c</sup>
30 мг, ЦТАБ-спин	Лист	0.021 ± 0.005 <sup>ab</sup>	1.05 ± 0.25 <sup>ab</sup>
50 мг, ЦТАБ-спин	Лист	0.026 ± 0.007 <sup>a</sup>	1.30 ± 0.35 <sup>a</sup>
50 мг, ЦТАБ-спин	Стебель	0.028 ± 0.009 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.45 <sup>a</sup>
50 мг, ЦТАБ-спин	Ягода	0.031 ± 0.011 <sup>a</sup>	1.55 ± 0.55 <sup>a</sup>
50 мг, ЦТАБ-спин	Семена	0.030 ± 0.010 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.50 <sup>a</sup>
100 мг, ЦТАБ-спин	Лист	0.024 ± 0.006 <sup>ab</sup>	1.20 ± 0.30 <sup>ab</sup>

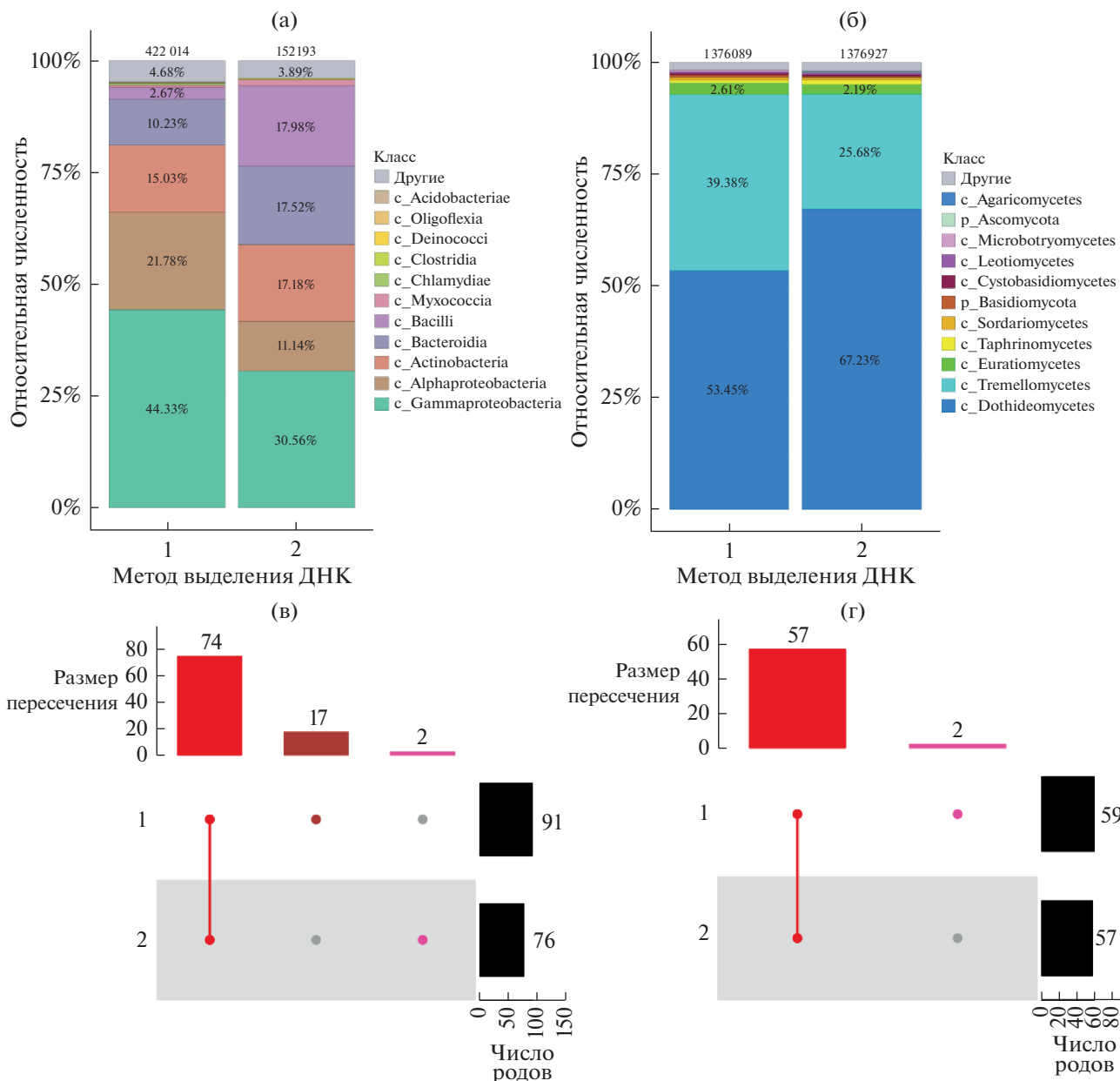
\* Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. Средние значения в столбцах, за которыми следует одна и та же буква, не различались по *t*-критерию Стьюдента.  $p < 0.05$  считали статистически значимым.

тодом и ZymoBIOMICS соотношение поглощения 260/280 было 1.9–2.0, а 260/230 – 0.4–0.6. Известно, что наиболее оптимальным соотношением 260/280 и 260/230 для работы с нуклеиновыми кислотами является 1.8–2.0 и 2.0–2.2 соответственно. Таким образом, оба метода позволяли получить довольно чистые препараты ДНК по примесям белков (260/280), но в образцах ДНК присутствовало довольно много примесей других веществ, поглощающих при 230 нм. Возможно, высокое поглощение при 230 нм объясняется наличием углеводов, что является довольно типичным для работы с растительными тканями. Дополнительная чистка на спин-колонках несколько увеличивала соотношение 260/230, но при этом уменьшалась концентрация ДНК, поэтому в работу решено было взять пробы ДНК без дополнительной очистки.

**Сравнение микробных сообществ в образцах ДНК, выделенных разными способами.** В общей сложности для ампликонов *16S* рРНК и *ITS1* было получено 3108452 и 3559302 парных прочтений со средним значением 282587 и 323573 парных прочтений на образец соответственно. В результате предварительной обработки данных высокопроизводительного секвенирования с помощью программ QIIME 2 и DADA2 для анализа было оставлено в общей сложности 574207 последовательностей *16S* рРНК в 22 образцах. Для *ITS1* после процедур биоинформатического контроля качества было идентифицировано в общей сложности 2753016 последовательностей в 22 пробах (рис. 1).

Согласно сравнительному анализу количество последовательностей *16S* рРНК эндофитных бактерий было в 2 раза больше в образцах, выделен-

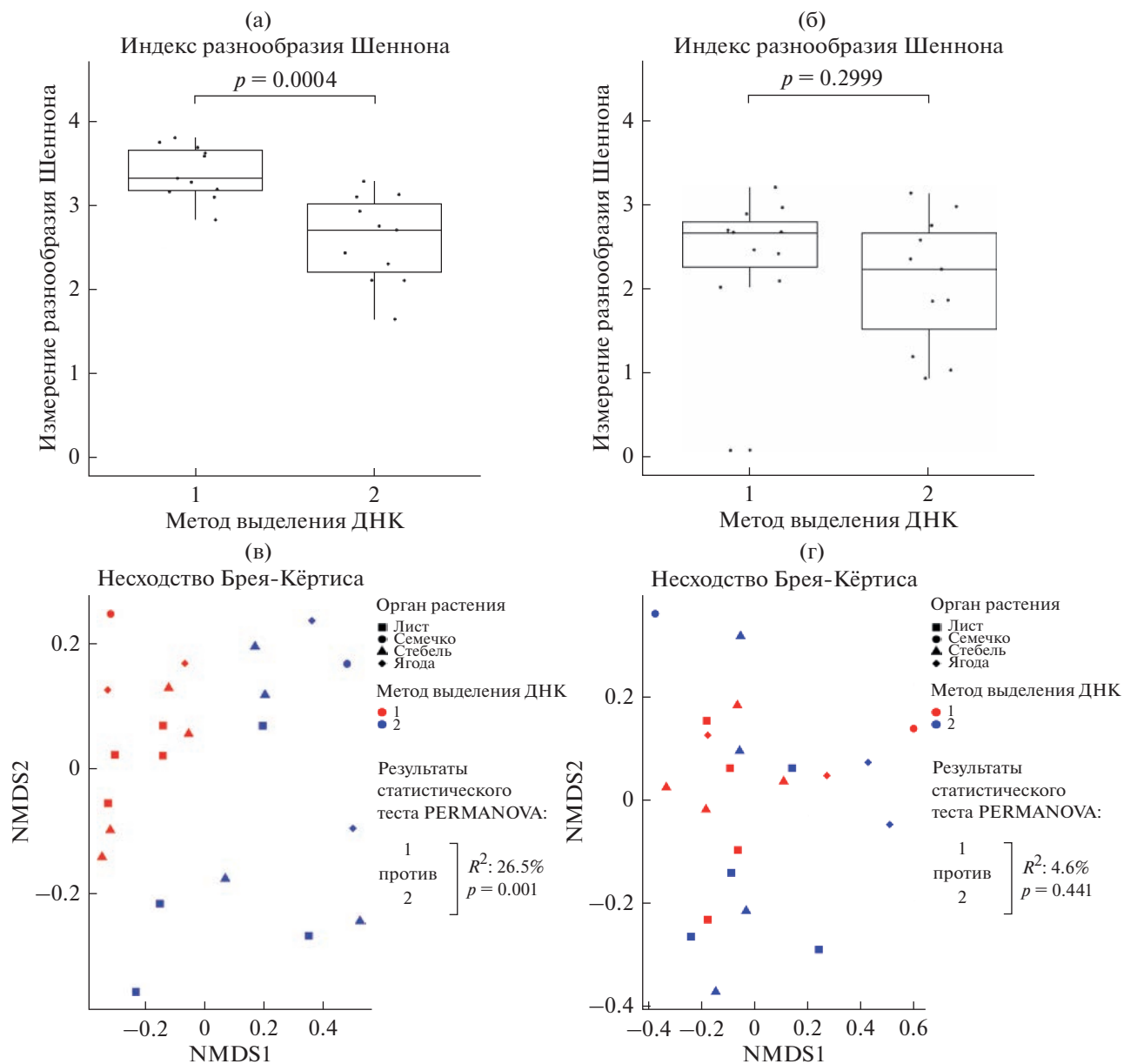
ных ЦТАБ-спин методом (рис. 1а). Сообщество эндофитных бактерий было представлено 11 таксонами уровня класса с относительной представленностью выше 0.1%. В образцах, выделенных двумя способами экстракции ДНК, классы бактерий были одинаковы, но процентное соотношение этих классов значительно варьировалось (рис. 1а). Например, процентное соотношение класса Alphaproteobacteria в образцах, выделенных коммерческим набором, составляло 11%, в то время как в образцах, выделенных ЦТАБ-спин методом – почти 22%. Класс Bacilli в образцах, выделенных при помощи первого способа, был представлен 2.7%, в то время как в образцах, выделенных ZymoBIOMICS DNA miniprep, процентное соотношение этого класса составило 18%. В образцах, выделенных при помощи коммерческого набора, отсутствовали представители трех классов Acidobacteriae, Chlamydiae и Oligoflexia, однако они были идентифицированы в образцах, выделенных предложенным в работе способом, соотношением 0.13, 0.37 и 0.13% соответственно. Кроме того, биоразнообразие родового состава эндофитных бактерий было богаче в образцах, где ДНК была выделена ЦТАБ-спин методом (рис. 1в). При выделении ДНК с помощью коммерческого набора родовой состав эндофитных бактерий был представлен 76 родами, в то время как при выделении ДНК, разработанным нами методом, эндофитное сообщество было представлено 91 родом. 17 родов были уникальными для образцов, выделенных с помощью ЦТАБ-спин метода и 2 рода для образцов, полученных при использовании ZymoBIOMICS DNA miniprep (рис. 1в).



**Рис. 1.** Сравнительный анализ состава эндофитных бактерий (а, в) и грибов (б, г) в результате секвенирования следующего поколения (NGS) образцов, выделенных двумя способами: 1 – методом ЦТАБ-спин и 2 – коммерческим набором ZymoBIOMICS DNA miniprep. Таксономические столбчатые диаграммы уровня класса для состава бактериального и грибного сообщества *Vitis amurensis* (а, б, %); (в, г – количество родов), диаграммы расслоения (UpSet) на уровне рода, изображающие перекрывающиеся таксоны в образцах, выделенных двумя способами (1, 2). Таксоны фильтровали на основе относительной численности >0.1% для каждого биокомпартамента. Отфильтрованные таксоны на столбчатых графиках помещены в категорию “другие” и удалены с диаграммы UpSet. Количество последовательностей ДНК указано над таксономическими столбчатыми участками.

Анализ данных метагеномного секвенирования последовательностей межгенного спейсера *ITS1* эндофитных грибов показал, что экстракция и очистка ДНК обоими способами имеет сходные результаты по количеству последовательностей (1214521 и 1230181 последовательностей) (рис. 16). Процентное соотношение классов эндофитных грибов варьировалось, но не так значительно, как

в случае бактериального сообщества. Класс *Dothideomycetes* в образцах, выделенных ЦТАБ-спин методом, составлял 52% от общей численности эндофитных грибов, в то время как при использовании коммерческого набора процентное соотношение этого класса составило 66% (рис. 16). Процентное соотношение класса *Tremellomycetes* составило 41 и 27% в образцах, выделенных при



**Рис. 2.** Альфа-разнообразие по Шеннону и бета-разнообразию по Брей-Кёртису эндофитных бактерий (а, в) и грибов (б, г) в результате секвенирования следующего поколения (NGS) образцов, выделенных двумя способами: 1 – ЦТАБ-спин методом и 2 – коммерческим набором ZymoBIOMICS DNA miniprep. Данные по бета-разнообразию представлены с помощью неметрического многомерного шкалирования (Non-metric multidimensional scaling, NMDS).

помощи ЦТАБ-спин метода и коммерческого набора соответственно (рис. 1б). В образцах, выделенных при помощи предложенного подхода, были обнаружены грибы рода *Acremonium* и *Acrospertum*, в то время как они не были детектированы в образцах, выделенных при помощи ZymoBIOMICS DNA miniprep (рис. 1г).

Чтобы измерить альфа-разнообразие (то есть локальное разнообразие сообщества), был выполнен расчет двух оценочных показателей: Индекс разнообразия Шеннона и количество родов

бактерий. Согласно данным медианное значение индекса Шеннона, представляющего собой изменение энтропии, которое увеличивается в зависимости от количества родов в образце, было статистически достоверно выше в образцах эндофитных бактерий, ДНК которых выделена с помощью ЦТАБ-спин метода, по сравнению с ДНК, выделенной с использованием коммерческого набора (рис. 2а). В пробах эндофитных грибов значения индекса Шеннона достоверно не отличались при сравнении двух способов выделения ДНК (рис. 2б). Также количество бактериальных и грибных родов,



обнаруженных в образцах, выделенных ЦТАБ-методом с модификациями было выше по сравнению с образцами, полученными с использованием коммерческого набора (рис. 1в, 1г).

Бета-разнообразие (сравнение микробных сообществ на основе их состава) оценивает расстояние или степень несходства между каждой парой образцов. Значения бета-разнообразия были вычислены с использованием статистики “несходство Брея-Кёртиса” и представлены в виде ординационных диаграмм с помощью метода NMDS. На диаграмме бета-разнообразия в образцах эндофитных бактерий пробы в зависимости от выбранной методики выделения ДНК группировались в отдельные кластеры (рис. 2в) и согласно тесту Перманова статистически значимо различались. Однако образцы эндофитных грибов независимо от методики выделения ДНК были расположены в пределах одного кластера, что подтверждало результаты теста Перманова (рис. 2г).

Со стремительным развитием современных технологий секвенирования ДНК все чаще в научных и диагностических целях используются методы секвенирования нового поколения (NGS), которые предъявляют новые высокие требования к количеству и качеству выделенной ДНК.

Сегодня большинство существующих методов выделения ДНК растений не позволяют получить ДНК, пригодную для целей NGS, поэтому в этой работе был модифицирован существующий метод на основе ЦТАБ-экстракции путем добавления дополнительных этапов очистки на спин-колонках или ЦТАБ-спин метод. Себестоимость предложенного в работе подхода по расчетам была в 6 раз и более ниже по сравнению с использованием коммерческими наборами.

Итоговый результат анализа многообразия эндофитных бактерий и грибов на ДНК, выделенной с помощью ЦТАБ-спин метода, показал, что были получены высокие значения количества прочтений и определенных родов, что превышало значения, полученные на ДНК, выделенной с помощью широко известного набора Zymo Research.

\*\*\*

Таким образом, в работе представлен подробный протокол для эффективного выделения ДНК для последующего NGS анализа из клеток растений на основе ЦТАБ-экстракции с последующей очисткой на спин-колонках. Эффективность подтверждена результатами метагеномного анализа с высокими значениями полученных выборок прочтений. Данный протокол будет полезен для исследований в области молекулярной биологии и биотехнологии растений с применением методов NGS.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-74-10001, <https://rscf.ru/project/22-74-10001>.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Behjati S., Tarpey P.S.* // *ADS – Education and Practice*. 2013. V. 98. P. 236–238.
2. *Slatko B.E., Gardner A.F., Ausubel F.M.* // *Current Protocols in Mol. Biol.* 2018. V. 122. P. e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
3. *Kulski J.K.* Next-Generation Sequencing – An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. / Ed. J.K. Kulski. IntechOpen. 2016. P. 60. <https://doi.org/10.5772/61964>
4. *Lam H.Y.K., Clark M.J., Chen R., Chen R., Natsoulis G., O’Huallachain M. et al.* // *Nat Biotechnol.* 2012. V. 30. P. 78–82.
5. *Wang Z., Gerstein M., Snyder M.* // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10. P. 57–63.
6. *Rabbani B., Tekin M., Mahdieh N.* // *J. Hum. Genet.* 2014. V. 59. P. 5–15.
7. *Leo V.C., Morgan N.V., Bem D., Jones M.L., Lowe G.C., Lordkipanidzé M. et al.* // *J. Thrombosis and Haemostasis.* 2015. V. 13. P. 643–650.
8. *Kulski J.K., Suzuki S., Ozaki Y., Mitsunaga S., Inoko H., Shiina T.* Phase HLA Genotyping by NGS – A Comparison Between two Massively Parallel Sequencing Bench-top Systems, the Roche GS Junior and Ion Torrent PGM. / Ed. Y. Xi. IntechOpen. 2014. P. 141–181.
9. *Pelizzola M., Ecker J.R.* // *FEBS Letters.* 2011. V. 585. P. 1994–2000.
10. *Simner P.J., Miller S., Carroll K.C.* // *Clin. Infect. Dis.* 2018. V. 66. P. 778–788.
11. *Boers S.A., Jansen R., Hays J.P.* // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2019. V. 38. P. 1059–1070.
12. *Chiu C.Y., Miller S.A.* // *Nat. Rev. Genet.* 2019. V. 20. P. 341–355.
13. *Iquebal M.A., Jagannadham J., Jaiswal S., Prabha R., Rai A., Kumar D.* // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. P. 708335. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.708335>
14. *Fan Y., Gao L., Chang P., Li Z.* // *Annals of Microbiology.* 2020. V. 70. P. 30. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01574-9>
15. *Cureau N., Threlfall R., Marasini D., Lavefve L., Carbonero F.* // *Microb. Ecol.* 2021. V. 82. P. 845–858.
16. *Marasco R., Rolli E., Fusi M., Michoud G., Daffonchio D.* // *Microbiome.* 2018. V. 6. P. 3. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0391-2>
17. *Deyett E., Rolshausen P.E.* // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 1246. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01246>
18. *Kiselev K.V., Tyunin A.P., Karetin Y.A.* // *Plant Cell Rep.* 2015. V. 34. P. 311–320.
19. *Ogneva Z.V., Dubrovina A.S., Kiselev K.V.* // *Biol. Plant.* 2016. V. 60. P. 628–634.
20. *Aleynova O.A., Nityagovsky N.N., Dubrovina A.S., Kiselev K.V.* // *Plants.* 2022. V. 11. P. 1128. <https://doi.org/10.3390/plants10071276>

21. Deyett E., Rolshausen P.E. // FEMS Microbiol Ecol. 2020. V. 96. P. f1aa053. <https://doi.org/10.1093/femsec/f1aa053>
22. Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith M. et al. Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. P. 852–857.
23. Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J.A., Holmes S.P. // Nat. Methods. 2016. V. 13. P. 581–583.
24. Pedregosa F., Varoquaux G., Gramfort A., Michel V., Thirion B., Grisel O., et al. // J. Machine Learn. Research. 2011. V. 12. P. 2825–2830.
25. Bokulich N.A., Kaehler B.D., Rideout J.R., Dillon M., Bolyen E. et al // Microbiome. 2018. V. 6. P. 90. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>
26. Nilsson R.H., Larsson K.-H., Taylor A.F.S., Bengtsson-Palme J., Jeppesen T.S., Schigel D. et al // Nucleic Acids Research. 2019. V. 47. P. D259–D264.
27. McMurdie P.J., Holmes S. // PLOS ONE. 2013. V. 8. P. e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
28. Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L.D., François R. et al. // J. Open Source Software. 2019. V. 4. P. 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
29. Oksanen J., Blanchet F.G., Friendly M., Kindt R., Legendre P., McGlenn D. et al // Vegan: Community Ecology Package. R Package Version 2.5-7. 2020. Доступно онлайн: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf> (дата обращения 9 января 2023).
30. Gu Z., Eils R., Schlesner M. // Bioinformatics. 2016. V. 32. P. 2847–2849.

