

ISSN 2227-2925 (print)
ISSN 2500-1558 (online)

12+

Том 13 N 4

2023



ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ

**Прикладная химия
и биотехнология**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ

ИРКУТСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия
и биотехнология

Том 14 N 1 (48) 2024



ИЗДАТЕЛЬСТВО
Иркутского национального исследовательского
технического университета



ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
ПРИКЛАДНАЯ ХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ
Том 14 N 1 (48) 2024

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор:
Евстафьев С.Н.

д.х.н., профессор, заведующий кафедрой химии и биотехнологии Иркутского национального исследовательского технического университета (г. Иркутск, Россия)

Заместитель главного редактора:
Львов А.Г.

д.х.н., ведущий научный сотрудник кафедры химии и биотехнологии Иркутского национального исследовательского технического университета (г. Иркутск, Россия)

Члены редакционной коллегии:

Боровский Г.Б.

д.б.н., профессор, заместитель директора Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск, Россия)

Братская С.Ю.

д.х.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией сорбционных процессов Института химии ДВО РАН (г. Владивосток, Россия)

Варфоломеев С.Д.

д.х.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (г. Москва, Россия)

Верпоорт Фрэнсис

доктор наук, профессор кафедры экологических технологий, пищевых технологий и молекулярной биотехнологии, Гентский Университет Глобал Кампус (филиал в Корее), (г. Инчхон, Корея)

Воронов В.К.

д.х.н., профессор, Заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры информатики Иркутского национального исследовательского технического университета (г. Иркутск, Россия)

Го Эн-зюнь

профессор, заведующий лабораторией координационной химии Шеньянского института химической технологии (г.Шеньян, Китай)

Дадашев М.Н.

д.т.н., профессор, главный научный сотрудник кафедры физической и коллоидной химии Российского государственного университета нефти и газа им. И.М. Губкина (г. Москва, Россия)

Иоелович М.Я.

д.х.н., профессор, руководитель химического отдела биотехнологической компании "Celdesigner" (г. Реховот, Израиль)

Непомнящих А.И.

д.ф.-м.н., профессор, Заслуженный деятель науки РФ, заместитель директора Института геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН (г. Иркутск, Россия)

Никольшин П.А.

д.х.н., зам. генерального директора по науке АО «Всероссийский научно-исследовательский институт по переработке нефти» (г. Москва, Россия)

Пуревсурен Б.

доктор наук, академик АН Монголии, заведующий лабораторией химии угля Института химии и химической технологии АН Монголии (г.Улан-Батор, Монголия)

Рахимнеджад Мостафа

доктор наук, профессор кафедры химической инженерии Технологического университета Бабола Ноширвани (г. Бабол, Иран)

Рогожин В.В.

д.б.н., профессор, заведующий лабораторией исследования биологически активных веществ Якутской государственной сельскохозяйственной академии (г. Якутск, Россия)

Саловарова В.П.

д.б.н., профессор, заведующая кафедрой физико-химической биологии Иркутского государственного университета (г. Иркутск, Россия)

Санжиб Кумар Панда

доктор наук, профессор, профессор кафедры наук о жизни и биоинформатики Университета Ассам, (г. Силчар, Индия)

Сироткин А.С.

д.т.н., директор Института пищевых производств и биотехнологии, Казанский национальный исследовательский технический университет (г. Казань, Россия)

Ульянов Б.А.

д.т.н., профессор кафедры химической технологии топлива Ангарского государственного технического университета (г. Ангарск, Россия)

Хуторянский В.В.

к.х.н., профессор фармацевтической школы Университета Рединга (г. Лондон, Великобритания)

Цивилева О.М.

д.б.н., ведущий научный сотрудник Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН» (ИБФРМ РАН) (г. Саратов, Россия)

Чхенкели В.А.

д.б.н., профессор, заведующая кафедрой анатомии, физиологии и микробиологии Иркутского государственного аграрного университета (г. Иркутск, Россия)

Шен Янминг

профессор, заместитель декана факультета химической инженерии, Шеньянский институт химической технологии, (г. Шеньян, Китай)

Ответственный секретарь:

Чеснокова А.Н.