## Method of DNA Extraction from Plant for Metagenomic Analysis as Example from Grape *Vitis amurensis* Rupr.

K. V. Kiselev<sup>a</sup>, N. N. Nityagovsky<sup>a</sup>, and O. A. Aleynova<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Federal Scientific Center of the Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Laboratory of Biotechnology, Vladivostok, 690022 Russia

\*e-mail: [aleynova@biosoil.ru](mailto:aleynova@biosoil.ru)

A new method for extracting DNA from plants is proposed, using the example of wild grapes *Vitis amurensis* Rupr., for further preparation of libraries for metagenomic analysis. The method is based on the isolation of DNA by an inexpensive CTAB method with an additional stage of DNA purification using silica spin columns (CTAB spin method). A comparative analysis of the results of metagenomic analysis of endophytes on DNA isolated using the proposed CTAB-spin method and using the commercial set ZymoBIOMICS DNA Miniprep (Zymo Research). It was found that when using the CTAB-spin method, the number of sequences of the 16S rRNA site and the diversity of bacterial genera were 2.8 and 1.2 times greater, respectively, than when using the ZymoBIOMICS kit. At the same time, the number of sequences of the internal transcribed spacer 1 (*ITS1*) and the biodiversity of endophytic fungi did not differ significantly during DNA extraction by two methods. Thus, the proposed method of DNA isolation for metagenomic analysis is an available and effective alternative to commercial kits for the isolation of plant DNA for new generation sequencing methods.

**Keywords:** grapes, DNA, metagenome, new-generation sequencing (NGS), bacteria, fungi, endophytes, *Vitis amurensis*

УДК 602.627

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ БИОБАЛЛИСТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ *Nicotiana tabacum*

© 2023 г. А. А. Давлекамова<sup>1</sup>, А. В. Зубрицкий<sup>1</sup>, Т. А. Тимофеева<sup>1, \*</sup>,  
И. В. Яковлева<sup>1</sup>, А. М. Камионская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Федеральный исследовательский центр  
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

\*e-mail: timofeeva.bio@gmail.com

Поступила в редакцию 15.12.2022 г.

После доработки 09.01.2023 г.

Принята к публикации 10.01.2023 г.

Биобаллистическая трансформация – один из рабочих методов доставки нуклеиновых кислот в растительные клетки. В статье был проведен подбор параметров для работы с генной пушкой “PDS-1000/He Hepta System”. В качестве объекта исследований использовали модельное растение *Nicotiana tabacum*. Маркерным геном служил ген GFP (Green Fluorescent Protein). Были определены оптимальные параметры для трансформации клеток листьев *N. tabacum*: давление разрыва мембраны 1350 psi; размер частиц вольфрама 1.3 мкм; метод очистки плазмидной ДНК – пересаживание этанолом. Полученные результаты будут полезны для разработки протоколов биобаллистической трансформации растительных клеток, включая применение для редактирования генома сельскохозяйственных растений.

**Ключевые слова:** биобаллистика, *Nicotiana tabacum*, трансформация, GFP, PDS-1000/He

**DOI:** 10.31857/S0555109923030054, **EDN:** AZNGOK

Постоянный рост населения планеты и растущая потребность человечества в доступных и качественных продуктах питания, наряду с проблемой нехватки плодородных земель и увеличивающегося антропогенного воздействия на окружающую среду, требуют создания новых сельскохозяйственных растений с улучшенной продуктивностью и повышенной стрессоустойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды. Геномное редактирование открывает новые возможности перед учеными как для изучения генома, функций отдельных генов, а также для получения растений с заданными свойствами.

Биобаллистика или бомбардировка частицами – распространенный метод доставки ДНК непосредственно в растительные клетки, основанный на придании ускорения микрочастицам вольфрама или золота, несущими ДНК, за счет различных способов, включая сжатый гелий [1, 2]. Биобаллистическая трансформация имеет множество преимуществ, таких как простота, возможность совместной трансформации несколькими плазмидами и доставка больших фрагментов ДНК, и успешно используется для редактирования генома сельскохозяйственных культур, особенно слабобовосприимчивых к трансформации с помощью *Agrobacterium*.

Система Bio-Rad PDS-1000/He (Bio-Rad, США) использует гелиевый импульс высокого давления для бомбардировки клеток микронесителями с ДНК-покрытием. Однако пневматический выстрел высокого давления может нести за собой негативные эффекты для хрупких тканей растений. Поэтому параметры применения Bio-Rad PDS-1000/He следует адаптировать в соответствии с конкретными целями.

Цель работы – оптимизация протокола трансформации модельного растения табака *Nicotiana tabacum* методом биобаллистики с помощью генной пушки PDS-1000.

### МЕТОДИКА

**Установка для биобаллистики.** Для проведения биобаллистической трансформации эксплантов *N. tabacum* использовали генную пушку “PDS-1000/He Hepta System”, 450–2200 кПА (“Bio-Rad”, США) [3–5].

**Плазмидная ДНК.** В работе использовали плазмиду pHBT95::sGFP(S65T)-NOS [6], которая была любезно предоставлена Лабораторией стрессоустойчивости растений ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии (Россия).

Выделение плазмидной ДНК осуществляли с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (“Thermo Scientific”, Литва) в соответствии с указанным в инструкции производителя протоколом. После выделения на спин-колонках плазмиды пересаждали 80%-ным этанолом или ПЭГ/MgCl<sub>2</sub> (10% PEG 6000: MgCl<sub>2</sub> 10 mM) [7].

**Растительный материал.** Растения табака *N. tabacum* выращивали в климатической камере *in vitro*. Для этого семена табака стерилизовали промыванием в 75%-ном этаноле, далее выдерживали в 2%-ном растворе гипохлорита натрия в течение 3 мин и троекратно промывали стерильной дистиллированной водой. Семена проращивали в чашках Петри в стерильных условиях на агаризованной среде Мурасиге–Скуга (МС). После прорастания растения переносили в индивидуальные контейнеры с агаризованной средой МС и выращивали в течение 6 недель в климатической камере при температуре воздуха 21°C с 16-часовым фото-периодом.

Для проведения каждого эксперимента использовали растения 6-недельного возраста, от каждого растения отбирали как молодые, так и старые листья. Перед биобаллистической обработкой контейнеры открывали в ламинарном боксе и скальпелем отрезали выбранные листья в стерильных условиях. Экспланты помещали на чашки Петри с агаризованной средой МС и переносили к месту проведения эксперимента.

**Биобаллистическая трансформация.** Подготовку микрочастиц для биобаллистики, подготовку оборудования к обстрелу и нанесение ДНК на микрочастицы осуществляли как описано в технической документации производителя (PDS-1000/He Biolistic Delivery System, Instruction Manual), составленной по данным исследований Сэнфорда и Гордона–Камма [8, 9], и с учетом поставленной в исследовании задачи.

Навеску микрочастиц массой 30 мг помещали в пробирку объемом 1.5 мл и после добавления 1 мл 70%-ного этанола интенсивно перемешивали в течение 3–5 мин с использованием мини-центрифуги вортекс при скорости 2800 g (BioSan Combi-Spin FVL-2400n, Латвия), затем отстаивали 15 мин для осаждения и удаляли супернатант после центрифугирования (в течение 5 с на вортексе). Осажденные частицы трижды промывали стерильной дистиллированной водой (объемом по 1.0 мл), каждый раз перемешивая и отстаивая в течение 1 мин. Осажденные частицы суспендировали в 500 мкл стерильного 50%-ного глицерина, а затем распределяли в пробирки (объемом 1.5 мл) по 50 мкл суспензии частиц, обеспечивая их равномерное распределение за счет периодического вортексирования.

Основная задача подготовки оборудования к работе состояла в обеспечении стерильности всех

деталей генной пушки. Стерилизацию экрана, останавливающего мембраны при выстреле (Stopping screen), а также ряда деталей, в частности: держателя прорывающейся мембраны (Rupture Disk Retaining Cap); держателя макроносителей, на который нанесены микрочастицы для стрельбы (Macrocarrier holder), вместе с помещенными в него макроносителями, — осуществляли автоклавированием обернутых в фольгу деталей. Пюльчку для установки образца и камеру для стрельбы стерилизовали 70% этанолом, а прорывающую мембрану — быстрым погружением в 70%-ный изопропанол непосредственно перед установкой в генную пушку.

Для одного семизарядного выстрела наносили выделенную плазмидную ДНК на подготовленные микрочастицы следующим образом. К суспензии микрочастиц (50 мкл) добавляли 5 мкл ДНК (в концентрации 1.0 мкг/мкл), 50 мкл CaCl<sub>2</sub> (2.5 M), перемешивали 2–3 мин, отстаивали при комнатной температуре (1 мин) и центрифугировали (2 с). Полученные микрочастицы затем последовательно обрабатывали 70%-ным суперчистым этанолом (140 мкл) и после центрифугирования отбирали супернатант, который обрабатывали 100%-ным суперчистым этанолом (140 мкл), центрифугировали и отбирали супернатант. Полученные микрочастицы с осажденной на них ДНК ресуспендировали в 100%-ном этаноле (48 мкл) и наносили на мембраны макроносителей, помещенные в держателе. Держатель на стерильной фильтровальной бумаге предварительно помещали на абсолютно сухой CaCl<sub>2</sub> для обеспечения высыхания суспензии после нанесения. На каждый макроноситель наносили по 6 мкл подготовленных микрочастиц, с нанесенной на них плазмидной ДНК, и распределяли по площади 1 см<sup>2</sup> в центре макроносителя. Пипетирование проводили максимально быстро, чтобы не допустить осаждения микрочастиц. Процесс нанесения частиц проводили в ламинарном боксе для обеспечения стерильности.

Во всех экспериментах концентрация плазмидной ДНК составляла 1000 нг/мкл, расстояние от мембран с микрочастицами до растительного материала 9 см. В работе использовались микрочастицы вольфрама следующих размеров: 0.7, 1.1, 1.3, 1.7 мкм. В экспериментах по изучению влияния величины давления и метода очистки плазмидной ДНК в качестве носителя использовались вольфрамовые частицы диаметром 1.3 мкм.

Микроскопирование образца проводилось через 4 дня после обстрела с помощью Leica MZ FL III Fluorescence Stereo Microscope (“Leica Microsystems”, Германия) под наборами фильтров GFP Plant — возбуждение флуоресценции длинной волны 470, наблюдение в диапазоне 40 нм, и GFP2 — возбуждение флуоресценции длиной волны 425, наблюдение в диапазоне 60 нм.

**Таблица 1.** Количество успешно трансформированных клеток в образцах эксперимента по изучению влияния величины давления на эффективность трансформации

Варианты опыта	Величина давления, psi		
	1350	1100	1350 (контроль)
Одиночные успешно трансформированные клетки, шт	48	18	0
Скопления успешно трансформированных клеток, шт	3	0	0

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Влияние величины давления на эффективность трансформации.** Плазмидная ДНК несущая ген, кодирующий GFP, была предварительно очищена методом переосаждения этанолом. В эксперименте использовали два варианта величины давления гелия на разрывную мембрану: 1350 и 1100 psi, контрольный вариант опыта (стрельба “пустыми” микрочастицами, без плазмидной днк) проводился при давлении 1350 psi.

Чтобы сравнить результаты стрельбы, мы сделали по 10 снимков каждого образца на увеличении  $\times 5$  и посчитали количество трансформированных клеток, попавших в поле зрения.

В результате трансформации листовых эксплантов *N. tabacum* на третий день наблюдали наибольшее количество трансформированных клеток в варианте с давлением 1350 psi. Исходя из полученных результатов (табл. 1, рис. 1), давление 1350 psi было наиболее подходящим для трансформации эксплантов *N. tabacum* с использованием Bio-Rad PDS-1000/He, хотя давление 1550 psi также приводило к удовлетворительным результатам.

**Влияние давления и метода очистки на эффективность трансформации.** Экспланты *N. tabacum* подвергали бомбардировке при 1350 и 1550 psi частицами, покрытыми ДНК, очищенной с использо-

ванием переосаждения этанолом или PEG/MgCl<sub>2</sub> и переосаждения этанолом (табл. 2, рис. 3).

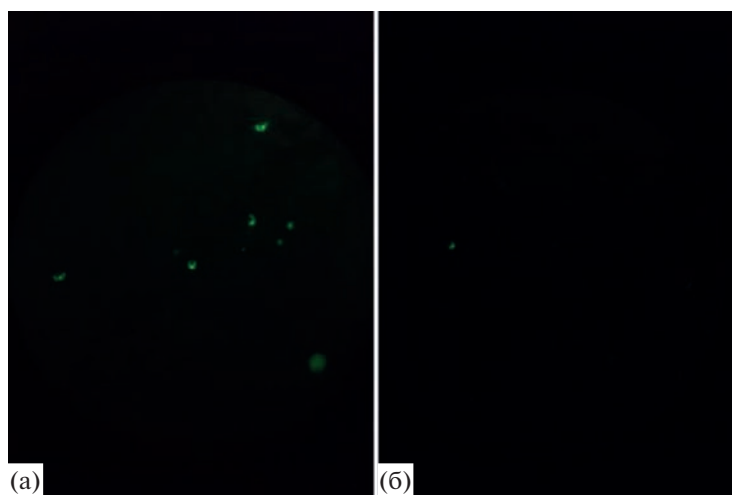
Результаты показали, что использование ДНК, очищенной переосаждением этанолом, дает большее количество успешно трансформированных клеток по сравнению с PEG/MgCl<sub>2</sub> с последующим переосаждением этанолом.

**Эффективность трансформации в зависимости от размера частиц.** Далее исследовали влияние размера микрочастиц (вольфрама) на трансформацию эксплантов *N. tabacum* с использованием давления 1350 psi и повторного осаждения ДНК этанолом, а также с использованием микрочастиц вольфрама следующих размеров: 0.7, 1.1, 1.3, 1.7 мкм.

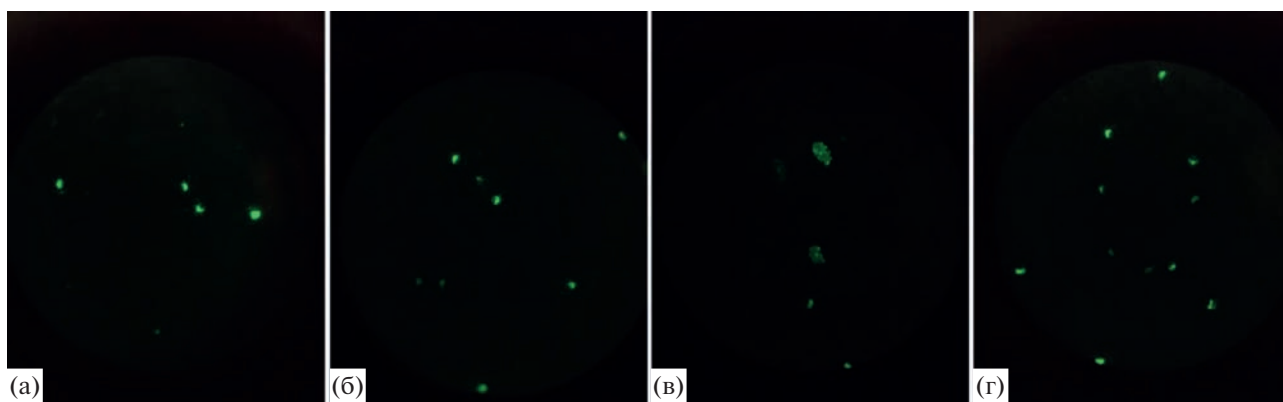
Результаты показали, что оптимальный размер микрочастиц вольфрама для трансформации *N. tabacum* составлял 1.3 мкм (табл. 3, рис. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

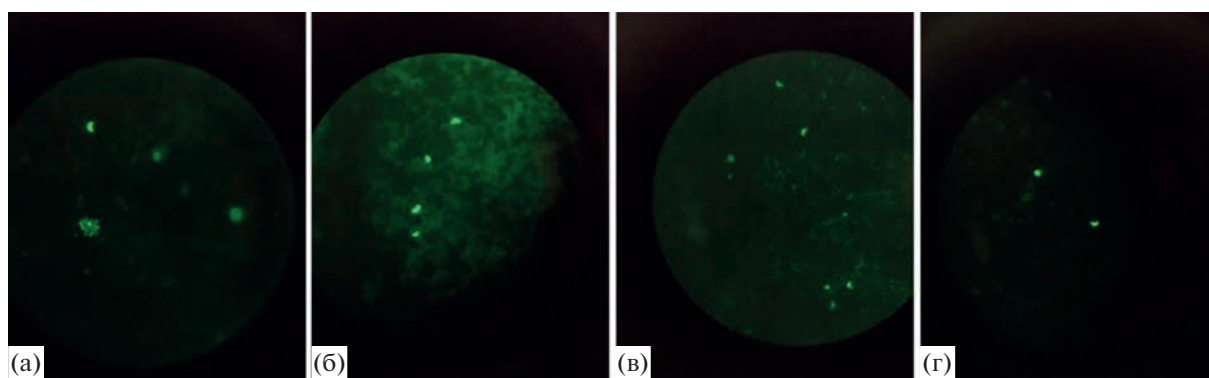
Опубликовано значительное количество работ, описывающих отработку протокола биобаллистической трансформации для различных видов растений [3–5]. Большинство экспериментов было проведено с использованием генной пушки PDS-1000, Bio-Rad. Можно привести пример ра-



**Рис. 1.** Изображение успешно трансформированных клеток *N. tabacum* с транзиторной экспрессией гена GFP, pNBT95::sGFP(S65T)-NOS, фильтр GFP Plant, давление 1350 (а), 1100 psi (б). Увеличение  $\times 5$ .



**Рис. 2.** Изображение успешно трансформированных клеток *N. tabacum* с транзиторной экспрессией гена GFP в эксперименте по определению оптимального давления выстрела, рНВТ95::sGFP(S65T)-NOS, фильтр GFP Plant, давление 1350 psi, этанол (а), 1350 psi, PEG, MgCl<sub>2</sub> и этанол (б), 1550 psi, этанол (в), 1550 psi, PEG, MgCl<sub>2</sub> и этанол (г). Увеличение  $\times 5$ .



**Рис. 3.** Изображение успешно трансформированных клеток *N. tabacum* с транзиторной экспрессией гена GFP в эксперименте по определению оптимального размера микрочастиц вольфрама, рНВТ95::sGFP(S65T)-NOS, фильтр GFP Plant, размер частиц 0.7 (а), 1.1 (б), 1.3 (в), 1.7 мкм (г). Увеличение  $\times 5$ .

боты, в которой в 1996 г. с помощью биобаллистического метода была трансформирована клеточная культура риса *Pusa basmati* для придания культуре устойчивости к гербициду. Кроме того, была использована система детекции успешности

трансформации GUS [3]. Обстрел производился при давлении 1500 psi микрочастицами размером около 1 мкм, а параметры, такие как материал частиц (золото и вольфрам), расстояние до поверхности эксплантов (9 и 12 см), менялись для подбора

**Таблица 2.** Количество успешно трансформированных клеток в образцах при изучении влияния давления и метода очистки на эффективность трансформации

Вариант	Способ очистки плазмидной ДНК				
	без очистки	пересаживание этанолом	PEG и MgCl <sub>2</sub> , пересаживание этанолом	пересаживание этанолом	PEG и MgCl <sub>2</sub> , пересаживание этанолом
Давление, psi	1350	1350		1550	
Одиночные успешно трансформированные клетки, шт	0	57	44	43	40
Скопления успешно трансформированных клеток, шт	0	3	2	1	0

**Таблица 3.** Количество успешно трансформированных клеток в образцах эксперимента при изучении эффективности трансформации в зависимости от размера частиц

Вариант опыта	Микрочастицы вольфрама, мкм			
	0.7	1.1	1.3	1.7
Одиночные успешно трансформированные клетки, шт	15	27	50	12
Скопления успешно трансформированных клеток, шт	2	0	1	1

оптимальных. В результате опытов оптимальным было признано использование золотых частиц, эффективность которых была в 2.5–5.4 раз больше, чем у вольфрамовых, и расстояние от макроносителей до трансформируемого образца – 9 см [3].

При величине давления, используемого в упомянутом исследовании (1550 psi), в настоящей работе также были получены неплохие результаты, однако для растения *N. tabacum* оптимальным оказалось давление 1350 psi. В исследовании было также выбрано расстояние до эксплантов 9 см, так как при меньшем расстоянии микрочастицы не распределялись равномерно по обстреливаемой площади. Оптимальный размер частиц для трансформации *N. tabacum* оказался больше, чем для риса *P. basmati*.

В более позднем исследовании эмбрионы пшеницы *Triticum aestivum* L. трансформировали системами, содержащими кодирующие репортерные гены GUS и GFP. Были испытаны частицы золота размером 0.4–1.2 мкм и давление в установке 450, 650, 950 и 1100 psi, обстрел производился на расстоянии 9 см. Давления 650 и 950 psi представлялись исследователями как оптимальные для трансформации незрелых зародышей пшеницы. Оптимальный размер частиц золота составлял 0.6 мкм [4].

При исследовании биобаллистической трансформации *Triticum aestivum* [5] авторы определяли, какой метод нанесения ДНК на микрочастицы более эффективен – PEG/Mg<sup>2+</sup> или Spd/Ca<sup>2+</sup> (с использованием спермидина). Обработка также проводилась золотыми частицами размером 0.6 микрона с расстояния 6 см при давлении 900 psi. Использование PEG/Mg<sup>2+</sup> было более эффективным, но результаты трансформации с помощью Spd/Ca<sup>2+</sup> сильно различались в зависимости от количества спермидина.

В одной из последних работ изучалась трансформация перца *Capsicum frutescens* L. плазмидой с системой детекции, основанной на экспрессии белка GFP (Green Fluorescent Protein). Бомбардировку проводили микрочастицами золота 0.6, 1.0 и 1.6 мкм на расстоянии 3, 6 и 9 см от макроносителей до эксплантов при 900, 1100 и 1350 psi. По результатам исследований оптимальное сочетание параметров было установлено для стрельбы с

расстояния 6 см частицами размером 1.6 мкм при давлении 1350 psi [10].

В отличие от исследований оптимальных параметров протокола биобаллистической трансформации для различных растений, которые были проведены ранее, в настоящем исследовании для доставки генетического материала в клетку использовались только вольфрамовые микрочастицы. В связи с трудностями доставки золотых частиц, вольфрамовые микрочастицы оказались более доступными и экономически выгодными носителями плазмидной ДНК для трансформирования растений.

Также в работе использовалась система детекции на основе временной экспрессии белка GFP с плазмидой pHBT95::sGFP(S65T)-NOS. Использование этой конструкции позволило фиксировать результаты трансформации через 4 дня после проведения обработки без необходимости извлекать растение из стерильных условий. Такой подход ускоряет работу с трансформированными эксплантами и анализ результатов, а, кроме того, позволяет проводить обстрел целых растений в условиях *in vitro*, предотвращая их гибель и позволяя проводить дальнейшие наблюдения за их развитием.

\*\*\*

Биобаллистическая трансформация растений – перспективное направление генной инженерии, значительно расширяющее возможности исследований, т. к. позволяет трансформировать растения, не поддающиеся классической агробактериальной трансформации.

Экспериментально подтверждено, что оптимальные параметры биобаллистической трансформации на установке “PDS-1000/He Hepta System” для модельного растения *N. tabacum* следующие: давление – 1350 psi, расстояние от макроносителей до образца – 9 см, размер вольфрамовых микрочастиц – 1.3 мкм, очистка после выделения на спин-колонках – переосаждение этанолом.

Полученные результаты будут использованы для дальнейшей отработки методики биобаллистической трансформации модельного растения *N. tabacum*, а также других видов растений. В дальнейшем планируется проведение экспериментов по



расширению перечня носителей и трансформированных видов растений, особенно, культур сельскохозяйственного значения, что позволит реализовать разработанный протокол в фундаментальных и прикладных исследованиях.

Авторы выражают благодарность Лаборатории стрессоустойчивости растений ВНИИ Сельскохозяйственной биотехнологии (Россия) за предоставленную плазмиду рНВТ95::sGFP(S65T)-NOS.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sanford J.C.* // Trends Biotechnol. 1988. V. 6. P. 299–302.  
[https://doi.org/10.1016/0167-7799\(88\)90023-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(88)90023-6)
2. *Hansen G., Wright M.S.* // Trends Plant Sci. 1999. V. 4. P. 226–231.  
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01412-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01412-0)
3. *Jain R.K., Jain S., Wang B., Wu R.* // Plant Cell Rep. 1996. V. 15. № 12. P. 963–968.  
<https://doi.org/10.1007/BF00231597>
4. *Sparks C.A., Jones H.D.* // Meth. in Mol. Biol. 2009. V. 478. P. 71–92.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-59745-379-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-379-0_4)
5. *Ismagul A., Yang N., Maltseva E., Iskakova G.* // Plant Biol. 2018 V. 18. P. 135–143.  
<https://doi.org/10.1186/s12870-018-1326-1>
6. *Zhang J., Du H., Chao M., Yin Z., Yang H., Li Y., Huang F., Yu D.* // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 628.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00628>
7. *Аукенов Н.Е., Масабаева М.Р., Хасанова У.У.* // Наука и Здравоохранение. 2014. № 1. С. 51–53.
8. *Gordon-Kamm W.J., Spencer T.M., Mangano M.L., Adams T.R.* // The Plant Cell. 1990. V. 2. P. 603–618.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.2.7.603>
9. *Sanford J.C., Smith F.D., Russell J.A.* Meth. in Enzymol. 1993. V. 217. P. 483–509.  
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)17086-K](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)17086-K)
10. *Chee M.J.Y., Lycett G.W., Chin C.F.* // Electronic J. Biotechnol. 2018. V. 34. 51–58.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.05.005>

### Optimization of Biolistic Transformation Parameters for *Nicotiana tabacum*

A. A. Davlekamova<sup>a</sup>, A. V. Zubritsky<sup>a</sup>, T. A. Timofeeva<sup>a</sup>\*, I. V. Yakovleva<sup>a</sup>, and A. M. Kamionskaya<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Skryabin Institute of Bioengineering, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

\*e-mail: timofeeva.bio@gmail.com

Biolistics is one of the widely used methods to deliver nucleic acids into plant cells. In this work, we optimized the protocol for biolistic transformation of *Nicotiana tabacum* with the gene gun PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System. The Green Fluorescent Protein (GFP) gene was used as a marker. The optimal parameters for the transformation of *N. tabacum* leaf cells were determined as: pressure, 1350 psi; tungsten particle size, 1.3 µm; plasmid DNA purification method, ethanol re-precipitation. The results should be useful for the development of biolistic transformation protocols for plant cells, including application for plant genome editing of agricultural species.

**Keywords:** Biolistic transformation, *Nicotiana tabacum*, GFP, Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System

УДК 579.6:53.087.4

## ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ СЕНСОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПРИСУТСТВИЯ БАКТЕРИЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

© 2023 г. А. Н. Лачинов<sup>1</sup>, А. А. Лачинов<sup>1</sup>, Д. Д. Карамов<sup>1</sup>, А. Ф. Галиев<sup>1</sup>,  
Е. В. Кузина<sup>2</sup>, Т. Ю. Коршунова<sup>2</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт физики молекул и кристаллов УФИЦ РАН, Уфа, 450075 Россия

<sup>2</sup>Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, 450054 Россия

\*e-mail: korshunovaty@mail.ru

Поступила в редакцию 06.12.2022 г.

После доработки 09.01.2023 г.

Принята к публикации 10.01.2023 г.

Проведено исследование отклика сенсорного элемента на основе полидифениленфталата на изменение состава воздушной среды при культивировании бактерий *Enterobacter asburiae* UOM 3 в жидкой питательной среде. Регистрацию изменения сопротивления сенсорного элемента в ответ на выделяемые бактериальными клетками летучие органические соединения проводили путем измерения вольт-амперных характеристик через заданные промежутки времени. Результаты показали взаимосвязь между количеством бактерий и изменением сопротивления сенсорного элемента, обусловленное выделением продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. При увеличении титра бактерий на 3 порядка сопротивление сенсора под воздействием накопленных в среде летучих органических соединений уменьшилось на 2 порядка. Предполагается, что сенсоры на основе полидифениленфталата могут использоваться для установления наличия микроорганизмов в различных материалах и средах.

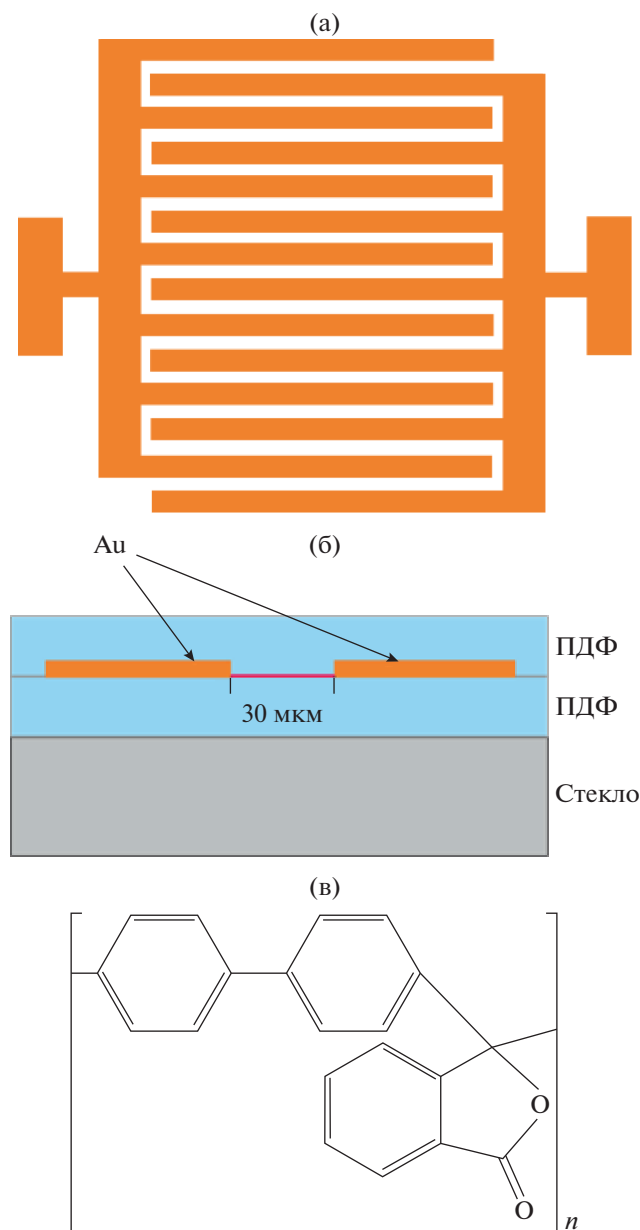
**Ключевые слова:** летучие органические соединения, сенсорный элемент, полидифениленфталат, вольт-амперные характеристики, *Enterobacter*

**DOI:** 10.31857/S0555109923030121, **EDN:** BEFAWD

Микроорганизмы являются наиболее распространенными в биосфере и ключевыми участниками углеродного цикла, а также связанных с ним биологических реакций. Они способны синтезировать большое количество различных летучих неорганических и органических веществ. Летучие органические соединения (ЛОС), выделяемые бактериями, относятся к широкому кругу химических классов соединений, таких как спирты, углеводороды, карбонильные, ароматические, серо- и азотсодержащие соединения и др. [1, 2]. ЛОС обладают уникальными физико-структурными особенностями. Это небольшие молекулы (<300 Да) с высоким давлением паров при комнатной температуре окружающей среды, имеющие одну или несколько функциональных групп. Способность микроорганизмов выделять ЛОС долго игнорировалась, но в настоящее время уделяется большое внимание изучению их влияния как на организм человека, так и на экосистему, на которую они могут оказывать как благотворное, так и пагубное воздействие [3, 4].

В последнее десятилетие ведутся научные исследования по разработке эффективных диагностических инструментов, направленных на выявление бактерий по продуктам их жизнедеятельности в условиях, приближенных к реальному времени. Так, обнаружение ЛОС, выделяемых микроорганизмами, позволило бы проводить не инвазивное тестирование на присутствие бактерий при токсикологическом анализе среды, диагностике заболеваний или исследовании биологических процессов.

Самыми точными системами распознавания ЛОС считаются газовая хроматография и масс-спектрометрия [5, 6]. Однако для мониторинга в режиме реального времени актуальны потенциально недорогие интеллектуальные системы газовых сенсоров, состоящих из матриц на основе оксидов металлов, органо-неорганических наноконструкций и органических материалов, принцип действия которых заключается в измерении сопротивления чувствительного элемента в газовой среде, состав которой меняется в процессе метаболизма бактерий [7–9].



**Рис. 1.** Схематическое изображение встречно штырьковой системы электродов СЭ (а), поперечная проекция СЭ (б) и структурная формула ПДФ (в). Красной линией выделена квантоворазмерная структура, сформированная вдоль границы раздела двух полимерных пленок.

Одним из перспективных направлений создания чувствительных элементов для подобных сенсоров является разработка многослойных гетероструктур, содержащих квантоворазмерные структуры с квазидвумерным электронным газом. Аномальная подвижность электронов в таких структурах способна обеспечивать высокую чувствительность электропроводности к изменению состава окружающей газовой среды. Относитель-

но недавно такие гетероструктуры были созданы на основе полимерных диэлектриков [10, 11].

Цель работы – исследование изменения электрофизических свойств многослойной гетероструктуры на основе полимерных материалов при выделении ЛОС бактериальными клетками в процессе их культивирования в жидкой питательной среде.

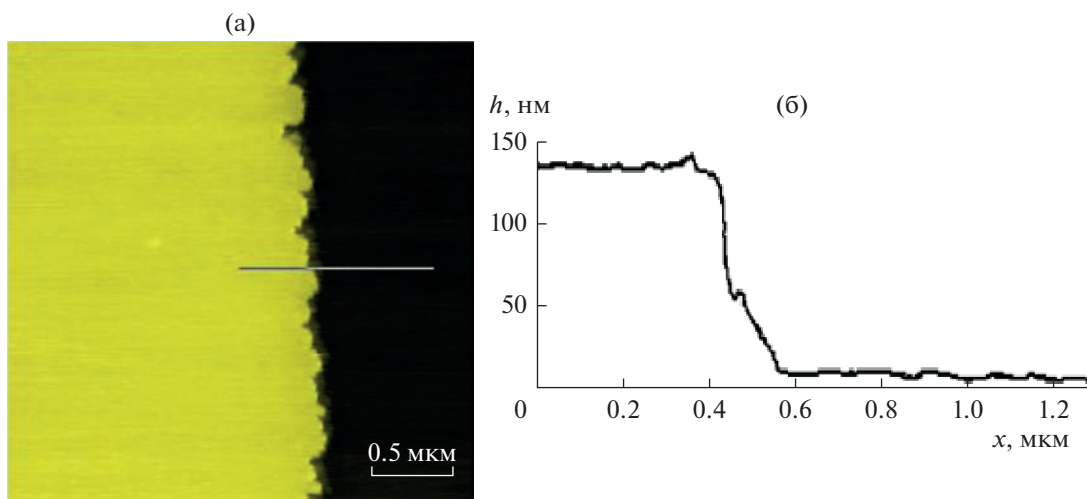
## МЕТОДИКА

**Устройство сенсорного элемента.** Сенсорный элемент (СЭ) представлял собою многослойную структуру, состоящую из двух полимерных слоев со встроенной в границу раздела систему встречно штырьковых металлических электродов (рис. 1). Площадь СЭ составляла  $20 \times 20$  мм. Выбор структуры обусловлен уникальными электропроводящими свойствами границы раздела двух полимерных диэлектриков [11].

В качестве функционального материала для СЭ использовали полимер из класса полигетероариленов (рис. 1в) – полидифенилфталид (ПДФ) [12]. ПДФ является химически стойким полимером с высокой газопроницаемостью углекислого газа и кислорода [13].

Изготовление экспериментального образца происходило в следующей последовательности. На поверхность очищенной и обезжиренной стеклянной подложки методом центрифугирования (СМ-50, “ELMI”, Латвия, при 2000 g) наносили тонкий слой ПДФ (10 вес. %), растворенного в циклогексаноне, время формирования пленки 30 с, толщина слоя  $\sim 1$  мкм. Сушка полимерной пленки для удаления остатков растворителя проходила в 2 стадии: 30 мин на открытом воздухе и 45 мин в вакуумном сушильном шкафу при температуре  $150^\circ\text{C}$ . Далее поверх первого полимера формировали золотые электроды толщиной  $\sim 130$  нм с зазором между электродами  $\sim 30$  мкм через теневую маску методом вакуумного термодиффузионного испарения [12]. Аналогично наносили второй слой полимера. Толщину функциональных слоев и морфологию поверхности контролировали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) с помощью сканирующего зондового микроскопа СММ-2000 (“Завод ПРОТОН”, Россия). Типичное АСМ-изображение участка поверхности СЭ представлено на рис. 2.

**Штамм микроорганизмов.** В работе использовали штамм *Enterobacter asburiae* УОМ 3 из коллекции микроорганизмов Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Выбор микроорганизма обусловлен тем, что энтеробактерии распространены повсеместно, они могут обитать как в свободном состоянии (в реках, сточных водах, на поверхности растений), так и внутри организма человека и животных. Это подвижные грамотрицательные неспорообразующие палочковидные бактерии, факульт-



**Рис. 2.** АСМ-изображение границы раздела электрод-полимерная пленка без верхнего слоя полимера: морфология поверхности, где светлый участок – электрод, темный – поверхность полимерной пленки (а), профиль поверхности вдоль измерительной линии, приведенной на (а), где  $h$  – высота,  $x$  – длина профиля (б).

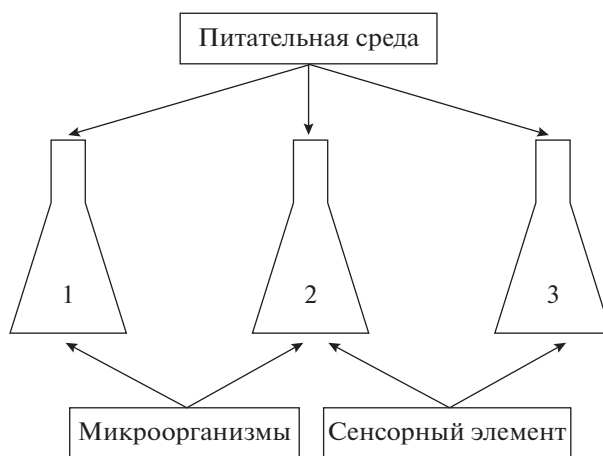
тативные анаэробы, ферментирующие D-глюкозу и другие углеводы с образованием кислоты и газа, что служит одним из их диагностических признаков [14]. Представители рода *Enterobacter*, относящиеся к группе кишечной палочки, являются основными санитарно-показательными микроорганизмами, превышение численности которых в организме человека или в пищевых продуктах свидетельствует о биологическом загрязнении [15].

**Детекция бактериальных ЛОС.** Для выращивания *E. asburiae* UOM 3 использовали среду, следующего состава (г/л):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2.0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.5;  $\text{NaCl}$  – 2.0;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – следы;  $\text{CaCO}_3$  – 4.0; глюкоза – 10.0. Среду разливали по 100 мл в одинаковые колбы ( $V = 250$  мл), которые в дальнейшем герметично закрывали резиновыми пробками. Бактериальную суспензию готовили путем смыва клеток стерильной водопроводной водой со свежего косяка культуры. Среду в серии под номером 1 и 2 инокулировали суспензией штамма *E. asburiae* UOM 3 в количестве 1 об. %. К пробкам колб серии № 2 и 3 прикрепляли СЭ (на расстоянии 3 см от поверхности питательной среды) для регистрации изменения состава воздушной среды. Культивирование проводили при температуре 27–29°C, естественном освещении в стационарных условиях в течение 96 ч. Общая схема эксперимента представлена на рис. 3.