к.х.н., доцент кафедры химии и биотехнологии Иркутского национального исследовательского технического университета (г. Иркутск, Россия)

«Иркутский национальный исследовательский технический университет»

Подписной индекс в ООО «Урал-Пресс» – 41903

Адрес ООО «Урал-Пресс»: 620026, Свердловская область, г. Екатеринбург, ул. Мамина-Сибиряка, д.130

Адрес учредителя и издателя:

664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83

Адрес редакции:

664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83, ауд. Е-211

E-mail: biochem@istu.edu

**PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
APPLIED CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY
IZVESTIYA VUZOV
PRIKLADNAYA KHIMIYA I BIOTEKHNOLOGIYA
Volume 14 N 1 (48) 2024**

EDITORIAL BOARD

<i>Editor in Chief</i> Sergei N. Evstaf'ev	Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Irkutsk National Research Technical University, Head of Chemistry and Biotechnology Department (Irkutsk, Russia).
<i>Deputy Chief Editor</i> Andrey G. Lvov	Dr. Sci. (Chemistry), Leading Researcher, Irkutsk National Research Technical University, Chemistry and Biotechnology Department (Irkutsk, Russia)
<i>Editorial council</i> Gennadiy B. Borovskii	Dr. Sci.(Biology), Professor, Deputy Head of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (Irkutsk, Russia)
Svetlana Yu. Bratskaya	Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Head of the Laboratory of Sorption Processes, Correspondent member of RAS, Institute of Chemistry FEB RAS (Vladivostok, Russia)
Sergey D. Varfolomeyev	Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Correspondent member of RAS, Director of N.M. Emmanuel Institute of Biochemical Physics (Moscow, Russia)
Vladimir K. Voronov	Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Professor of Mathematics Department, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Irkutsk National Research Technical University (Irkutsk, Russia)
Francis Verpoort	Professor, Department of Environmental Technology, Food Technology and Molecular Biotechnology, Ghent University Global Campus (Incheon, Korea)
Enjun Gao	Professor, Head of the Laboratory of Coordination Chemistry, Shenyang Institute of Chemical Technology (Shenyang, China)
Mirali N. Dadashev	Dr. Sci. (Engineering), Professor, Gubkin Russian State University of Oil and Gas, Senior research associate of Physical and Colloid Chemistry Department (Moscow, Russia)
Mikhail Ya. Ioelovich	Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Head of Chemical Department, Biotechnology Company "Celdesigner" (Rehovot, Israel)
Alexander I. Nepomnyashchikh	Dr. Sci. (Phys.-Math.), Professor, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Deputy Director of Vinogradov Institute of Geochemistry SB RAS (Irkutsk, Russia)
Pavel A. Nikulshin	Dr. Sci. (Chemistry), Deputy General Director for Science, All-Russian Research Institute for Oil Refining (Moscow, Russia)
Purevsuren Barnasan	Dr. Sci. (Chemistry), Academician of Mongolian AS, Head of the Laboratory of Coal Chemistry, Institute of Chemistry and Chemical Technology of Mongolian AS (Ulan Bator, Mongolia)
Mostafa Rahimnejad	Ph.D. in Biotechnology-Chemical Engineering, Professor of chemical engineering department, Babol Noshirvani University of Technology (Babol, Iran)
Vasily V. Rogozhin	Dr. Sci.(Biology), Professor, Head of the Laboratory for bioactive substance studies, Yakutsk State Agricultural Academy (Yakutsk, Russia)
Valentina P. Salovarova	Dr. Sci.(Biology), Professor, Head of Physical and Chemical Biology Department, Irkutsk State University (Irkutsk, Russia)
Sanjib Kumar Panda	Dr., Professor, Assam University, Department of Life Science & Bioinformatics (Silchar, India)
Alexander S. Sirotnik	Dr. Sci. (Engineering), Director of Institute of Food Production and Biotechnology, Kazan National Research Technical University (Kazan, Russia)
Boris A. Ulyanov	Dr. Sci. (Engineering), Professor, Professor of Chemical Technology of Fuels Department, Angarsk State Technical University (Angarsk, Russia)
Vitaliy V. Khutoryanskiy	Ph.D. Sci. (Chemistry), Professor of Pharmaceutical School of University of Reading (London, Great Britain)
Olga M. Tsvileva	Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher of Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms IBBPM RAS (Saratov, Russia)
Vera A. Chkhenkeli	Dr. Sci.(Biology), Professor, Head of Anatomy, Physiology and Microbiology Department, Irkutsk State Agricultural University (Irkutsk, Russia)
Yanming Shen	Professor, Vice-Dean of Department of Chemical Engineering, Shenyang Institute of Chemical Technology (Shenyang, China).
<i>Executive Secretary</i> Aleksandra N. Chesnokova	Ph.D. Sci. (Chemistry), Irkutsk National Research Technical University, Associate Professor Chemistry and Biotechnology Department (Irkutsk, Russia).