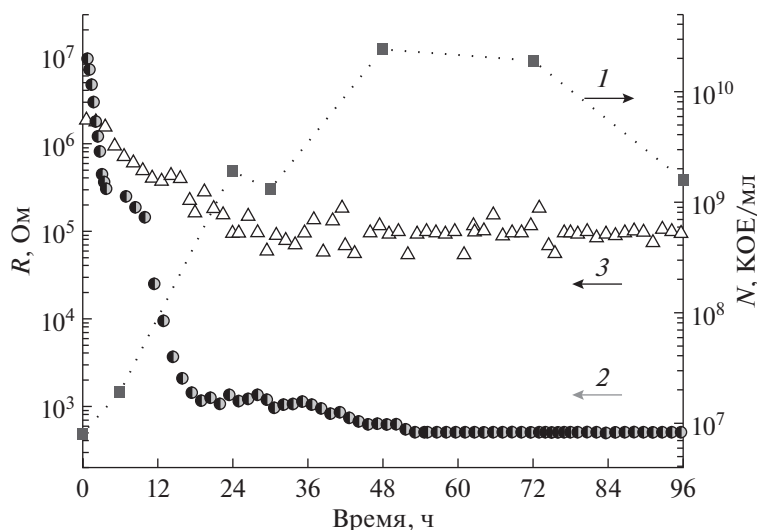
Колбы серии № 1 использовали для контроля жизнедеятельности микроорганизмов путем учета их численности микробиологическим методом, а колбы серии № 2 – электронным методом за счет измерения показаний СЭ. Для оценки вклада ЛОС в измеряемый сигнал СЭ на фоне высокой влажности внутри колб проводили сравнение показаний СЭ в колбах серий № 2 и 3.

В начале эксперимента и далее через 6, 24, 30, 48, 72 и 96 ч отбирали по 1 мл жидкости из колб серии № 1 (без СЭ) и делали ряд последовательных разведений жидкой культуры бактерий. Далее проводили посев на твердую питательную среду следующего состава (г/л): пептон – 10.0; дрожжевой экстракт – 3.0;  $\text{NaCl}$  – 5.0; глюкоза – 1.0; агар-агар – 15.0. Чашки Петри помещали в термостат при температуре 28°C на 72 ч, после чего подсчитывали количество колоний бактерий.

Регистрацию показаний СЭ проводили путем измерения вольт-амперных характеристик (ВАХ) через заданные промежутки времени с помощью двухканального источника-измерителя Keysight B2902A (“Keysight Technologies”, Малайзия). Для интерпретации полученных ВАХ и оценки изменения потенциального барьера на границе ме-



**Рис. 3.** Общая схема эксперимента.



**Рис. 4.** Зависимость сопротивления СЭ ( $R$ ) и численности микроорганизмов ( $N$ ) от времени экспозиции при напряжении 5В: 1 – титр клеток, 2 – показания СЭ, находящихся в колбах, засеянных микроорганизмами, 3 – показания СЭ в колбах без внесения микроорганизмов.

талл/полимер использовали модель инъекционных токов, ограниченных объемным зарядом [16]. В рамках данной модели ток  $I$  характеризовался степенной зависимостью от напряжения  $I \sim kU^n$ , где  $U$  – разность потенциалов,  $k$  – коэффициент пропорциональности,  $n$  – показатель степени [10]. Высоту потенциального барьера на границе металл/полимер определяли, исходя из уравнения Дэшмана [11]:

$$e\phi_B = kT \ln(SA^*T^2/I_S),$$

где  $T$  – температура,  $k$  – постоянная Больцмана,  $e$  – заряд электрона,  $S$  – площадь контакта,  $A^*$  – постоянная Ричардсона,  $I_S$  – ток насыщения.

Первое измерение осуществляли через 1 ч после помещения СЭ в колбы. Эксперимент повторяли трижды. Относительная погрешность измерений величины сопротивления составляла  $\pm 2\%$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На вторые сутки эксперимента было отмечено помутнение питательной среды в колбах, инокулированных штаммом *E. asburiae* УОМ 3. Рост культуры сопровождался выделением газа, о чем свидетельствовало появление пузырьков на поверхности питательной среды.

Стадия экспоненциального роста бактерий проходила в течение двух суток культивирования (рис. 4, кривая 1). В данной фазе удельная скорость роста биомассы максимальна, развитие популяции не лимитируется питательными веществами и не тормозится ингибирующими продуктами жизнедеятельности. Максимальный титр клеток был за-

фиксирован через 48 ч инкубации и составил  $2.4 \times 10^{10}$  КОЕ/мл. В течение последующих 24 ч численность микроорганизмов постепенно снижалась и через 96 ч составила  $1.6 \times 10^9$  КОЕ/мл.

На рис. 4 представлены результаты измерения сопротивления СЭ в зависимости от времени нахождения в колбах, в которых культивировали бактерии (рис. 4, кривая 2). Наибольшее изменение сопротивления зафиксировано в первые 18 ч – оно уменьшилось от  $10^7$  до  $10^3$  Ом и достигло минимального значения  $10^2$  Ом через 48 ч.

В колбах без микроорганизмов также выявлено изменение сопротивления СЭ (рис. 4, кривая 3). Оно уменьшалось близко к линейному закону в течение первых 30 ч от  $10^6$  до  $10^4$  Ом, в дальнейшем изменение сопротивления практически отсутствовало. По-видимому, такое поведение полимерных СЭ связано с изменением влажности в пространстве над поверхностью жидкости, а также и с диффузионными процессами в полимерной пленке [10]. Сравнение кривых 1 и 2 на рис. 4 свидетельствовало о том, что существовала зависимость между численностью микроорганизмов, находящихся в активной фазе своего развития и показаниями СЭ, реагирующего на увеличение концентрации продуктов жизнедеятельности бактерий.

Особенностью функционирования полимерных СЭ является то, что чувствительность их ВАХ в разных диапазонах напряжений разная. ВАХ являются нелинейными, типичными для структур [10, 11], содержащих контакты металл/полимер (рис. 5). При малых напряжениях, при которых ВАХ имеет линейный вид ( $n = 1$ ), реакция СЭ на перемены в окружающей среде минимальна.

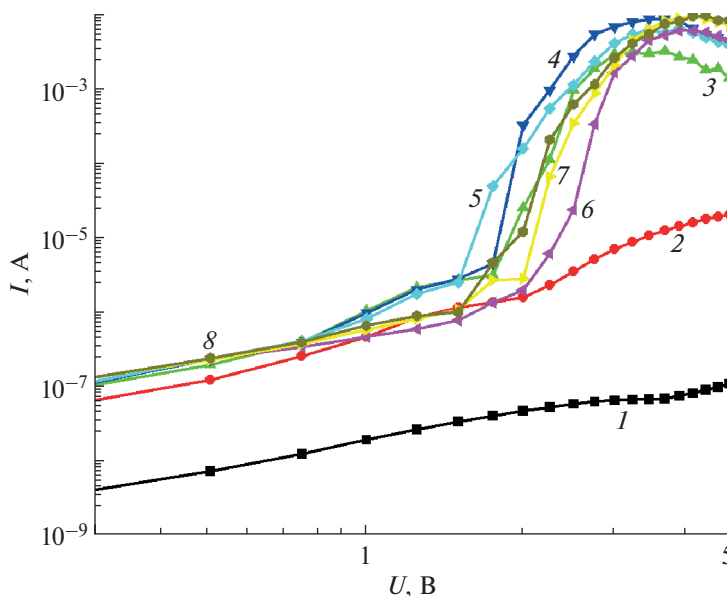


Рис. 5. ВАХ СЭ, находящихся в колбах, засеянных микроорганизмами, измеренные в разные временные интервалы (ч): 1 – 1; 2 – 7; 3 – 14; 4 – 21; 5 – 28; 6 – 35; 7 – 42; 8 – 49.

Наиболее заметные изменения его сопротивления наблюдались после перехода ВАХ в сверхлинейный режим ( $n > 1$ ).

Согласно модели инжекционных токов [16], в области линейной зависимости перенос носителей заряда осуществляется за счет собственных равновесных носителей заряда. Переход в сверхлинейную область соответствует преобладанию в токе инжектированных носителей заряда. Таким образом, чувствительность СЭ зависит от изменения условий инжекции носителей заряда из металлического электрода в полимерный слой. Это может быть связано с влиянием состава атмосферы окружающей среды (ЛОС, в частности) на высоту потенциального барьера на контакте металл/полимер. В настоящем эксперименте высоты потенциального барьера  $\phi_B$  имели следующие значения:  $\phi_{B1ч} \sim 0.44$  эВ,  $\phi_{B7ч} \sim 0.33$  эВ,  $\phi_{B14ч} \sim 0.16$  эВ,  $\phi_{B21ч} \sim 0.13$  эВ,  $\phi_{B28ч} \sim 0.18$  эВ,  $\phi_{B35ч} \sim 0.15$  эВ,  $\phi_{B42ч} \sim 0.13$  эВ,  $\phi_{B49ч} \sim 0.13$  эВ. Проведенные расчеты показывают, что ЛОС, накапливающиеся в среде в результате жизнедеятельности микроорганизмов и взаимодействующие с поверхностью сенсорного элемента, оказывают значительное влияние на высоту потенциального барьера на контакте металл/полимер и, следовательно, на сопротивление СЭ. Большой диапазон изменения сопротивления СЭ может быть хорошим аргументом для использования полимерных структур, содержащих границу раздела полимер/полимер, для дальнейшей разработки на их основе датчиков присутствия микроорганизмов путем детектирования образуемых ими ЛОС.

\*\*\*

Таким образом, в условиях модельного опыта выявлена зависимость между численностью клеток штамма *E. asburiae* UOM 3 в жидкой питательной среде и сопротивлением СЭ в воздушной среде, содержащей микробные ЛОС. Установлено, что при увеличении титра бактерий на 3 порядка сопротивление СЭ уменьшилось на 2 порядка. Полученные результаты позволяют предположить, что СЭ на основе многослойных структур тонких пленок ПДФ могут быть использованы в биодетекторах для проведения анализа различных материалов и сред на предмет присутствия в них бактерий, в том числе группы кишечной палочки.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания по теме № 122031100163-4 с использованием оборудования РЦКП “Агидель”.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Веселова М.А., Плюта В.А., Хмель И.А. // Микробиология. 2019. Т. 88. № 3. С. 272–287.
2. Schulz S., Dickschat J.S. // Nat. Prod. Rep. 2007. V. 24. № 4. P. 814–842.
3. Weisskopf L., Schulz S., Garbeva P. // Nat. Rev. Microbiol. 2021. V. 19. № 6. P. 391–404.
4. Elmassry M.M., Piechulla B. // Front. Neurosci. 2020. V. 14. Article 257. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00257>
5. Lough F., Perry J.D., Stanforth S.P., Dean J.R. // TrAC Trends Anal. Chem. 2017. V. 87. P. 71–81.

6. *Ratiu I.A., Bocos-Bintintan V., Monedeiro F., Milanowski M., Ligor T., Buszewski B.* // Crit. Rev. Anal. Chem. 2020. V. 50. № 6. P. 501–512.
7. *Bonah E., Huang X., Aheto J.H., Osae R.* // J. Food Sci. Technol. 2020. V. 57. № 6. P. 1977–1990.
8. *Seesaard T., Thippakorn C., Kerdcharoen T., Kladsomboon S.* // Anal. Methods. 2020. V. 12. № 47. P. 5671–5683.
9. *Shauloff N., Morag A., Yaniv K., Singh S., Malishev R., Paz-Tal O., Rokach L., Jelinek R.* // Nanomicro Lett. 2021. V. 13. № 1. Article 112. doi.org/<https://doi.org/10.1007/s40820-021-00610-w>
10. *Gadiev R.M., Lachinov A.N., Salikhov R.B., Rakhmееv R.G., Kornilov V.M., Yusupov A.R.* // Appl. Phys. Lett. 2011. V.98. P. 173305. <https://doi.org/10.1063/1.3584135>
11. *Yusupov A.R., Gadiev R.M., Lachinov A.N., Kornilov V.M., Kalimullina L.R., Galiev A.F., Kian M., Salazkin S.N.* // Synth. Met. 2021. V. 274. Article 116733. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2021.116733>
12. *Lachinov A.N., Gadiev R.M., Salikhov R.B., Zhdanov E.R.* // Nanotechnology in the Security Systems. NATO Science for Peace and Security. Series C: Environmental Security. /Ed. J. Bonča, S. Kruchinin. Dordrecht: Springer, 2015. P. 243–256.
13. *García C., Lozano A.E., de la Campa J.G., Vygoskii Y., Zolotukhin M., de Abajo J., Garrido L., Guzmán J.* // Macromolecules. 2015. V. 48. № 8. P. 2585–2592.
14. Определитель бактерий. /Ред. Дж. Х. Берджи. М.: Мир, 1997. Т. 1. 429 с.
15. *Лабинская А.С., Быков А.С., Бондаренко В.М., Березкина Н.Е.* Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга I. / Ред. А.С. Лабинская, Е.Г. Волина. Изд-во Бином, 2020. 1080 с.
16. *Ламперт М., Марк П.* Инжекционные токи в твердых телах. М.: Мир, 1973. 416 с.

## Prospects for the Application of Sensor Elements for Detecting the Presence of Bacteria in Real Time

**A. N. Lachinov<sup>a</sup>, A. A. Lachinov<sup>a</sup>, D. D. Karamov<sup>a</sup>, A. F. Galiev<sup>a</sup>, E. V. Kuzina<sup>b</sup>, and T. Yu. Korshunova<sup>b,\*</sup>**

<sup>a</sup> *Institute of Physics of Molecules and Crystals, Ufa Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450075 Russia*

<sup>b</sup> *Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

\*e-mail: korshunovaty@mail.ru

A study was made of the response of a sensor element based on polydiphenylenephthalide to a change in the composition of the air medium during the cultivation of *Enterobacter asburiae* UOM 3 bacteria in a liquid nutrient medium. Registration of changes in the resistance of the sensor element in response to volatile organic compounds released by bacterial cells was carried out by measuring the current-voltage characteristics at specified time intervals. The results showed the relationship between the number of bacteria and the change in the resistance of the sensor element, due to the release of waste products of microorganisms. With an increase in the titer of bacteria by 3 orders of magnitude, the resistance of the sensor under the influence of volatile organic compounds accumulated in the medium decreased by 2 orders of magnitude. It is assumed that sensors based on polydiphenylenephthalide can be used to determine the presence of bacteria in various materials and media.

*Keywords:* volatile organic compounds, sensor element, polydiphenylenephthalide, current-voltage characteristics, *Enterobacter*



УДК 577.1

## БЕЛКОВЫЙ АНТИОКСИДАНТНЫЙ КОМПЛЕКС ВОДНОГО ЭКСТРАКТА ЛИЧИНОК *Ulomoides dermestoides*

© 2023 г. Н. А. Ушакова<sup>1</sup> \*, О. В. Тихонова<sup>2</sup>, А. В. Амбарян<sup>1</sup>, А. И. Бастраков<sup>1</sup>, А. Е. Донцов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, 119071 Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, 119121 Россия

<sup>3</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334 Россия

\*e-mail: naushakova@gmail.com

Поступила в редакцию 02.09.2022 г.

После доработки 18.09.2022 г.

Принята к публикации 29.09.2022 г.

Получен водный экстракт из личинок жука-чернотелки *Ulomoides dermestoides*, выращенных в контролируемых условиях, и проведен его протеомный анализ на основе одномерного электрофоретического разделения белков, их трипсинолиза в геле и последующей хромато-масс-спектрометрии. Идентификацию белков проводили при помощи программы MaxQuant v.1.6.3.4. Для идентификации белков по гомологии использовали базу данных Uniprot. Каталазную активность определяли спектрофотометрически по убыли концентрации пероксида водорода. Антиоксидантную активность оценивали по тушению хемилюминесценции люминола. Экстракт содержал белки, которые могут определять биологическую активность экстракта: универсальные регуляторы клеточных процессов кальмодулин (62%), цитохром с-2 (13.5%), нуклеозиддифосфаткиназу (11.1%), ферментативные антиоксиданты супероксиддисмутазу, каталазу, глутатион S-трансферазу, пероксиредоксин, глутатионсинтазу, а также тиоредоксин, белки теплового шока 70 и 60 kDa, комплекс хитиназ (в сумме 13.4%). Активность каталазы составляла  $6.3 \pm 1.1$  мкмоль  $H_2O_2$ /мин/мг белка; антиоксидантная активность 1 мг белка в мл экстракта была эквивалентна  $1.36 \pm 0.3$  мМ тролокса. Отмечена перспективность практического использования экстракта как природного антиоксидантного комплекса.

**Ключевые слова:** водный экстракт, белки, антиоксидант, личинки *Ulomoides dermestoides*

**DOI:** 10.31857/S0555109923020162, **EDN:** LVJJXJ

Антиоксиданты, благодаря их способности противодействовать свободным радикалам и нейтрализовать окислители, используются для лечения или облегчения симптомов заболеваний, связанных с действием активных форм кислорода [1, 2]. Способность организма производить антиоксиданты уменьшается с возрастом, поэтому дополнительный прием антиоксидантов важен для продления активной жизни. Большое значение уделяется поиску природных источников антиоксидантов. Насекомые рассматриваются как источник новых биологически активных веществ и являются перспективными объектами для получения новых субстанций и фармацевтического применения [3]. В практике народной медицины Китая, Японии и стран Латинской Америки известен жук-чернотелка *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidae), который используется в традиционной медицине против широкого спектра болезней. Показан антидиабетический эффект, противовоспалительное действие водного экстракта жука в лабораторных опытах на модели

острого плеврита крыс; в опытах *in vitro* выявлен эффект, аналогичный действию нестероидного противовоспалительного препарата нимесулида [4–6]. Нами было показано, что водный экстракт жука *U. dermestoides* обладает защитными свойствами при введении в рацион мышей в модели ранней стадии Болезни Паркинсона [7]. Выявленный эффект мы связываем с наличием в экстракте комплекса антиоксидантных веществ белковой и небелковой природы [8]. В составе идентифицированных антиоксидантных белков жука *U. dermestoides* присутствовали супероксиддисмутазы, каталазы, вителлогенин-подобный белок, а также не белковые вещества – различные фенольные антиоксиданты, в том числе, производные гидрохинона. Важную роль в биологической активности экстракта жука могут играть и белки теплового шока, которые также содержались в этом экстракте. Однако насекомое в своем развитии проходит несколько жизненных стадий: яйцо, личинка, куколка, и жук (имаго). Личинки и жуки при массовом разведении обычно присут-

ствуют совместно в кормовом субстрате, но состав личинок и свойства их биомассы не изучены.

Целью настоящего исследования являлся анализ белкового состава водного экстракта личинок жука-чернотелки *U. dermestoides* и характеристика его антиоксидантных свойств для оценки потенциальной биологической активности полученного экстракта.

## МЕТОДИКА

В работе анализировали водный экстракт из личинок *U. dermestoides* старшего возраста, длиной более 1 мм, выращенных в искусственных контролируемых условиях на сухих кормовых субстратах (смеси геркулеса и кукурузной муки). После отделения жуков или личинок от кормового субстрата просеиванием через сито с ячейкой диаметром 1.0 мм биомассу промывали, замораживали, затем гомогенизировали растиранием в холодной дистиллированной воде в холодной ступке холодным пестиком (1 : 15 вес/об.) и экстрагировали на холоду 2 сут при медленном перемешивании. Экстракты фильтровали через капроновую марлю для отделения твердых частиц и мембранный фильтр Миллипор (“Merck”, Германия) с диаметром пор 0.1 мкм для антибактериальной обработки. Хранили экстракты при  $-18^{\circ}\text{C}$ .

**Протеомный анализ.** Для проведения исследования применяли метод протеомного анализа, который описан в работе [8], основанный на одномерном электрофоретическом разделении белков, их трипсинолизе в геле и последующей хромато-масс-спектрометрии. После разделения белков методом электрофореза в ПАГ с SDS полученную белковую дорожку разрезали на 6 фрагментов и проводили гидролиз белков трипсином в геле каждого фрагмента. Полученные пептиды анализировали при помощи ВЭЖХ-МС/МС. Поскольку геном *U. dermestoides* полностью не расшифрован, идентификацию белков проводили с использованием базы данных последовательностей близкородственного организма *Tribolium castaneum* (red flour beetle).

Образец водного экстракта размораживали в течение 30 мин на водяной бане при температуре  $25^{\circ}\text{C}$ . Денатурирующий одномерный электрофорез проводили в присутствии SDS с концентрацией полиакриламида от 8 до 12% в разделяющем геле и 5% в концентрирующем геле [9]. Образец в объеме 2, 5 и 10 мкл наносили на дорожку и проводили электрофорез 60 мин при постоянном токе (18 мА). В этом случае напряжение первые 10 мин было 50 V, а с 11 до 60 мин с увеличением до 200 V. Гели фиксировали раствором уксусной кислоты и этанола (2 раза по 20 мин), а затем в течение 1 ч окрашивали раствором Кумасси и отмывали в течение

ночи. Белковую полосу, соответствующую объему 10 мкл образца, разрезали на 6 приблизительно равных фрагментов. Фрагменты геля промывали 2 раза по 15 мин 100 мкл 50 мМ раствора бикарбоната аммония, затем высушивали 100% ацетонитрилом (15 мин), после чего раствор удаляли, а полученные образцы досушивали на центрифужном вакуумном испарителе Concentrator Plus (“Eppendorf”, Германия). Для гидролиза белков к каждому из 6 образцов добавляли по 50 мкл 50 мМ ТЭАБ (рН 8.5) и по 10 мкл трипсина (“Promega”, США) в концентрации 0.2 мг/мл. Смесь инкубировали в течение ночи при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  при встряхивании 350 об./мин. Реакцию останавливали раствором 0.7%-ной трифторуксусной кислоты с последующей экстракцией 70%-ным ацетонитрилом в 0.1%-ной муравьиной кислоте. Фильтрат высушивали в вакуумном концентраторе и растворяли в 20 мкл 0.1%-ной муравьиной кислоты для последующего масс-спектрометрического анализа.

**Хромато-масс-спектрометрический анализ.** Анализ пептидов осуществляли с использованием ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLCnano (“Thermo Scientific”, США) с масс-спектрометром Q-exactive HFX (“Thermo Scientific”, США). Смесь пептидов (1 мкл) наносили на обогащающую колонку Acclaim  $\mu$ -Precolumn (0.5  $\times$  3 мм, размер частиц 5 мкм, “Thermo Scientific”) при скорости потока 10 мкл/мин в течение 4 мин в изографическом режиме с использованием буфера “С” (2%-ный ацетонитрил, 0.1%-ная муравьиная кислот в деионизованной воде) в качестве подвижной фазы. Далее пептиды разделяли на ВЭЖХ колонке Acclaim Permap® C18 (75 мкм  $\times$  150 мм, размер частиц – 2 мкм, “Thermo Scientific”) в градиентном режиме элюирования. Градиент формировали подвижной фазой А (0.1%-ная муравьиная кислота) и Б (80%-ный ацетонитрил, 0.1%-ный водный раствор муравьиной кислоты) при скорости потока 0.3 мкл/мин. Колонку промывали 2%-ной подвижной фазой Б в течение 10 мин, после чего линейно увеличивали ее концентрацию до 35% за 43 мин, а затем до 99% за 2 мин, после 2-минутной промывки при 99%-ным буфером Б, его концентрацию линейно снижали до исходных 2% за 3 мин. Общая длительность анализа составляла 60 мин. Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре Q-Exactive HFX в режиме положительной ионизации с использованием источника NESI (“Thermo Scientific”, США). Для масс-спектрометрического анализа были установлены следующие параметры настроек: напряжение на эмиттере 2.1 кВ, температура капилляра  $240^{\circ}\text{C}$ . Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 300 до 1500  $m/z$  при разрешении 120000. При тандемном сканировании разрешение устанавливали 15000 в диапазоне масс от 100  $m/z$  до верхней границы, которая опре-

делялась автоматически исходя из массы прекурсора, но не более 2000  $m/z$ . Изоляцию прекурсорных ионов проводили в окне  $\pm 1$  Да. Максимальное число разрешённых для изоляции ионов в режиме MS2 было установлено как не более 40, при этом граница отсечения для выбора прекурсора для тандемного анализа бала установлена как 50000 единиц, а нормализованная энергия соударения (NCE) равнялась 29. Для тандемного сканирования учитывали только ионы от  $z = 2+$  до  $z = 6+$  по зарядному состоянию. Максимальное время накопления для прекурсорных ионов составило 50 мс, для фрагментных ионов 110 мс. Величину AGC для прекурсоров и фрагментных ионов устанавливали  $1 \cdot 10^6$  и  $2 \cdot 10^5$ , соответственно. Все измеренные прекурсоры динамически исключались из тандемного MS/MS анализа на 90 с.

**Идентификация белков.** Идентификацию белков экстракта личинок *U. dermestoides* проводили при помощи программы MaxQuant v.1.6.3.4 с использованием поискового алгоритма Andromeda [10], объединяя спектры, полученные для шести фрагментов геля. Для идентификации белков по гомологии использовали базу данных Uniprot с ограничением по видовой принадлежности близкородственного организма – *Tribolium castaneum*.

Были заданы следующие поисковые параметры: расщепляющий фермент – трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов  $\pm 5$  ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS  $\pm \pm 0.01$  Да и возможность пропуска двух сайтов расщепления трипсином. Окисление метионинов, N-концевое ацетилирование белка и модификация цистеина пропионамидом были учтены как возможные модификации пептидов. Для валидации сопоставлений (образования пар) спектров и пептидов PSM (Peptide-Spectrum Matches), идентификации пептидов и идентификации белков использовали величину FDR (False Discovery Rate) не более 1.0%. Белки рассматривались в качестве достоверно идентифицированных, если для них было обнаружено, по крайней мере, два пептида. Безметковая количественная оценка содержания белков происходила на основе iBAQ (абсолютная количественная оценка на основе интенсивности).

**Функциональный анализ белков экстракта.** Анализ белков экстракта личинок проводили с использованием веб-ресурса DAVID [11], загружая в качестве исходных данных все идентифицированные белки, за исключением контаминантов. Рассматривались только статистически значимые гипотезы. Для оценки статистической значимости распределения белков по группам Gene Ontology (GO) в отношении молекулярных функций применяли величину ( $p$ -value  $< 0.05$ ) с поправкой на множественность сравнения Беньямини.

**Антиоксидантные свойства экстракта.** Предварительно в экстракте определяли содержание белка микробиуретовым методом с использованием двухлучевого спектрофотометра “Shimadzu” RF 5301PC (Япония) [12]. Каталазную активность анализировали спектрофотометрическим методом, измеряя убыль концентрации пероксида водорода по поглощению комплекса пероксида водорода с молибдатом [13].

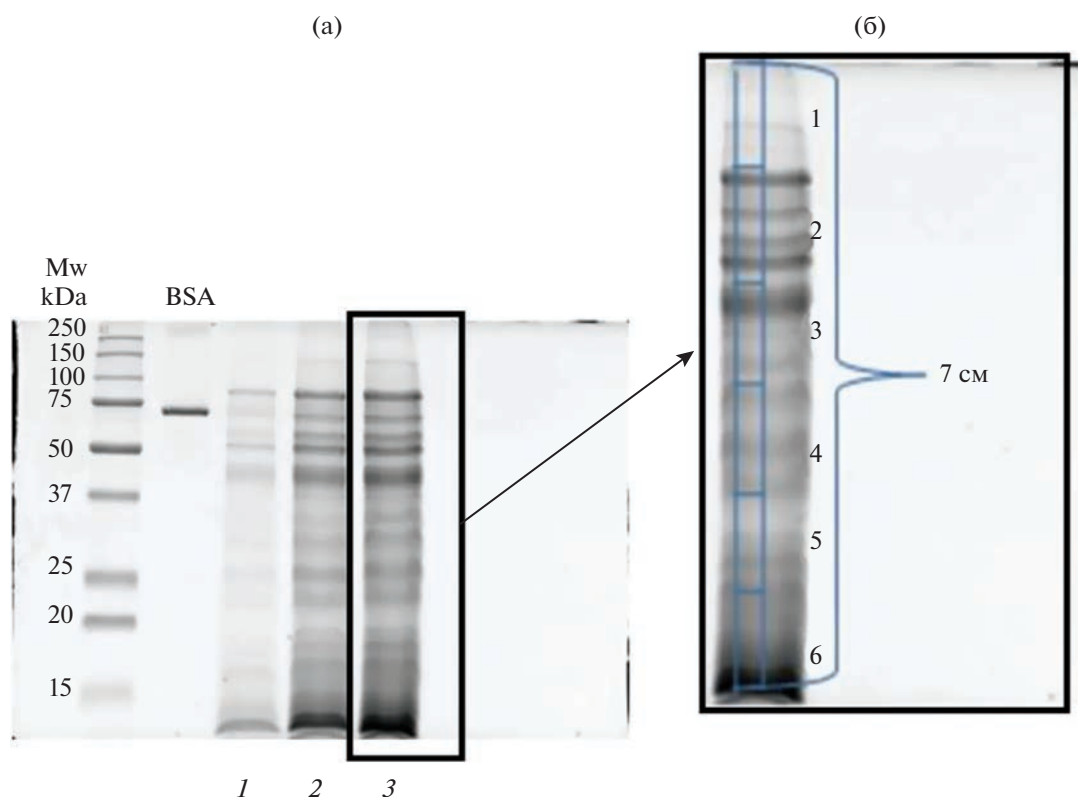
Антиоксидантную активность (АОА) оценивали по тушению хемилюминесценции люминола. Кинетику хемилюминесценции регистрировали на спектрофлуориметре “Shimadzu” RF 5301PC (Япония) при длине волны люминесценции 470 нм при комнатной температуре.

Для количественной оценки способности экстракта личинки жука взаимодействовать с радикалами, локализованными в водной фазе модельной системы, результаты тушения хемилюминесценции пересчитывали в координатах зависимости латентного периода от концентрации белка в экстракте, а также по уменьшению амплитуды хемилюминесценции в присутствии экстракта. В последнем случае измеряли интенсивность хемилюминесценции в контроле, где экстракт был заменен чистым буферным раствором (I0), и в опытных образцах с различным содержанием экстракта (I), с последующим пересчетом в координатах зависимости величины  $(I0/I - 1)$  от концентрации белка в экстракте. Полученные зависимости сравнивали с зависимостями амплитуды и латентного периода хемилюминесценции в присутствии тролокса (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) – водорастворимого синтетического аналога природного антиоксиданта витамина E.

Среда для инкубации содержала: 0.05 М К-фосфатный буфер, pH 7.4, 2.0 мкМ гемоглобин, 100 мкМ люминол, 100 мкМ ЭДТА и различные количества экстрактов личинки жука (от 10 до 150 мкл). Реакцию начинали добавлением 100 мкМ пероксида водорода. В качестве контроля использовали буферный раствор вместо экстракта. Результаты сравнивали с действием тролокса, измеряя в тех же условиях зависимость амплитуды хемилюминесценции от концентрации тролокса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для анализа белкового состава водного экстракта из личинок *U. dermestoides* проводили одномерный электрофорез. На рис. 1а представлен гель после проведения электрофореза образца экстракта разных объемов 2, 5 и 10 мкл и схема разрезания дорожки, на которую нанесено 10 мкл, на 6 фрагментов геля для дальнейшего масс-спектрометрического анализа. Фрагменты геля вырезали из середины соответствующей белковой дорож-



**Рис. 1.** Гель-электрофорез в ПААГ (а) экстракта личинок, нанесенного в разных количествах: 2 (1), 5 (2) и 10 (3) мкл; схема разделения белковой дорожки на 6 фрагментов геля для дальнейшего масс-спектрометрического анализа (б).

ки шириной около 2 мм и длиной около 10–12 мм, как схематично показано на рис. 1б.

После гидролиза трипсином в геле получали смеси пептидов для последующего ВЭЖХ-МС/МС-анализа. Для каждого вырезанного фрагмента анализ повторяли не менее двух раз. Последующую идентификацию белков экстракта проводили, объединяя все полученные спектры для 6 фрагментов геля в одном поиске. Поиск проводили по гомологии при помощи программы MaxQuant с использованием базы данных близкородственного организма. В результате масс-спектрометрического анализа в экстракте было обнаружено 169 белков и белковых групп, из которых достоверно идентифицировано 104 белка исследуемого организма, гомологичных белкам *Tribolium castaneum*. Содержание белков в экстракте оценивали при помощи эмпирического показателя iBAQ. Процентное содержание определенного белка рассчитывали, как отношение величины iBAQ белка к сумме всех величин iBAQ для всех идентифицированных белков, умноженное на 100%.

В составе идентифицированных белков в образце экстракта личинки *U. dermestoides* наиболее представленными были три белка – tr|D6WHK2|D6WHK2\_TRICA Nucleoside diphosphate kinase (11.1%), tr|D6WVZ4|D6WVZ4\_TRICA

Cytochrome c-2-like Protein (13.5%) и tr|D6WB91|D6WB91\_TRICA Calmodulin (62%). Другие идентифицированные по гомологии белки, имеющие интерес для оценки биологической активности экстракта, представлены в табл. 1. Их суммарное содержание составило 13.4%.

В результате проведенной функциональной аннотации идентифицированных белков экстракта в терминах GO в отношении молекулярных функций была выявлена статистически значимая группа из пяти белков, обладающих антиоксидантной активностью: A0A139WLA9 (D6X4D1), D6WWA9, D2A3X3, D2A2T2, D6W9X8. Эти белки выделены в табл. 1 жирным шрифтом.

Результаты оценки антиоксидантной активности представлены на рис. 2 и 3. Каталазная активность экстракта личинок составляла  $6.3 \pm 1.1$  мкмоль перекиси/мин мг белка.

По антиоксидантной активности 1 мг/мл белка личинок в экстракте был эквивалентен  $1.36 \pm 0.3$  мМ тролокса. Этот результат ниже, чем AOA метанольного экстракта из жука *U. dermestoides* [4], которая составляла  $3.65 \pm 0.5$  эквивалента тролокса. Возможно, это связано с различиями в методике экстракции (водная или метанольная), не исключено также, что при мембранной фильтрации для

Таблица 1. Некоторые идентифицированные белки и их процентное содержание в экстракте личинки *Ulomooides dermestoides*

ID, название белка (Fasta headers)	Покрытие последовательности, %	Mw, кДа	Процентное содержание, %
tr D6WFC8 D6WFC8_TRICA Glutathione S-transferase D7-like Protein	13.4	24.466	2.8
tr D2A3X3 D2A3X3_TRICA Peroxiredoxin 1-like Protein	<b>20.4</b>	<b>21.778</b>	<b>1.5</b>
tr D6WD04 D6WD04_TRICA Heat shock 70 kDa protein cognate 3-like Protein	18	72.685	1.5
tr D6WVA9 D6WVA9_TRICA Superoxide dismutase OS=Tribolium castaneum	<b>11.2</b>	<b>23.642</b>	<b>1.2</b>
tr D6WDB4 D6WDB4_TRICA Thioredoxin-1-like Protein	37.5	15.127	0.9
tr D6WH21 D6WH21_TRICA Glutathione S-transferase S1-like Protein	11.3	23.571	0.7
tr A0A139WJ64 A0A139WJ64_TRICA Glutathione S-trans D2A2T2ferase 1-1-like Protein	13.9	24.218	0.6
tr D6W9U6 D6W9U6_TRICA Glutathione S-transferase 1-1-like Protein	13	26.753	0.5
tr D2A4J1 D2A4J1_TRICA Thioredoxin OS=Tribolium castaneum	21	11.951	0.2
tr A0A139WLA9 A0A139WLA9_TRICA; tr D6X4D1 D6X4D1_TRICA Catalase	<b>16.6</b>	<b>54.648</b>	<b>0.2</b>
tr A0A139WAS5 A0A139WAS5_TRICA Heat shock 70 kDa protein cognate 4-like Protein	6.5	71.08	0.1
tr D6WCB2 D6WCB2_TRICA Heat shock 70 kDa protein cognate 2-like Protein	2.9	69.132	0.1
tr D6WKD1 D6WKD1_TRICA 60 kDa heat shock protein, mitochondrial-like Protein	22.8	61.131	0.04
tr D6WQX3 D6WQX3_TRICA Glutathione synthetase	5.3	59.487	0.03
tr D6W9X8 D6W9X8_TRICA Peroxiredoxin 1-like Protein	<b>7</b>	<b>27.498</b>	<b>0.02</b>
tr D6WMZ5 D6WMZ5_TRICA Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3-like Protein	5.9	60.615	0.02
tr D2A2T2 D2A2T2_TRICA Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Tribolium castaneum OX=7070 GN=SOD PE=2 SV=1	<i>13.1</i>	<i>15.689</i>	<i>2.2</i>
<b>Хитиназы:</b>			
tr Q5FYY8 Q5FYY8_TRICA Chitinase 3 tr Q5FYY7 Q5FYY7_TRICA Chitinase 16	6.2	42.032	0.42
tr Q0Z936 Q0Z936_TRICA Chitinase-like protein Idgf4	6.6	49.287	0.29
tr A8W493 A8W493_TRICA Chitin deacetylase 7	2.9	42.607	0.009
tr Q0Z940 Q0Z940_TRICA Chitinase 9	2.6	42.013	0.059

Примечание: курсивом выделены белки, которые идентифицированы по гомологии при наличии одного экспериментального пептида. Жирным шрифтом выделены белки, обладающие антиоксидантной активностью (по результатам функционального анализа).

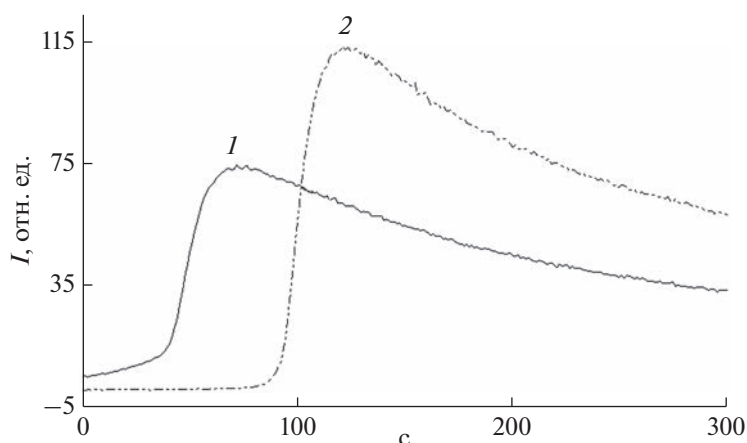


Рис. 2. Характерная кинетика возгорания и тушения хемилюминесценции люминола: 1 – экстракт личинки, 2 – тролокс.

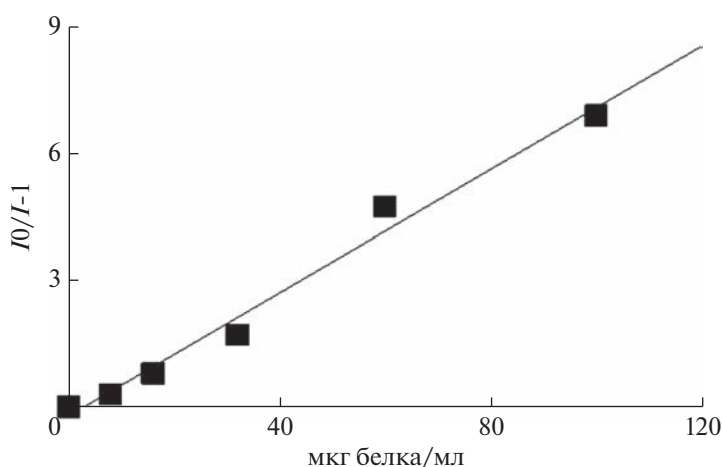


Рис. 3. Интенсивность АОА экстракта личинки в зависимости от содержания белка в экстракте.

антибактериальной обработки, были адсорбированы и некоторые активные компоненты.

Проведенный протеомный анализ водного экстракта личинок *Ulomoides dermestoides* показал присутствие широкого спектра белков, обладающих биологической активностью и использующихся в качестве лекарственных средств. Основной белок в экстракте – кальмодулин, на долю которого приходится 62% от всех выделенных белков. Это кальций-связывающий белок, обнаруживается в цитоплазме всех эукариотических клеток. Кальмодулин является универсальным регулятором многих процессов в клетке, инициирует клеточную активность. Он влияет на такие важные процессы, как воспаление, апоптоз, сокращения гладких мышц, внутриклеточный транспорт, краткосрочная и долговременная память и иммунный ответ [14, 15].

Остальные 40% протеомного экстракта практически в равных частях составляли Цитохром с-2, нуклеозиддифосфаткиназа и смесь антиоксидантных ферментов, биологически активных белков теплового шока и хитиназа.