The journal was founded in 2011. The journal is issued 4 times a year.
The journal is registered with the Federal Agency for Supervision of Communications,
Information Technologies and Mass Media.

Certificate registration FS 77-62814 of 18 August, 2015

The journal is included in Ulrich's Periodicals Directory Founder and Publisher:
the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education
Irkutsk National Research Technical University
The subscription code in Ural-Press LLC: 41903

The postal address of Ural-Press LLC: 130 Mamin-Sibiryak st.,
Yekaterinburg 620026, Russia

Address of the founder and publisher:

83 Lermontov St., Irkutsk 664074, Russian Federation

Editorial address:

E-211, 83 Lermontov St., Irkutsk 664074, Russian Federation,
E-mail: biochem@istu.edu

СОДЕРЖАНИЕ

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

- Фарион И.А., Буинов А.С., Никишина А.Н., Бурдуковский В.Ф.** Новые термочувствительные смарт-биоматериалы на основе коллагена, модифицированного винилглицидиловым эфиром этиленгликоля, для 4D-биопечати..... 5
- Махмудов Р.Р., Никифорова Е.А., Зверев Д.П., Балюкина Л.А., Скачков А.П.** Синтез и антиноцицептивная активность 2,2'-(1,4-фенилен)бис[3-арил-2-азаспиро[3.5]нонан-1-онов]..... 15

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

- Иванова Н.Н., Цюпка В.А., Корзина Н.В.** Влияние состава питательной среды на сохранение жизнеспособности и генетической стабильности эксплантов хризантемы садовой при депонировании *in vitro*..... 1
- Амброс Е.В., Крупович Е.С., Колмогоров Ю.П., Трофимова Е.Г., Гусев И.С., Гольденберг Б.Г.** Модуляция роста и аккумуляции химических элементов в растениях *Fragaria* × *ananassa* в условиях *in vivo* под действием хелатов кремния 25
- Кирюхина А.С., Лозовая Т.С., Адамович С.Н.** Влияние протатранов на биосинтез внеклеточных ферментов *Candida ethanolica* ВКМ Y-2300 Т 47
- Боровский Г.Б., Горбылева Е.Л., Катышев А.И., Коротаева Н.Е., Полякова Е.А., Пятрикас Д.В., Федосеева И.В., Шигарова А.М.** Влияние гиперэкспрессии гена альтернативной внешней NADH-дегидрогеназы арабидопсиса на устойчивость трансформированных растений табака к отрицательной температуре 55
- Григориади А.С., Зобкова Н.В., Сотникова Ю.М., Ямалева А.А., Фархутдинов Р.Г.** Реакция микробного сообщества ризосферы растений-фиторемедиантов на нефтяное загрязнение и применение биопрепаратов 68
- Валитова Ю.Н., Хабибрахманова В.Р., Гурьянов О.П., Уваева В.Л., Хайруллина А.Ф., Рахматуллина Д.Ф., Галеева Е.И., Трифонова Т.В., Викторова Л.В., Минибаева Ф.В.** Изменение липидного состава лишайника *Peltigera canina* при действии повышенной температуры 74
- Васильев И.А., Кривенко Д.А., Петрушин И.С., Кондратов И.Г., Огарков О.Б., Маркова Ю.А.** Микроорганизмы, населяющие эндо- и ризосферу эндемичного растения Прибайкалья *Hedysarum zundukii* (Fabaceae).....
- Елисафенко Т.В., Железниченко Т.В., Югина П.Н., Жигмитцыренова Б.М., Казаков М.В., Тараскин В.В.** Особенности прорастания семян и введение в культуру *in vitro* *Saposhnikovia divaricata* (Turcz. ex Ledeb.) Schischk. 89
- Имидоева Н.А., Малыгина Е.В., Бельшенко А.Ю., Дмитриева М.Е., Шелковникова В.Н., Моргунова М.М., Кулинич С.В., Вавилина Т.Н., Евстафьев С.Н., Аксёнов-Грибанов Д.В.** Способ механической активации суспензии спор черного трюфеля..... 95
- Пусенкова Л.И., Гарипова С.Р., Ласточкина О.В., Шпирная И.А., Валиева В.А.** Влияние эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* на активность метаболических процессов, протекающих в клубнях картофеля при хранении..... 115
- Коротаева Н.Е., Шмаков В.Н., Молдавская С.Э.** Влияние водного дефицита на накопление дегидринов в клетках каллусной культуры сосны обыкновенной..... 130
- Побежимова Т.П., Бережная Е.В., Полякова Е.А., Корсукова А.В., Забанова Н.С., Любушкина И.В., Степанов А.В., Дорофеев Н.В., Грабельных О.И.** Влияние тебуконазола и азоксистробина на физиологические параметры и устойчивость проростков пшеницы к водному дефициту 168
- Храмова Я.И., Нефедьева Е.Э., Белопухов С.Л., Дмитриевская И.И., Храмова В.Н.** Изменение всхожести, содержания протеина и клейковины в зерновках твердой и мягкой пшеницы после действия импульсного давления и длительного хранения..... 187
- Супрун Н.П., Гусакова Г.С., Аникина Н.С., Сластия Е.А.** Биохимический состав фруктового сула из мелкоплодных сортов яблони Южного Прибайкалья 200
- Корчагина А.А., Гладышева Е.К., Будаева В.В., Скиба Е.А.** Химический состав волокна и костры лубяных культур и продуктов их щелочной делигнификации 215

CONTENTS

CHEMICAL SCIENCES

- Farion I.A., Buinov A.S., Nikishina A.N., Burdukovskii V.F.** New smart thermosensitive biomaterials on the basis of collagen modified by ethylene glycol vinyl glycidyl ether for 4D bioprinting..... 469
- Makhmudov R.R., Nikiforova E.A., Zverev D.P., Balyukina L.A., Skachkov A.P.** Synthesis and antinociceptive activity of 2,2'-(1,4-phenylene)bis[3-aryl-2-azaspiro[3.5]nonan-1-ones]..... 476