Цитохром с-2 относится к семейству Цитохром с-типа и является гемо-содержащим белком. Выполняет важную роль при нарушениях окислительного фосфорилирования и дыхания, ингибирует перекисное окисление липидов [16]. Применяется при лечении сердечной недостаточности, рахита, анемии; восстанавливает иммунологическую активность нейтрофилов крови.

Нуклеозиддифосфаткиназа – фермент, катализирующий реакции синтеза различных нуклеозидтрифосфатов из АТФ и соответствующих нуклеозиддифосфатов, участвует в регуляции процессов подвижности клеток, злокачественного роста, апо-

птоза. Является универсальным регулятором внутриклеточных процессов [17].

В экстракте личинок выявлено присутствие белков, обладающих антиоксидантной активностью (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатион S-трансферазы, пероксиредоксин, тиоредоксин), то есть основных компонентов системы, обеспечивающей антирадикальную защиту организма. Это подтвердилось антиоксидантной активностью экстракта. Относительно небольшое содержание каталазы (0.2%) в экстракте соответствовало низкой каталазной активности. Тем не менее, получена довольно высокая АОО экстракта при сравнении с активностью тролокса, что можно объяснить суммарной активностью супероксиддисмутазы, глутатионтрансферазы, пероксиредоксина и других идентифицированных в экстракте антиоксидантов.

Белки теплового шока вырабатываются клетками при стрессовых условиях в ответ на температурное воздействие, их считают белками стресса [18]. Однако белки теплового шока, такие, как hsp70, участвуют в поддержании иммунитета [19], а также играют важную роль в развитии на эмбриональных или ювенильных стадиях млекопитающих, костистых рыб и некоторых низших позвоночных [20]. Поскольку объектом настоящих исследований являлись личинки старшего возраста перед окукливанием, которые развивались в строго регламентированных условиях, обеспечивающих комфортные условия жизнедеятельности насекомых при отсутствии стресса, можно предположить, что обнаружение белков теплового шока в личинках не связано со стрессом, а служит скорее всего для обеспечения функциональной активности иммунитета.

Присутствие хитиназа является характерным признаком личинок с хитиновой наружной оболочкой, можно предположить, что это связано с периодическими линьками личинок. Личинки до образования куколок проходят несколько стадий линек. Сброшенные личинками хитиновые оболочки скапливаются на поверхности субстрата, и могут вторично использоваться личинками в процессе пищеварения за счет активности хитиназ. Хитиназы могут быть также необходимы личинкам для морфогенеза экзоскелета и/или защиты от патогенных грибов [21].

В целом можно отметить, что идентификация в водном экстракте личинок *Ulomoides dermestoides* уникального комплекса белков с потенциальной биологической активностью (регуляторными, антиоксидантными, иммуноактивными и противомикробными свойствами) открывает перспективы для практического использования экстракта.

Работа одобрена Комиссией по этике ИПЭЭ РАН №56 от 22.03.2022.

Авторы выражают благодарность Р.Л. Илиеву за консультации и ООО Натурбион за участие в получении биомассы личинок.

Протеомный анализ экстракта выполнен с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека” ИБМХ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Suárez-Rivero J.M., Pastor-Maldonado C.J., Povea-Cabello S., Álvarez-Córdoba M., Villalón-García I., Munuera-Cabeza M. et al. // Antioxidants. 2021. V. 10. № 2. P. 236. <https://doi.org/10.3390/antiox10020236>*
2. *Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C. // Int. J. Biomed. Sci. 2008. V. 4. № 2. P. 89–96.*
3. *Di Mattia C., Battista N., Sacchetti G., Serafini M. // Frontiers in nutrition. 2019. V. 6. P. 106. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00106>*
4. *Mendoza D., Salgado M., Durant L. // Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2013. V. 32. P. 402–410.*
5. *Deloya-Brito G.G., Deloya C. // Acta Zoo Mex. 2014. V. 30. P. 655–661.*
6. *Mendoza-Meza D.L., España-Puccini P. // TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 2016. V. 19. № 2. P. 83–91.*
7. *Kovalzon V.M., Ambaryan A.V., Revishchin A.V., Pavlova G.V., Rybalkina E.Y., Bastrakov A.I., Ushakova N.A. // Systematic Reviews in Pharmacy. 2021. V. 12. № 10. P. 569–577.*
8. *Ushakova N.A., Brodsky E.S., Tikhonova O.V., Dontsov A.E., Bastrakov A.I. // Antioxidants. 2021. V. 10. P. 1055. <https://doi.org/10.3390/antiox10071055>*
9. *Laemmli U.K. // Nature. 1970 V. 227. № 5259. P. 680–685. PMID: . <https://doi.org/10.1038/227680a05432063>*
10. *Tyanova S., Temu T., Cox J. // Nat. Protocols. 2016. V. 11. P. 2301–2319.*
11. *Sherman B.T., Hao M., Qiu J., Jiao X., Baseler M.W., Lane H.C., Imamichi T., Chang W. // Nucleic Acids Research. 2022. V. 50 (W1):W216–W221. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac194>*
12. *Itzhaki R.F., Gill D.M. // Anal. Biochem. 1964. V. 9. P. 401–416.*
13. *Goth L. // Clinica Chimica Acta. 1991. V. 196. P. 143–15.*
14. *Stevens F.C. // Can. J. Biochem. Cell Biol. 1983. V. 61. № 8. P. 906–910. <https://doi.org/10.1139/o83-115>*
15. *Lledo P.M., Hjelmstad G.O., Mukherji S., Soderling T.R., Malenka R.C., Nicoll R.A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. № 24. P. 11175–11179.*
16. *Ващенко В.И., Хансон К.П., Шабанов П.Д. // Общ. клин. фарм. лек. тер. 2005. Т. 4. № 1. С. 27–37.*
17. *Липская Т.Ю., Воинова В.В. // Биохимия. 2012. Т. 77. С. 731–741.*



18. Santoro M.G. // Biochem. Pharmacol. 2000. V. 59. № 1. P. 5563.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00299-329](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00299-329)
19. Binder R.J. // J. Immunol. 2014. V. 193. № 12. P. 5765–5771.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401417>
20. Marvin M., O'Rourke D., Kurihara T., Juliano C.E., Harrison K.L., Hutson L.D. // Dev. Dyn. 2008. V. 237. № 2. P. 454–463.  
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21414>
21. Enzymes in Human and Animal Nutrition. Principles and Perspectives. Chapter 18 – Chitinases. //Ed. C. Simões Nunes, V. Kumar. N.Y.: Acad. Press, 2018. P. 361–378. ISBN 978-0-12-805419-2.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00018-6>

## Protein Antioxidant Complex of Water Extract of Larvae of Black Beetles *Ulomoides dermestoides*

N. A. Ushakova<sup>a, \*</sup>, O. V. Tikhonova<sup>b</sup>, A. V. Ambaryan<sup>a</sup>, A. I. Bastrakov<sup>a</sup>, and A. E. Dontsov<sup>c</sup>

<sup>a</sup> *Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Moscow, 119071 Russia*

<sup>b</sup> *Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, 119121 Russia*

<sup>c</sup> *Emanuel Institute of Biochemical Physics, RAS, Moscow, 119334 Russia*

\*e-mail: [naushakova@gmail.com](mailto:naushakova@gmail.com)

An aqueous extract from the larvae of black beetles *Ulomoides dermestoides* grown under controlled conditions was obtained and its proteomic analysis based on one-dimensional electrophoretic separation of proteins, their trypsinolysis in a gel and subsequent chromatography-mass spectrometry was performed. Protein identification was performed using MaxQuant v.1.6.3.4 software. The Uniprot database was used to identify proteins by homology. Catalase activity was determined spectrophotometrically by hydrogen peroxide concentration decrease. Antioxidant activity was evaluated by luminol chemiluminescence quenching. The extract contained proteins that can determine the biological activity of the extract: universal regulators of cellular processes calmodulin (62%), cytochrome c-2 (13.5%), nucleoside diphosphate kinase (11.1%), the enzymatic antioxidants superoxide dismutase, catalase, glutathione S-transferase, peroxiredoxin, glutathione synthetase as well as thioredoxin, 70 and 60 kDa heat shock proteins, chitinase complex (13.4% in total). Catalase activity was  $6.3 \pm 1.1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  protein; antioxidant activity of 1 mg protein per ml extract was equivalent to  $1.36 \pm 0.3 \text{ mM}$  trolox. The prospects for practical use of the extract as a natural antioxidant complex were noted.

*Keywords:* water extract, proteins, antioxidant, *Ulomoides dermestoides* larvae

УДК 543.645:57.083.3

## РАЗРАБОТКА КИНЕТИЧЕСКОГО МИКРОПЛАНШЕТНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИБУТИЛФТАЛАТА

© 2023 г. А. Н. Берлина<sup>1</sup>, К. В. Серебренникова<sup>1</sup>, Н. С. Комова<sup>1</sup>, А. В. Жердев<sup>1</sup>, Б. Б. Дзантиев<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр  
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 15.12.2022 г.

После доработки 30.12.2022 г.

Принята к публикации 09.01.2023 г.

В работе предложена методика быстрого иммуноферментного анализа (ИФА) для определения дибутилфталата (ДБФ) в фруктовых соках, основанная на конкурентном взаимодействии между свободным и связанным антигеном за центры связывания специфических антител. Изучены аналитические характеристики метода в различных кинетических режимах проведения стадии конкуренции. Установлены оптимальные условия, обеспечивающие минимальный предел обнаружения и высокую точность измерений. Выбрана продолжительность конкурентной стадии ИФА – 30 мин. Диапазон определяемых концентраций ДБФ составил от 0.37 до 68.34 нг/мл; предел обнаружения – 0.08 нг/мл. Выбран режим экстрагирования ДБФ, для которого показана эффективность предложенного ИФА при тестировании фруктовых соков.

*Ключевые слова:* иммуноферментный анализ, кинетика иммунных взаимодействий, дибутилфталат, безопасность пищевых продуктов, фруктовый сок, экстракция, экотоксикант

DOI: 10.31857/S0555109923030030, EDN: AYNQGU

Эфиры фталевой кислоты широко используются в качестве добавок, обеспечивающих гибкость и прочность пластиковых изделий бытового, пищевого, медицинского и строительного назначения [1, 2]. Миграция фталатов из материалов в воду, воздух и почву объясняется отсутствием химического связывания между эфирами фталевой кислоты и пластмассами [3–5]. Фталаты оказывают негативное влияние на секрецию гормонов в организме человека и обладают репродуктивной, эмбриологической и генетической токсичностью [6]. Кроме того, серьезной проблемой является медленная деградация фталатов и аккумуляция их производных в тканях живых организмов [7, 8].

Один из наиболее распространенных и широко используемых пластификаторов в промышленных и потребительских товарах – дибутилфталат (ДБФ) [9]. Для ДБФ как токсиканта класса эндокринных разрушителей различными контролирующими организациями установлены максимально допустимые уровни содержания в диапазоне 100–450 нг/мл [10, 11]. Однако значительные превышения этих уровней часто обнаруживаются в продуктах питания и воде [12]. К тому же разнообразие фталатов и их встречаемость в разных сочетаниях [13] требует в каких-то случаях группового, в каких-то – селективного выявления. Среди методов определения фталатов преобладают инструментальные методы, такие как хроматография или хромато-масс-спектрометрия [14–16].

Несмотря на высокую чувствительность и селективность, реализация этих методов сопряжена с долгой пробоподготовкой и трудозатратами, а также необходимостью дорогостоящего оборудования и специально обученного персонала [17, 18]. В этой связи востребованы быстрые аналитические методы, сочетающие высокую специфичность, чувствительность и надежность.

К таким методам можно отнести иммунохимические [19–23], в частности иммуноферментный анализ (ИФА) [24–26], в основе которых лежит реакция антиген-антитело. ИФА широко используется для обнаружения различных органических загрязнителей в экологическом мониторинге [27–29], что подтверждает преимущества метода, связанные со скоростью и производительностью. Как правило, для определения низкомолекулярных органических загрязнителей реализуется конкурентная схема ИФА с мечением ферментом антигена или антител против анализируемого соединения. Так, для определения ДБФ в водных средах разработан ряд систем ИФА с различными модификациями, направленными на повышение аналитических характеристик [30–32]. Однако, помимо предварительной иммобилизации антигена, ИФА занимает, как правило, не менее 3 ч с двумя продолжительными стадиями инкубации. Для ряда аналитов описан и успешно применен кинетический формат ИФА с сокращением продолжительности стадий [33, 34]. Отмечены также возможности ки-

нетических иммуноаналитических систем в управлении селективностью определения [35]. Тем не менее, традиционно используются иммуноферментные системы с продолжительностью взаимодействия антиген-антитело не менее часа на каждой стадии, что обеспечивает достижение химического равновесия.

**Цель работы** – разработка ИФА дибутилфталата в кинетическом режиме, определение его аналитических характеристик и селективности, а также апробация при тестировании образцов соков.

## МЕТОДИКА

**Реактивы.** Для приготовления калибровочных и контрольных растворов использовали дибутилфталат (ДБФ), монобутилфталат, диэтилфталат, монооктилфталат, моно-2-октилфталат, диоктилфталат, монобензилфталат, моноциклогексилфталат, монометилфталат, диметилфталат, дигептилфталат, дифенилфталат и фталевую кислоту фирмы “Sigma-Aldrich” (США).

Для получения конъюгата гаптен-белок использовали 4-амино-дибутилфталат (4-амино-ДБФ), синтезированный и предоставленный профессором Чжао (Гуандунский технологический университет, Гуанчжоу, Китай), соевый ингибитор трипсина (СИТ) и овальбумин (ОВА) фирмы “Sigma-Aldrich” (США), диметилсульфоксид (ДМСО), соляную кислоту и нитрит натрия (“Химмед”, Россия).

Для проведения ИФА использовались следующие реагенты: конъюгат БСА-ДБФ, мышинные моноклональные антитела (мАт) к ДБФ производства “Creative Diagnostics” (США), антивидовые (иммуноглобулины козы, связывающие иммуноглобулины мыши) антитела, меченные пероксидазой хрена (“Jackson ImmunoResearch, США”), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ, ЗАО “НВО Иммунотех”, Россия), Твин-20 (“Sigma-Aldrich”, США) и серная кислота (“Химмед”, Россия), а также 96-луночные прозрачные микропланшеты Costar 9018 (“Corning Costar”, США).

Все растворы готовили с использованием деионизованной воды Milli Q (сопротивление 18 МОм·см), полученной с помощью системы очистки воды Simplicity (“Millipore”, США).

**Оборудование.** Спектры поглощения конъюгата ОВА-ДБФ и оптические плотности измеряли в лунках микропланшетов с помощью многофункционального планшетного анализатора EnSpire Multimode Plate Reader (“PerkinElmer”, США). Спектр ИК-Фурье ОВА-ДБФ регистрировали в диапазоне 400–4000 см<sup>-1</sup> с использованием FTIR-спектрофотометра FT/IR-6700 (“JASCO”, Япония) при комнатной температуре.

**Получение конъюгата овальбумин-дибутилфталат (ОВА-ДБФ).** Синтез конъюгата ОВА-ДБФ основан на реакции азосочетания, в которой первичные аминогруппы используемого производного дибутилфталата (4-амино-ДБФ) реагируют с карбоксильными группами белка-носителя. Для

этого к 5.8 мг 4-амино-ДБФ, растворенного в 25 мкл ДМСО, при 0°C добавляли 12.5 мкл 31%-ной соляной кислоты, 375 мкл Н<sub>2</sub>О, 15 мкл Твин-20 и 0.5 мл раствора нитрита натрия с концентрацией 2.75 мг/мл. К полученной смеси добавляли 10 мг овальбумина (белок-носитель), растворенного в 5 мл 0.1 М боратного буфера, рН 8.3, после чего цвет реакционной смеси изменялся на желто-коричневый. После инкубации в течение 2 ч при комнатной температуре проводили диализ против 10 мМ фосфатного буфера, рН 7.4. Концентрацию препарата ОВА-ДБФ рассчитывали по белку-носителю, исходя из спектров поглощения. Полученный конъюгат ОВА-ДБФ разделяли на аликвоты и хранили при –20°C до использования. Мольное соотношение ОВА : ДБФ при синтезе составляло 1 : 60.

**Иммуноферментный анализ дибутилфталата.** Иммуобилизацию конъюгата ОВА-ДБФ, растворенного в 50 мМ фосфатном буфере с 0.1 М соли натрия хлорида (ФБС), рН 7.4 проводили, внося его в концентрации 3.0 мкг/мл по 100 мкл в лунки микропланшета и инкубируя в течение ночи при 4°C. Затем микропланшет три раза промывали ФБС, содержащим 0.05% Твин-20 (ФБСТ). На первой стадии ИФА варьировали концентрацию моноклональных антител, специфичных к ДБФ. Различные разведения антител добавляли для взаимодействия с адсорбированным конъюгатом ОВА-ДБФ и инкубировали 1 ч при +37°C. Затем после отмывки добавляли антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (разведение коммерческого препарата 1 : 3000), и инкубировали 1 ч при 37°C. После промывки (три раза ФБСТ и один раз дистиллированной водой) определяли активность ферментной метки, связавшейся с носителем, добавляя 100 мкл раствора субстрата (коммерческий раствор ТМБ + Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>). Реакцию останавливали через 15 мин добавлением 50 мкл 0.1 М Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптическую плотность (ОП) измеряли при 450 нм и строили график зависимости ОП от концентрации антител с использованием программного обеспечения Origin 9.0 (“OriginLab”, США). Концентрацию антител, соответствующую ОП<sub>450</sub> = 1.0, использовали для конкурентного ИФА.

Конкурентный ИФА дибутилфталата и исследование селективности включали те же первоначальные стадии. После иммуобилизации конъюгата ОВА-ДБФ и промывки микропланшета в лунки вносили 50 мкл растворов дибутилфталата (концентрации в диапазоне 3000–0.05 и 0 нг/мл) или альтернативных соединений (в концентрациях от 3000 нг/мл) и 50 мкл мАт-ДБФ (2.35 мкг/мл) в ФБСТ. Время конкурентной стадии было 8, 15, 30 и 60 мин. Заключительные стадии ИФА были как описано выше.

Иммуноферментный анализ с предварительным инкубированием растворов анализата с антителами проводили следующим образом. В микропробирки объемом 500 мкл вносили такие же растворы ДБФ и антител, как и при проведении

конкурентного анализа. Затем по истечении 10, 20 или 30 мин растворы переносили в микропланшет с предварительно иммобилизованным конъюгатом ОВА-ДБФ и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем после отмывки лунок микропланшета добавляли антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (разведение коммерческого препарата 1 : 3000). Время взаимодействия с антивидовым конъюгатом составляло 15, 30, 45 или 60 мин при 37°C. Последующее определение активности связанной ферментной метки проводили, как описано выше.

Параметры кривых определяли на основании четырехпараметрического уравнения сигмоидной зависимости  $y = (A1 - A2)/(1 + (x/x_0)^p) + A2$ . Значения  $IC_{10}$ ,  $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{80}$  рассчитывались как концентрации, ингибирующие аналитический сигнал на 10, 20, 50 и 80% соответственно. Значение  $IC_{10}$  оценивали как предел обнаружения,  $IC_{20}$ – $IC_{80}$  – рабочий диапазон определяемых концентраций.

Значения кросс-реактивности рассчитывали по формуле:  $CR(\%) = IC_{50}(\text{ДБФ})/IC_{50}(\text{аналог}) \times 100\%$ .

**Подготовка образцов сока.** Мандариновый сок получали прямым отжимом. Мандариновые дольки очищали от кожуры и перетирали в чистой фарфоровой ступке пестиком. Затем сок сливали в стеклянную колбу, а мякоть отжимали через марлю. Образцы, содержащие и не содержащие ДБФ, готовили следующим образом. К 1 мл сока добавляли раствор ДБФ, 1 мл метанола и выдерживали в течение 12 ч. Из полученных таким образом искусственно контаминированных и отрицательных неконтаминированных образцов экстрагировали ДБФ. Экстракцию проводили в стеклянных флаконах, затем центрифугировали 15 мин при 10000 g при 4°C, отделяли супернатант и использовали в ИФА.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Синтез конъюгата гаптен-белок и проверка реагентов в ИФА.** Аминопроизводное ДБФ конъюгировали с белком-носителем овальбумином методом азосочетания, как описано в предыдущей работе [21], поскольку ДБФ не имеет функциональных групп, доступных для конъюгирования. Полученный конъюгат характеризовали методами UV-vis и ИК-спектроскопии. Спектральные пики при 277 и 330 нм конъюгата ОВА-ДБФ соответствовали поглощению белка и ковалентно связанного гаптена (рис. 1). Пик поглощения для нативного ДБФ – 295 нм. При синтезе использовали избыток гаптена, поэтому для очистки от несвязавшегося гаптена и компонентов реакционной среды применяли диализ.