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

- Ivanova N.N., Tsiupka V.A., Korzina N.V.** Effect of growth medium composition on the viability and genetic stability of *Chrysanthemum × morifolium* Ramat. explants under *in vitro* cold storage conditions. 483
- Ambros E.V., Krupovich E.S., Kolmogorov Y.P., Trofimova E.G., Gusev I.S., Goldenberg B.G.** Modulation of growth and chemical element accumulation in *Fragaria × ananassa* plants *in vivo* under the effect of silicon chelates 494
- Kiryukhina A.S., Lozovaya T.S., Adamovich S.N.** Effect of protatranes on the biosynthesis of extracellular enzymes of *Candida ethanolica* BKM Y-2300 T 506
- Borovskii G.B., Gorbyleva E.L., Katyshev A.I., Korotaeva N.E., Polyakova E.A., Pyatrikas D.V., Fedoseeva I.V., Shigarova A.M.** Effect of the overexpression of external alternative NADH dehydrogenase gene in *Arabidopsis* on the resistance of transformed tobacco plants to negative temperatures..... 516
- Grigoriadi A.S., Zobkova N.V., Sotnikova Yu.M., Yamaleeva A.A., Farkhutdinov R.G.** Response of the rhizosphere microbial community of phytoremediation plants to oil pollution and the application of biopreparations..... 523
- Valitova J.N., Khabibrakhmanova V.R., Guryanov O.P., Uvaeva V.L., Khairullina A.F., Rakhmatullina D.F., Galeeva E.I., Trifonova T.V., Viktorova L.V., Minibayeva F.V.** Changes in the lipid composition of *Peltigera canina* at an elevated temperature 532
- Vasilev I.A., Krivenko D.A., Petrushin I.S., Kondratov I.G., Ogarkov O.B., Markova Yu.A.** Microorganisms inhabiting the endo- and rhizosphere of *Hedysarum zundukii* (Fabaceae) endemic to the Baikal region.... 545
- Elisafenko T.V., Zheleznicenko T.V., Yugrina P.N., Zhigmittsyrenova B.M., Kazakov M.V., Taraskin V.V.** Germination specifics and introduction into *in vitro* culture of *Saposhnikovia divaricata* (Turcz. ex Ledeb.) Schischk. 552
- Imidoeva N.A., Malygina E.V., Belyshenko A.Yu., Dmitrieva M.E., Shelkovnikova V.N., Morgunova M.M., Kulinich S.V., Vavilina T.N., Evstaf'ev S.N., Axenov-Gribanov D.V.** A way to mechanically activate a suspension of black truffle spores..... 561
- Pusenkova L.I., Garipova S.R., Lastochkina O.V., Shpirnaya I.A., Valieva V.A.** Effect of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* on metabolic processes in potato tubers during storage..... 569
- Korotaeva N.E., Shmakov V.N., Moldavskaya S.E.** Effect of water stress on the accumulation of dehydrins in callus culture cells from *Pinus sylvestris* L. 579
- Pobezhimova T.P., Berezhnaya E.V., Polyakova E.A., Korsukova A.V., Zabanova N.S., Lyubushkina I.V., Stepanov A.V., Dorofeev N.V., Grabelnych O.I.** Effect of tebuconazole and azoxystrobin on the physiological parameters of wheat seedlings and their resistance to water stress..... 589
- Khramova Ya.I., Nefed'eva E.E., Belopukhov S.L., Dmitrevskaya I.I., Khramova V.N.** Changes in the germination and content of protein and gluten in the caryopses of hard and soft wheat under pulse pressure and prolonged storage conditions 602
- Suprun N.P., Gusakova G.S., Anikina N.S., Slastya E.A.** Biochemical composition of fruit must from small-fruit apple varieties grown in the Southern Baikal Region..... 611
- Korchagina A.A., Gladysheva E.K., Budaeva V.V., Skiba E.A.** Chemical composition of fiber and shive in bast-fiber crops and the products of their alkaline delignification 621

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Научная статья

УДК 577.112.4:773.93:616.77

EDN: CRZFTJ

DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-469-475



Новые термочувствительные смарт-биоматериалы на основе коллагена, модифицированного винилглицидиловым эфиром этиленгликоля, для 4D-биопечати

И.А. Фарион[✉], А.С. Буинов, А.Н. Никишина, В.Ф. Бурдуковский

Байкальский институт природопользования СО РАН, г. Улан-Удэ, Российская Федерация

Аннотация. Новизна и цель работы заключались в том, что реакционноспособный в условиях ультрафиолетового излучения коллаген впервые получен функционализацией боковых аминогрупп лизиновых фрагментов ненасыщенным винилглицидиловым эфиром этиленгликоля («винилоксом»), содержащим, аналогично глицидилметакрилату, эпоксидную группу. Особенностью данного подхода является то, что наличие этой группы с умеренной реакционной способностью обеспечивает избирательное протекание реакции прививки по боковым аминогруппам коллагена в нейтральной или слабощелочной среде и исключает характерное для аналога – глицидилметакрилата – образование побочных продуктов реакции Михаэля и гидролиза. По данным фотометрии установлено, что модификация в слабоосновном водном растворе при комнатной температуре и значительном избытке «винилокса» позволяет достичь степени прививки 23,4%. Впервые при добавлении полиэтиленгликоль диакрилата, поли(N-изопропилакриламида) к слабокислоте водному раствору коллагена получены пленкообразующие композиты, способные к фотоотверждению. Наличие винилоксидных групп позволило обеспечить удовлетворительные механические характеристики пленок в результате иницируемого ультрафиолетовым излучением сшивания коллагена, а присутствие поли(N-изопропилакриламида) – гидрофильно-гидрофобную смарт-чувствительность. Пленки обладают развитой фибриллярной структурой, а размеры пор позволяют обеспечить свободное перемещение питательных и прочих соединений. Согласно данным МТТ-теста, пленки не выделяют цитотоксических компонентов и сохраняют метаболическую активность стволовых клеток, обеспечивая достаточную их плотность на своей поверхности. Все вышеперечисленное определяет перспективность использования пленок как в качестве искусственного внеклеточного матрикса – скаффолда, так и в виде термочувствительных смарт-подложек для выращивания стволовых клеток на их поверхностях для последующей биопечати с лазерным переносом.

Ключевые слова: коллаген, поли(N-изопропилакриламид), винилглицидиловый эфир этиленгликоля, модификация биополимеров, регенеративная медицина

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-23-20057.

Для цитирования: Фарион И.А., Буинов А.С., Никишина А.Н., Бурдуковский В.Ф. Новые термочувствительные смарт-биоматериалы на основе коллагена, модифицированного винилглицидиловым эфиром этиленгликоля, для 4D-биопечати // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 469–475. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-469-475. EDN: CRZFTJ.

CHEMICAL SCIENCES

Original article

New smart thermosensitive biomaterials on the basis of collagen modified by ethylene glycol vinyl glycidyl ether for 4D bioprinting

Ivan A. Farion[✉], Aleksandr S. Buinov, Alena N. Nikishina, Vitalii F. Burdukovskii

Baikal Institute of Nature Management SB RAS, Ulan-Ude, Russian Federation

Abstract. In this study, collagen reactive under UV radiation was obtained for the first time via the functionalization of the side amino groups of lysine moieties with unsaturated ethylene glycol vinyl glycidyl ether (Vinylox) containing, similarly to glycidyl methacrylate, an epoxy group. The presence of this group having a moderate reactivity provides

© Фарион И.А., Буинов А.С., Никишина А.Н., Бурдуковский В.Ф., 2023

selective grafting of the side amino groups of collagen in a neutral or weakly alkaline medium and excludes the formation of by-products in the Michael reaction and hydrolysis characteristic of the analog—glycidyl methacrylate. Photometry data indicate that with modification in a weakly basic aqueous solution at room temperature and a significant excess of Vinylox, a grafting degree of 23.4% can be achieved. For the first time, film-forming composites capable of photocuring were obtained by adding polyethylene glycol diacrylate and poly(N-isopropylacrylamide) to a weakly acidic aqueous solution of collagen. The presence of vinyl oxide groups provided satisfactory mechanical characteristics of films as the result of UV-initiated collagen cross-linking, while the presence of poly(N-isopropylacrylamide) ensured hydrophilic-hydrophobic smart sensitivity. The films have a well-developed fibrillar structure, and the size of voids enables the free movement of nutrients and other compounds. According to MTT assay data, the films release no cytotoxic components and maintain the metabolic activity of stem cells, providing sufficient density of stem cells on their surface. All of the factors mentioned above determine the prospects of using the films both as an artificial extracellular matrix scaffold and as smart thermosensitive scaffolds used to grow stem cells on their surfaces for subsequent laser transfer bioprinting.

Keywords: collagen, poly(N-isopropylacrylamide), ethylene glycol vinyl glycidyl ether, biopolymer modification, regenerative medicine

Funding. The Russian Science Foundation (grant no. 22-23-20057) supported the work.