На рис. 2 приведены спектры ИК-Фурье исходного овальбумина и его конъюгата с ДБФ, интерпретация которых основана на объяснении колебательных спектров аминокислот, входящих в состав белка. Согласно [36], в колебательных

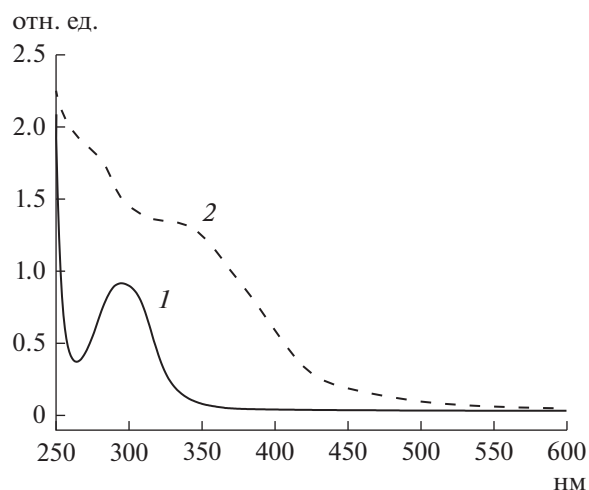


Рис. 1. Спектры поглощения ДБФ (1) и конъюгата ОВА-ДБФ (2).

спектрах белковых молекул можно выделить колебания амидной группы полипептидов, характерные частоты которых находятся в диапазонах 1700–1600, 1575–1480 и 1230–1300  $cm^{-1}$ . Зарегистрированные ИК-спектры демонстрировали полосу поглощения при 1645  $cm^{-1}$  (рис. 2а), обусловленную валентными колебаниями С=О групп пептидных цепей. Такие колебания отражают изменение геометрии молекул, а также возникновение или изменение водородных связей между пептидными группами [37]. Валентные колебания С–N дают ИК-спектре пик при 1549  $cm^{-1}$ . Наличие данной полосы поглощения отражает изгиб NH [38]. Деформационные колебания связи N–H характеризовались полосой при 1248  $cm^{-1}$ . Функциональные группы ДБФ повторялись также и в молекуле конъюгата с имеющимися сложноэфирными связями, что затрудняло индивидуальное распознавание соединений в ИК-спектре. Взаимодействие привело к появлению новых полос 1725, 2920 и 2867  $cm^{-1}$ , связанных с растяжением карбонильной группы сложноэфирной группировки, а также насыщением С–Н симметричных/асимметричных валентных колебаний алкильных групп [39, 40]. Таким образом, ИК-Фурье-спектры подтвердили успешность синтеза конъюгата ОВА-ДБФ.

Полученный конъюгат использовали вместе с другими конъюгатами (СИТ-ДБФ и коммерческим препаратом БСА-ДБФ) для оценки антител в неконкурентном и конкурентном форматах ИФА. Первый вариант применяли для определения концентрации антител, необходимой для проведения конкурентного взаимодействия. Как видно на рис. 3а, антитела связываются со всеми конъюгатами гаптен-белок, но разведения, соответствующие оптической плотности 1.0, различались. Для конъюгатов ОВА-ДБФ, СИТ-ДБФ и БСА-ДБФ эти концентрации составили 1174, 94 и 156.5 нг/мл соответственно, которые и были выбраны для кон-

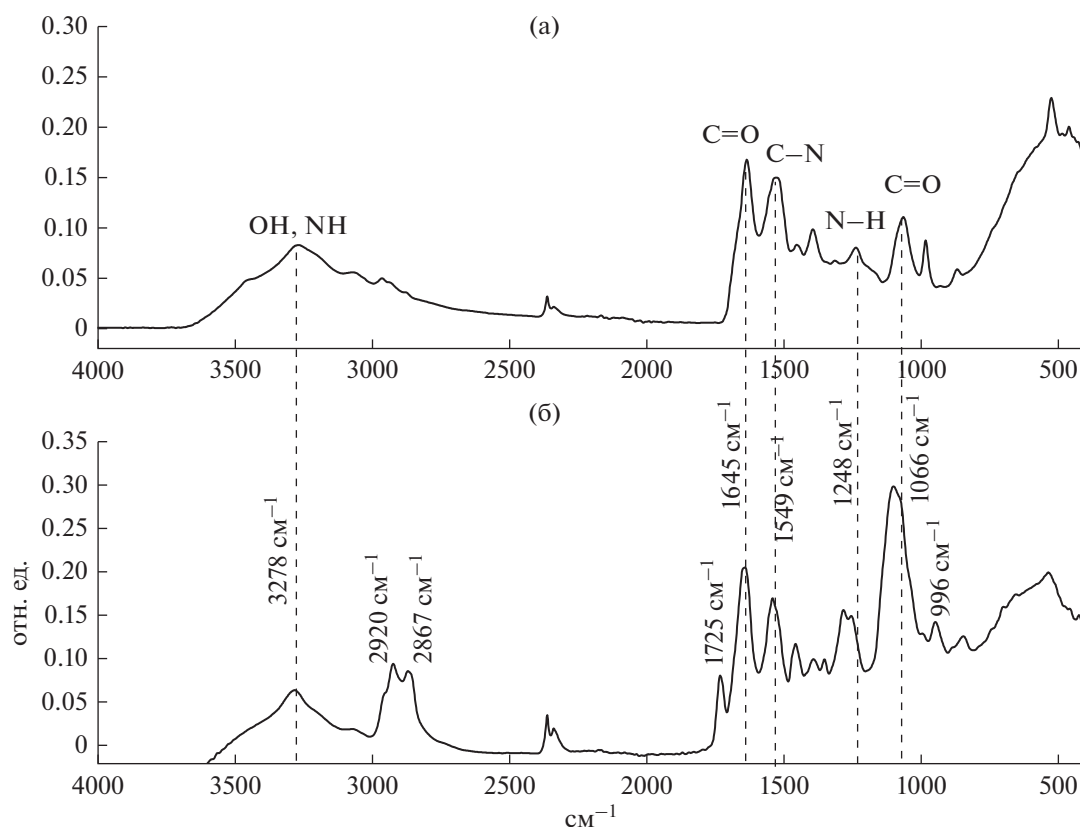


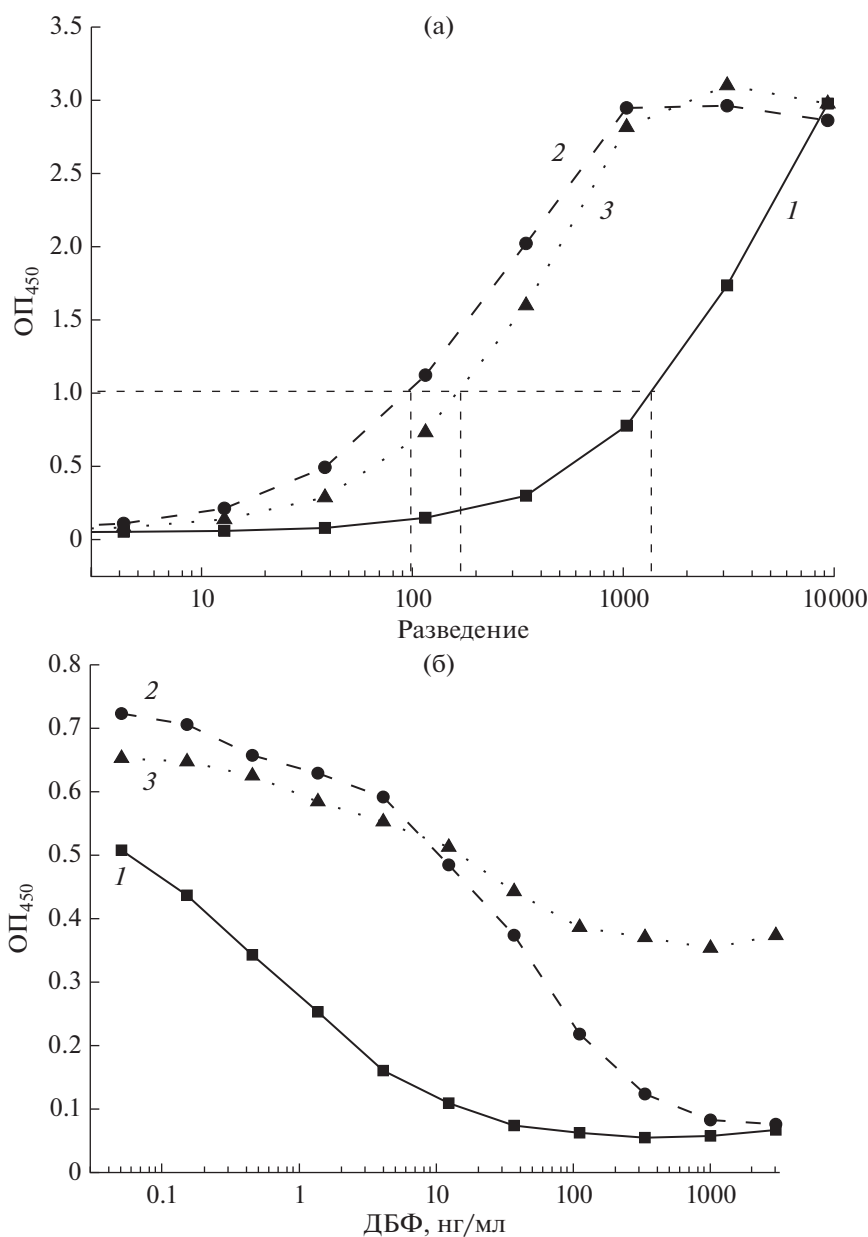
Рис. 2. ИК-спектры нативного ОВА (а) и конъюгата ОВА-ДБФ (б).

курентного ИФА (рис. 3б). Однако конъюгат БСА-ДБФ продемонстрировал высокий фоновый сигнал и низкие соотношения сигнал/фон, тогда как другие два конъюгата были пригодны для использования в ИФА. Отметим, что наиболее чувствительное определение ДБФ обеспечивал конъюгат ОВА-ДБФ, который и был выбран для дальнейшей работы.

**Конкурентный ИФА ДБФ при различных кинетических режимах и выбор оптимального протокола.** Выбранная пара иммунореагентов (антитела и конъюгат ОВА-ДБФ) использовалась в конкурентном ИФА при времени конкурентного взаимодействия 8, 15, 30 и 60 мин (рис. 4). Как видно на рис. 4а, с течением времени происходило нарастание оптической плотности и увеличение соотношения сигнал/фон. Проведение конкурентной стадии в течение 8 и 15 мин было исключено в связи с недостоверностью получаемых данных. Слишком узкий диапазон определяемых концентраций и низкие отношения сигнал/фон не позволяли различить образцы, содержащие и не содержащие ДБФ. Значения ошибок для режимов 8 и 15 мин составили 4–11 и 3–19% соответственно. Однако за 30 мин в системе устанавливалось равновесие, рабочий диапазон ( $IC_{20}$ – $IC_{80}$ ) составлял от 0.4 до 100 нг/мл с пределом обнаружения 0.15 нг/мл. Значения среднеквадратичных отклонений в этом диапазоне – 4.4–8.3%. При проведении конкурентной реакции в течение 60 мин

происходило еще большее возрастание сигнала с одновременным сужением и смещением рабочего диапазона до 0.5–40 нг/мл с пределом обнаружения 0.3 нг/мл. Значения среднеквадратичных отклонений в этом диапазоне составили 0.4–11%. С учетом широты линейного диапазона и значений предела обнаружения время проведения конкурентной реакции было выбрано равным 30 мин.

Для выбора оптимального протокола взаимодействия в иммуноферментной системе рассматривались также варианты с предварительным инкубированием антигена (ДБФ) со специфическими антителами, а также сокращение времени взаимодействия с антивидовыми антителами, мечеными пероксидазой. Стадия предварительного инкубирования проводилась вне микропланшета в микропробирках для разделения во времени взаимодействия антител со свободным и конъюгированным ДБФ. С увеличением времени предварительного взаимодействия предел обнаружения возрастал с 0.3 до 0.71 нг/мл, но рабочий диапазон определяемых концентраций становился шире (см. табл. 1). По сравнению с экспериментом без предынкубации, в котором диапазон концентраций составил 0.95–47.5 нг/мл, при времени выдерживания реакционной смеси 30 мин рабочий диапазон составил 1.82–82.83 нг/мл. Однако значение  $IC_{50}$  при этом возросло с 6.7 до 12.3 нг/мл. Таким образом, стадия предварительного инкубирования не только увеличивала время анализа, но и ухуд-



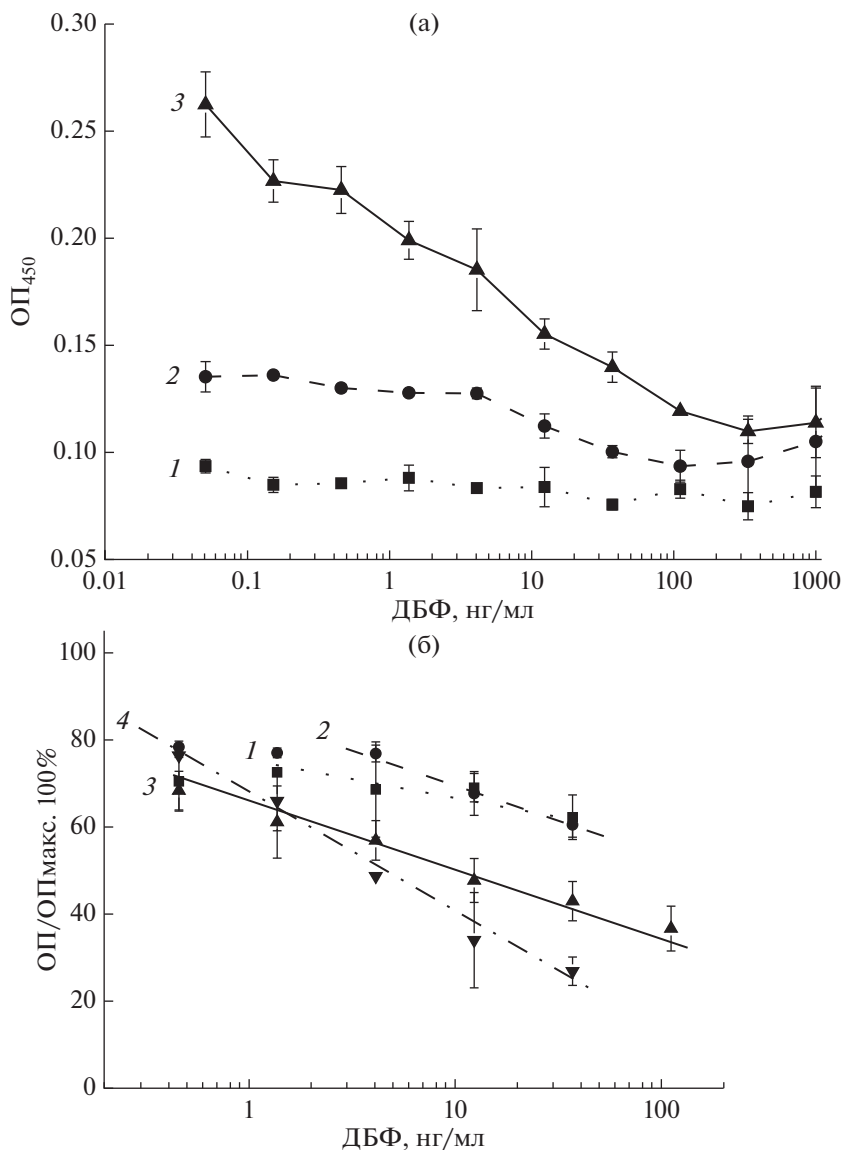
**Рис. 3.** Характеристика антител методом ИФА: а – титрование антител, б – кривые конкурентного взаимодействия: 1 – конъюгат ОВА-ДБФ, 2 – СИТ-ДБФ, 3 – БСА-ДБФ.

шила чувствительность определения ДБФ. Поэтому дальнейшие эксперименты проводили без использования этой стадии.

При выбранном времени конкурентного взаимодействия (30 мин) оптимизировали условия взаимодействия с антивидовым конъюгатом. Обычно продолжительность этой стадии в ИФА составляет 45–60 мин. Однако эксперимент показал, что с увеличением продолжительности стадии увеличился предел обнаружения с 0.08 нг/мл для инкубации в течение 15 мин до 0.64 нг/мл для 45 мин (табл. 1). Ухудшались и другие аналитические характеристики –  $IC_{50}$  и ширина диапазона определяемых концентраций, поэтому время взаимо-

действий на данной стадии было выбрано равным 15 мин, а общая продолжительность ИФА составила 45 мин.

**Изучение селективности ИФА.** Для оценки селективности анализа были исследованы в качестве конкурентов тринадцать соединений, являющихся гомологами, метаболитами либо продуктами частичного гидролиза ДБФ, поскольку химические структуры многих фталатов очень сходны. Из всех изученных соединений только диэтилфалат продемонстрировал незначительный уровень кросс-реактивности (0.001%); другие моно- и дизамещенные производные, а также фталевая кислота не показали достоверных кросс-реакций. С близки-



**Рис. 4.** Концентрационные зависимости ИФА ДБФ при разной длительности конкурентного взаимодействия: а – абсолютные значения оптической плотности, б – значения оптической плотности в % и рабочие диапазоны ИФА: 1 – 8 мин, 2 – 15 мин, 3 – 30 мин, 4 – 60 мин.

ми гомологами, например, диоктилфталатом, перекрестные взаимодействия не наблюдались, хотя это соединение отличается от ДБФ лишь длиной радикала. Таким образом, разработанный ИФА высокоселективен по отношению к целевому аналиту – ДБФ.

**Применение ИФА для тестирования образцов соков.** Для анализа использовали свежевыжатый мандариновый сок, в котором, в отличие от коммерческих продуктов, отсутствуют стабилизирующие и консервирующие агенты и исключено вымывание фталатов из упаковочного материала [41–43]. Исключив эти риски, рассматривали образцы с добавленным ДБФ и сопоставляли способы получения экстрактов для изучения влияния окружения на экстракцию ДБФ. Экстракцию

проводили в метаноле в стеклянной бюксе в темноте (экстракт 1), в пластиковой пробирке (экстракт 2) и используя перенос экстракта, полученного в стекле, в пластиковую пробирку с хранением в течение ночи (экстракт 3). После экстракции образцы центрифугировали для удаления остатков мякоти и присутствующих в ней нерастворимых соединений. Параллельно были получены экстракты сока без добавления ДБФ (отрицательные образцы). Эти образцы использовали для оценки влияния матрикса. Если экстракция проходила полностью, без потерь аналита, то кривые в чистом матриксе, в который вводили ДБФ непосредственно перед анализом, и в образце после экстракции должны были совпадать. Как видно из табл. 2, способ получения и хранения экстракта имел большое значение при работе с фталатами. Проведение

**Таблица 1.** Аналитические характеристики при различных режимах ИФА ДБФ

Продолжительность взаимодействия, мин	IC <sub>10</sub> , нг/мл	IC <sub>20</sub> , нг/мл	IC <sub>80</sub> , нг/мл	IC <sub>50</sub> , нг/мл	Параметры сигмоидных кривых
С предварительным инкубированием антиген – антитело					
10	0.53	1.36	33.17	6.71	A1 = 0.43 A2 = 0.18 x <sub>0</sub> = 6.71 p = 0.87
20	0.71	1.98	65.16	11.37	A1 = 0.37 A2 = 0.12 x <sub>0</sub> = 11.37 p = 0.79
30	0.60	1.82	82.83	12.28	A1 = 0.42 A2 = 0.14 x <sub>0</sub> = 12.28 p = 0.73
Стадия взаимодействия с антивидовым конъюгатом					
15	0.08	0.37	68.34	5.01	A1 = 0.17 A2 = 0.06 x <sub>0</sub> = 5.01 p = 0.53
30	0.12	0.47	48.95	4.77	A1 = 0.27 A2 = 0.08 x <sub>0</sub> = 4.77 p = 0.60
45	0.64	1.70	48.95	9.14	A1 = 0.33 A2 = 0.11 x <sub>0</sub> = 9.14 p = 0.83
60	0.30	0.95	47.45	6.70	A1 = 0.24 A2 = 0.11 x <sub>0</sub> = 6.70 p = 0.71

экстракции в стеклянной емкости позволило достоверно обнаружить ДБФ, процент обнаружения составил 75–98%. Значительные сложности с выявлением целевого анализа наблюдались при проведении экстракции в пластиковой пробирке: в экстрактах обнаруживалось лишь 2–5% от исходной концентрации ДБФ. При переносе экстракта из стекла в пластиковую пробирку и выдерживании в течение 8–10 ч при 4°C также происходили существенные потери: обнаруживалось только 20–40% от исходного количества. Вероятно, имела место неспецифическая сорбция ДБФ на стенки пробирок, что обуславливало снижение концентрации ДБФ в экстрактах. Из полученных результатов следует, что необходимо предпочтительно и готовить, и хранить экстракты в стеклянных емкостях, поскольку состав пластиковых материалов может существенным образом влиять на экстракцию и сорбцию–десорбцию. Однако это условие не учитывается в публикациях по детек-

ции фталатов в различных образцах, что вызвало необходимость изучения при проведении данной работы.