For citation: Farion I.A., Buinov A.S., Nikishina A.N., Burdukovskii V.F. New smart thermosensitive biomaterials on the basis of collagen modified by ethylene glycol vinyl glycidyl ether for 4D bioprinting. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):469-475. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-469-475. EDN: CRZFTJ.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из главных проблем 3D-биопринтинга является правильный подбор биоматериала, обеспечивающий максимальную схожесть механических и биологических характеристик с нативными тканями и органами. Более того, такие материалы должны соответствовать требованиям, выдвигаемым технологическими особенностями биопечати [1, 2], из которых важнейшими являются биосовместимость и биорезорбируемость. Среди большого разнообразия биополимеров наиболее перспективным с целью использования в качестве матриц для создания тканеинженерных конструкций является коллаген. Это один из наиболее распространенных белков, и он может быть легко выделен, например, из шкур и сухожилий крупного рогатого скота и крысиных хвостов [3].

Наиболее простой подход к получению гидрогелей коллагена – фибриллогенезис при pH ~7 и 37 °C в течение 30 мин. Тем не менее полученные таким образом гидрогели существенно уступают по механическим характеристикам нативным коллагеновым тканям. В этой связи предпринимаются различные попытки получения сшитых структур для улучшения механических свойств коллагеновых матриц. Методы химической сшивки коллагена основаны на наличии реакционноспособных концевых или боковых амино- и карбоксильных групп. В качестве сшивающих агентов обычно используются альдегиды, генипин и карбодиимиды [4–10]. Однако зачастую подобные методы не подходят для получения гидрогелей с инкапсулированными клетками [11] ввиду токсичности подобных сшивающих агентов.

Еще один распространенный подход к дизайну сшитых коллагеновых гидрогелей – придание коллагену способности к ковалентной сшивке под действием ультрафиолетового излучения с помощью привитых метакрилатных групп посредством его модификации метакриловым ангидридом [12, 13] или глицидилметакрилатом [14]. В то же время метакриловый ангидрид высокотоксичен, а в водной среде склонен, помимо основной реакции ацилирования лизиновых аминокислотных групп, также к побочным реакциям Михаэля по кратным

связям и гидролизу. К подобным побочным реакциям, помимо основной реакции эпоксиалкилирования, также склонен и глицидилметакрилат. Следовательно, поиск не склонных к вышеперечисленным побочным реакциям мало- или нетоксичных модифицирующих агентов для придания коллагену способности сшиваться под действием ультрафиолетового излучения является актуальной задачей.

Новизна и цель проведенной работы состоят в том, что для модификации коллагена впервые был использован нетоксичный ненасыщенный винилглицидиловый эфир этиленгликоля, содержащий, аналогично глицидилметакрилату, эпоксидную «якорную» группу. Особенность данного подхода состоит в том, что наличие эпоксидной «якорной» группы с умеренной реакционной способностью обеспечивает избирательное протекание реакции прививки по боковым аминокислотным группам коллагена в нейтральной или слабощелочной среде и исключает характерное для аналога – глицидилметакрилата – образование побочных продуктов реакции Михаэля, а также взаимодействие с реакционной водной средой. Более того, наличие винилокислородной группы определяет способность привитого коллагена к фотосополимеризации под действием ультрафиолета с ди(мет)акрилатами (поли)этиленгликолей в присутствии фотоинициаторов. Все это указывает на уникальность ненасыщенных глицидиловых эфиров как агентов для модификации биополимера коллагена с целью придания ему способности к фотосшиванию по кратным связям и, как следствие, использования модифицированного производного в качестве основной фотореактивной, биосовместимой и биодеградируемой полимерной матрицы в составе смарт-гидрогелей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве полимерной матрицы был использован коллаген (0,3 масс.% в 0,02 М растворе уксусной кислоты), предоставленный сотрудниками Института регенеративной медицины Первого московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, полученный из хвостов лабораторных крыс [3]. Ненасыщенный

винилглицидиловый эфир этиленгликоля – «винилокс» – был предоставлен сотрудниками Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН.

Поли(*N*-изопропилакриламид) с молекулярной массой, равной 40 кДа, полиэтиленгликоль диакрилат и неионогенное поверхностно-активное вещество Tween 20 были использованы как коммерческие чистые продукты компании Sigma-Aldrich (США).