Сравнение с ранее разработанными ИФА дибутилфталата (табл. 3) показало, что проведенная работа позволила сократить продолжительность анализа без потери чувствительности в 4 раза. Использование альтернативных меток вместо пероксидазы в работах [44, 45] увеличивало чувствительность анализа, но не сокращало его продолжительность. Установлено, что испытанный ИФА может быть использован для тестирования образцов соков и перспективен для разработки и применения.

Таким образом, впервые разработан кинетический иммуноферментный анализ ДБФ. Проведено сравнение параметров ИФА при варьировании длительности конкурентной стадии, выбранное время – 30 мин. Показана селективность



**Таблица 2.** Результаты ИФА ДБФ в искусственно контаминированных образцах мандаринового сока при экстракции метанолом в разных условиях

Добавлено, нг/мл	Обнаружено					
	экстракт 1		экстракт 2		экстракт 3	
	нг/мл	%	нг/мл	%	нг/мл	%
1	0.75	75	<0.1	НД*	<0.1	НД*
10	8.7	87	0.2	2.0	4.0	40
50	44	88	1.0	2.0	10	20
100	98	98	5.0	5.0	20	20

\* НД – не детектируется

**Таблица 3.** Характеристики определения ДБФ методом ИФА

Вид и продолжительность ИФА	Предел обнаружения, нг/мл	Рабочий диапазон, нг/мл	Образец	Ссылка
Классический, 3 ч	4.0	НД	Молоко, вода, напитки	[31]
ИФА с двойным сигналом, 3 ч	3.9	7–167	Вода	[44]
ИФА с двойным сигналом, 3 ч	0.24	1.0–145	Вода и напитки	[45]
Классический, 3 ч	21.5	НД	Спиртные напитки	[46]
Классический, 3 ч	10.5	25.2–445	Озерная вода	[47]
Кинетический ИФА, 45 мин	0.08	0.37–68.34	Соки цитрусовых	Данная работа

разработанного ИФА к ДБФ и его пригодность для тестирования фруктовых соков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-14-00306).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chen Y., He Q., Shen D., Jiang Zh., Eremin S.A., Zhao S. // *Food Control*. 2019. V. 105. P. 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.052>
- Huang Zh., Tu Ch., Liu H., Wang L., Zhu Z., Watanabe I. // *J. Chromatogr. A*. 2020. V. 1619. Article 460953. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460953>
- Yan Y., Lu Y., Wang B., Gao Y., Zhao L., Liang H., Wu D. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2018. V. 10. № 31. P. 26539–26545. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b08934>
- Tang M., Wu Y., Deng D., Wei J., Zhang J., Yang D., Li G. // *Sens. Actuators B Chem.* 2018. V. 258. P. 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.120>
- Giuliani A., Zuccarini M., Cichelli A., Khan H., Reale M. // *Int. J. Environ. Health Res.* 2020. V. 17. № 16. Article 5655. <https://doi.org/10.3390/ijerph17165655>
- Zhou Y., Li J., Zhang L., Ge Z., Wang X., Hu X., Xu T., Li P. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. V. 411. № 22. P. 5691–5701. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01947-3>
- Luo H., Liu C., He D., Sun J., Li J., Pan X. // *Sci. Total Environ.* 2022. V. 849. Article 157951. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157951>
- Guo W., Li J., Luo M., Mao Y., Yu X., Elskens M., Baeyens W., Gao Y. // *Water Res.* 2022. V. 214. Article 118189. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118189>
- Zhu N., Zou Y., Huang M., Dong S., Wu X., Liang G., Han Z., Zhang Z. // *Talanta*. 2018. V. 186. P. 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.023>
- Baranovskaya V.S., Berlina A.N., Eremin S.A. // *J. Anal. Chem.* 2022. V. 77. № 4. P. 466–472. <https://doi.org/10.1134/S1061934822040037>
- Montuori P., Jover E., Morgantini M., Bayona J.M., Triassi M. // *Food Addit. Contam. – Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 2008. V. 25. № 4. P. 511–518. <https://doi.org/10.1080/02652030701551800>
- Adeniyi A.A., Okedeyi O.O., Yusuf K.A. // *Environ. Monit. Assess.* 2011. V. 172. № 1. P. 561–569. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1354-2>
- Luís C., Algarra M., Câmara J.S., Perestrelo R. // *Toxicol. Rep.* 2021. V. 9. № 7. Article 157. <https://doi.org/10.3390/toxics9070157>
- Otero P., Saha S.K., Moane S., Barron J., Clancy G., Murray P. // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2015. V. 997. P. 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.05.036>
- Barciela-Alonso M.C., Otero-Lavandeira N., Bermejo-Barrera P. // *Microchem. J.* 2017. V. 132. P. 233–237. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.007>
- Sakaki J.R., Melough M.M., Provatas A.A., Perkins Ch., Chun O.K. // *Toxicol. Rep.* 2020. V. 7. P. 1020–1024. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.015>
- Wang X., Chen Ch., Chen Y., Kong F., Xu Zh. // *Food Agric. Immunol.* 2020. V. 31. № 1. P. 811–836. <https://doi.org/10.1080/09540105.2020.1774746>
- Liu S., Cheng R., Chen Y., Shi H., Zhao G. // *Sens. Actuators B Chem.* 2018. V. 254. P. 1157–1164. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.08.003>
- Zhang Z., Zeng K., Liu J. // *Trends Anal. Chem.* 2017. V. 87. P. 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.12.002>
- Li J., Jin H., Wei M., Ren W., Wang J., Zhang Y., Wu L., He B. // *Sens. Actuators B Chem.* 2021. V. 331. Article 129401. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129401>
- Berlina A.N., Ragozina M.Y., Komova N.S., Serebrennikova K.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Biosensors*.

2022. V. 12. № 11. Article 1002.  
<https://doi.org/10.3390/bios12111002>
22. Xu F., Ren K., Yang Y.-Z., Guo J.-P., Ma G.-P., Liu Y.-M., Lu Y.-Q., Li X.-B. // *J. Integr. Agric.* 2015. V. 14. № 11. P. 2282–2295.  
[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61121-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61121-2)
  23. Sanchis A., Salvador J.P., Marco M.P. // *Trends Anal. Chem.* 2018. V. 106. P. 1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.015>
  24. Sun R., Zhuang H. // *Food Anal. Methods.* 2015. V. 8. № 8. P. 1990–1999.  
<https://doi.org/10.1007/s12161-014-0085-3>
  25. Jaria G., Calisto V., Otero M., Esteves V.I. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. V. 412. № 17. P. 3983–4008.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02509-8>
  26. Dou L., Zhang Y., Bai Y., Li Y., Liu M., Shao Sh., Li Q., Yu W., Shen J., Wang Zh. // *J. Agric. Food Chem.* 2022. V. 70. № 4. P. 976–991.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06750>
  27. Huebner M., Weber E., Niessner R., Boujday S., Knopp D. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407. № 29. P. 8873–8882.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-015-9048-9>
  28. Chen Y., Li J., Lu P., Hu D., Xue W., Ding X. // *Food Agric. Immunol.* 2017. V. 28. № 5. P. 904–915.  
<https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1320356>
  29. Liu Z., Zhang Z., Zhu G., Sun J., Zou B., Li M., Wang J. // *Sci. Total Environ.* 2016. V. 551–552. P. 484–488.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.017>
  30. Xiong Y., Leng Y., Li X., Huang X., Xiong Y. // *TrAC Trends Analyt. Chem.* 2020. V. 126. Article 115861.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115861>
  31. Zhang Zh., Zhu N., Zou Y., Wu X., Qu G., Shi J. // *Talanta.* 2018. V. 179. P. 64–69.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.051>
  32. Zhou L., Lei Y., Zhang D., Ahmed S., Chen S. // *Sci. Total Environ.* 2016. V. 541. P. 570–578.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.110>
  33. Yanagisawa N., Dutta D. // *Biosensors.* 2011. V. 1. № 2. P. 58–69.  
<https://doi.org/10.3390/bios1020058>
  34. Urusov A.E., Zherdev A.V., Petrakova A.V., Sadykhov E.G., Koroleva O.V., Dzantiev B.B. // *Toxins.* 2015. V. 7. № 2. P. 238–254.  
<https://doi.org/10.3390/toxins7020238>
  35. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Zvereva E.A., Eremin S.A., Dzantiev B.B. // *Appl. Sci.* 2021. V. 11. № 14. Article 6581.  
<https://doi.org/10.3390/app11146581>
  36. Wang Y., He C.H., Zheng H., Zhang H.B. // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. № 1. P. 84–96.  
<https://doi.org/10.3390/ijms13010084>
  37. Campanella B., Palleschi V., Legnaioli S. // *ChemTexts.* 2021. V. 7. № 1. P. 1–21.  
<https://doi.org/10.1007/s40828-020-00129-4>
  38. Kong J., Yu S. // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2007. V. 39. № 8. P. 549–559.  
<https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>
  39. Ramesh S., Yin T.S., Liew C.-W. // *Ionics.* 2011. V. 17. № 8. P. 705–713.  
<https://doi.org/10.1007/s11581-011-0568-9>
  40. Rajamanikyam M., Vadlapudi V., Parvathaneni S.P., Koude D., Sripadi P., Misra S., Amanchy R., Upadhyaya S.M. // *EXCLI J.* 2017. V. 16. P. 375–387.  
<https://doi.org/10.17179/excli2017-145>
  41. Ye X., Wang P., Wu Y., Zhou Y., Sheng Y., Lao K. // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020. V. 27. № 33. P. 42082–42091.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-10136-0>
  42. Xu Zh., Xiong X., Zhao Y., Xiang W., Wu Ch. // *J. Hazard. Mater.* 2020. V. 384. Article 121282.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121282>
  43. Rastkari N., Jeddi M.Z., Yunesian M., Ahmadkhaniha R. // *J. Environ. Health Sci. Eng.* 2018. V. 16. № 1. P. 27–33.  
<https://doi.org/10.1007/s40201-018-0292-8>
  44. Zhu F., Zhang H., Qiu M., Wu N., Zeng K., Du D. // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 695. Article 133793.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133793>
  45. Xiong D., Zhu N., Zhu F., Yakubu S., Lv J., Liu J., Zhang Z. // *J. Hazard. Mater.* 2022. V. 425. Article 127991.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127991>
  46. Kuang H., Liu L., Xu L., Ma W., Guo L., Wang L., Xu C. // *Sensors.* 2013. V. 13. № 7. P. 8331–8339.  
<https://doi.org/10.3390/s130708331>
  47. Wei C., Ding S., You H., Zhang Y., Wang Y., Yang X., Yuan J. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 12. Article e29196.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029196>

## Development of Kinetic Microplate Immunoenzyme Determination of Dibutyl Phthalate

A. N. Berlina<sup>a</sup>, K. V. Serebrennikova<sup>a</sup>, N. S. Komova<sup>a</sup>, A. V. Zherdev<sup>a</sup>, and B. B. Dzantiev<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> A.N. Bach Institute of Biochemistry. Research Center of Biotechnology  
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Phthalic acid esters are integral components of modern plastic products and packaging materials, which causes significant contamination of food products and the environment, leading to the need for simple productive monitoring methods. The article presents a rapid enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of dibutyl phthalate (DBP) in fruit juices, based on the competitive interaction between free and bound antigen for the binding sites of specific antibodies. The analytical characteristics of the method were studied in various kinetic regimes of the competition stage. Optimal conditions have been established to ensure the minimum detection limit and high measurement accuracy. The duration of the competitive stage of ELISA was chosen 30 min; the range of determined concentrations of DBP was from 0.37 to 68.34 ng/mL with a detection limit of 0.08 ng/mL. The efficiency of the proposed ELISA for testing fruit juices was shown for the chosen DBP extraction mode.

**Keywords:** immunoenzyme assay, kinetics of immune interactions, dibutyl phthalate, food safety, fruit juice, extraction, ecotoxicant

## ПОЗДРАВЛЯЕМ ЮБИЛЯРА. ВЛАДИМИРУ ОЛЕГОВИЧУ ПОПОВУ 70 ЛЕТ

DOI: 10.31857/S0555109923030224, EDN: SISVWG



Академик Владимир Олегович Попов – известный ученый, ведущий специалист в области структурной биологии, био- и нанотехнологии, структурно-функциональных исследований белков, крупный организатор науки, автор более 350 научных работ, многочисленных авторских свидетельств и патентов.

В.О. Попов родился 1 мая 1953 г. в г. Алма-Ате, с отличием окончил среднюю школу в г. Калинин (Твери) и поступил на химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, который окончил также с отличием по только что образованной его учителем и наставником – деканом Химфака профессором И.В. Березиным, кафедре химической энзимологии. С 1975 г. Владимир Олегович работал на той же кафедре вначале стажером-исследователем, а затем младшим научным сотрудником. В 1978 г. он защитил кандидатскую диссертацию, а с 1981 г. продолжил работу также под руководством И.В. Березина уже в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, где в 1987 г. успешно защитил докторскую диссертацию. В 1991 г. в Институте

была организована новая лаборатория инженерной энзимологии, которую и возглавил молодой доктор наук. В этот период В.О. Попов неоднократно проходил научные стажировки и работал за рубежом: в 1984–1985 гг. в Великобритании в Королевском колледже Лондона, 1989–1990 гг. в Институте катализа г. Мадрида и Свободном университете Западного Берлина, в 1995 г. в Бельгии и Великобритании, по программе TACIS Management.

В 1997 г. Владимир Олегович получает звание профессора и в следующем году становится заместителем директора по науке Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, а с 2001 г. благодаря отличным организационным способностям и проявленной энергии избирается коллективом Института директором Института биохимии им. А.Н. Баха. С 2007 г. В.О. Попов становится профессором кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. В 2009 г. он возглавил также отдел “Белковая фабрика” НБИКС-Центра НИЦ Курчатовский институт. Большая и плодотворная научная и на-

учно-организационная деятельность получила свое признание – Владимир Олегович был выдвинут и избран в 2011 г. членом-корреспондентом РАН, а в 2019 – академиком Российской академии наук.

Неудивительно, что, когда в 2015 г. три института Российской академии наук были объединены и преобразованы в Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН), самым достойным кандидатом на роль его руководителя, способным справиться с неожиданными и сложными задачами переходного периода, был В.О. Попов. Многие из возникавших проблем приходилось решать впервые, интегрировать различные направления деятельности Центра для достижения общих научных целей, запускать новые масштабные проекты. За время его руководства коллективом произошли положительные изменения практически по всем направлениям деятельности Центра. В.О. Попов пользуется высоким авторитетом и поддержкой среди сотрудников ФИЦ Биотехнологии РАН. С 2019 г. он – Научный руководитель Центра.

Основные научные интересы В.О. Попова связаны с изучением структуры и механизма действия ферментов. Он является одним из ведущих специалистов в области структурно-функционального исследования белков, структурной биологии и нанобиотехнологии. За последние годы в его лабораториях в Институте биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН и НБИКС-Центре НИЦ Курчатовский институт получено около 100 структур белков и белковых комплексов высокого разрешения, выяснена структура и механизм действия сложных биологических наномашин и ряда практически важных биокатализаторов. Проведен обширный цикл работ по исследованию структуры и механизма действия NAD-зависимых дегидрогеназ, трансминаз и металлоферментов, мультигемовых цитохромов, выяснению структурных основ экстремофильных свойств белков, осуществлен комплекс исследований ростовых факторов и белков, имеющих потенциальное терапевтическое значение. К самым последним достижениям относится открытие нового, ранее не известного и не описанного фермента (тиоцианатдегидрогеназы) и нового для биологии каталитического медного кластера.

Заслуги В.О. Попова в области структурной биологии были отмечены премией РАН им. Е.С. Федорова в 2018 г.

Важное место в работах В.О. Попова занимают работы по бионике. С его участием разработаны имплантируемые биоэлектроды и биотопливные элементы на основе нанокompозитных материа-

лов, обеспечивающие трансформацию метаболической энергии реакций, протекающих в живых организмах, в электрическую. В.О. Попов является одним из ведущих разработчиков отечественной системы нанобезопасности. Под его руководством создан набор методик, используемых при определении биобезопасности нанообъектов.

Научные разработки В.О. Попова внедрены в реальный сектор экономики. Под его руководством создана технология биологической очистки воздуха от техногенных выбросов летучих органических соединений. За данный цикл работ В.О. Попов был удостоен премии правительства Российской Федерации в области науки и техники в 1997 г. В 2010 г. за внедрение в отечественную практику биотехнологических методов анализа для решения социально значимых задач неонатального скрининга, контроля наркопотребления и безопасности продуктов питания он был повторно удостоен премии правительства Российской Федерации в области науки и техники.

Многогранную научную деятельность В.О. Попов успешно сочетает с общественной и научно-педагогической работой: заведует кафедрой синтетической биологии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Под его руководством подготовлено 16 кандидатов наук, защищена 1 докторская диссертация.

Большое внимание Владимир Олегович уделяет работе в журнале “Прикладная биохимия и микробиология”, главным редактором которого является, а также в ежегоднике “Успехи биологической химии” в качестве заместителя главного редактора, работает в редколлегиях журналов “Российские нанотехнологии”, “Биохимия” и “Acta Naturae”. Владимир Олегович представляет Россию в Публикационном комитете IUBMB, International Union of Biochemistry and Molecular Biology.

В течение ряда лет академик В.О. Попов принимает участие в научных советах, комиссиях и комитетах, которые определяют развитие биотехнологии в России. Он является Председателем Ученого совета ФИЦ Биотехнологии РАН, входит в состав Научных советов РАН по проблемам биотехнологии и физико-химической биологии, является бессменным руководителем национального контактного центра России по направлению “Биотехнология, сельское хозяйство и пища” Европейской рамочной программы, координатором российской технологической платформы “Биоиндустрия и биоресурсы”, членом Президиума Совета по присуждению премий Правительства РФ, руководителем секции “Био-, экотехнологии и охрана окружающей среды”, членом Президиума ВАК, представляет Российскую Федерацию в Рабочей группе по Био- нано- и конвергентным технологиям ОЭСР.

Немало усилий Владимир Олегович прикладывает для укрепления и развития сотрудничества российской науки с мировым научным сообществом, организуя и поддерживая совместные проекты с зарубежными лидерами в области биотехнологии. Среди наиболее значимых и масштабных международных проектов можно отметить проект Седьмой рамочной программы Европейского союза “PROSPARE” (“PROgress in Saving Proteins and Recovering Energy”), где в консорциуме Россия-Бельгия-Италия В.О. Попов являлся соруководителем проекта и руководителем российской части консорциума, а также проекты “THERMOGENE” (“Novel thermostable enzymes for industrial biotechnology”), который выполнялся с 2013 по 2016 гг. при участии ученых России, Великобритании, Германии, Норвегии, и российско-германский проект “LASEROMIX”

(“Research and development for biological XFEL experiments”), 2014–2017 гг.

Заслуги В.О. Попова в развитии отечественной науки, биотехнологии и его большая научно-организационная деятельность были также отмечены медалью ордена “За заслуги перед Отечеством” II степени.

Руководство и сотрудники ФИЦ Биотехнологии РАН, редколлегия и сотрудники редакции сердечно поздравляют Владимира Олеговича с юбилеем, благодарят его за огромный вклад в создание Центра и развитие биологической науки, и желают ему крепкого здоровья и дальнейших успехов, научного вдохновения и новых ярких достижений – как в области структурной биологии и биотехнологии, так и в его многогранной общественной деятельности.

*Редколлегия ФИЦ Биотехнологии РАН*