Модификацию коллагена проводили в трехгорлой стеклянной колбе, снабженной мешалкой, входом и выходом аргона в которую при перемешивании последовательно загружали 3,000 мл раствора коллагена, 0,055 мл Tween 20, 1,300 мл 4%-го водного раствора NaHCO_3 и перемешивали в течение 15 мин в токе аргона. Затем добавляли 0,057 мл (0,060 г) винилглицидилового эфира этиленгликоля и перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. По окончании процесса продукт модификации осаждали изопропанолом (25 мл) при интенсивном перемешивании, фильтровали и тщательно промывали изопропанолом на фторопластовом фильтре с размером пор 0,22 μ . Затем сушили в вакууме при 30–40 °С до постоянной массы и хранили в эксикаторе над безводным CaCl_2 .

Для определения количественного содержания свободных первичных аминогрупп, выраженного в соотношении моль NH_2 / г коллагена, использовали методику пробоподготовки, описанную в работе [14], с адаптацией к 0,3%-м массовым растворам коллагена в 0,02 М растворе уксусной кислоты вместо твердых образцов. Расчет проводили по формуле (1):

$$\frac{\text{moles}(\text{Lys})}{g(\text{Collagen})} = \frac{2 \times \text{Abs}(346\text{nm}) \times 0,02}{1,4 \times 10^4 \times b \times x} \quad (1)$$

где $\text{moles}(\text{Lys})$ – мольное количество «свободных» первичных аминогрупп в 1 г коллагена ($g(\text{Collagen})$); $\text{Abs}(346\text{nm})$ – величина поглощения подготовленного для фотометрии образца при длине волны 346 нм; $1,4 \times 10^4$ – молярный коэффициент поглощения пикриламида *L*-лизина, $\text{L} \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-2}$; b – толщина поглощаемого слоя, см; x – навеска коллагена, г.

За величину поглощения образца при длине волны 346 нм было взято среднее из десяти значений параллельных съемок ультрафиолетовых спектров на спектрофотометре УФ-1200 (Esoview, Китай). Подготовку образца сравнения проводили в отсутствие 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты. Мольное количество свободных первичных аминогрупп лизиновых фрагментов в образцах немодифицированного коллагена – $(55,15 \pm 0,35) \times 10^{-5}$ или $(54,8 - 55,5) \times 10^{-5}$ моль NH_2 / г коллагена, что близко к значению для данного типа коллагена – $(35,5 - 38,9) \times 10^{-5}$ моль NH_2 / г коллагена, определенное в работе [14].

После осуществления модификации было определено содержание свободных первичных аминогрупп в полученном производном. Для этого осуществляли операции по пробоподготовке образцов для съемки ультрафиолетовых спектров. Съемку ультрафиолетовых спектров и вычисление количества первичных аминогрупп проводили по формуле (1) аналогично вышеприведенным операциям для немодифицированного коллагена. Степень модификации вычисляли по формуле (2) [14]:

$$F = 1 - \frac{\text{moles}(\text{Lys})_{\text{Funct.Collagen}}}{\text{moles}(\text{Lys})_{\text{Collagen}}} \quad (2)$$

где F – степень функционализации коллагена; $\text{moles}(\text{Lys})_{\text{Funct.Collagen}}$ – мольное количество свободных первичных аминогрупп в функционализированном коллагене; $\text{moles}(\text{Lys})_{\text{Collagen}}$ – мольное количество свободных первичных аминогрупп в исходном коллагене.

Фотоотверждение осуществляли с помощью ультрафиолетового излучателя ОУФК-012 («Солнышко», Россия) с эффективным спектральным диапазоном излучателя ДРТ-125 230–400 нм и световым потоком 1850 лм при температуре 50 °С и давлении 0,5 мбар. Расстояние от пленки до излучателя составляло ~10 см. Время облучения – 10 мин.

Для визуализации морфологии поверхности пленок проводили микросъемку в проходящем свете (метод светлого поля), используя световой микроскоп OSEELANG модели OSL-002 (OSEELANG, Китай), снабженный USB-камерой-окуляром SEELANG с разрешением 2 Мпк и увеличением 40х. Увеличение объектива составляло 10х. Общее увеличение – 400х.

Механические характеристики материалов устанавливали с помощью испытательной машины Instron 5544 UTM (Instron, США) при комнатной температуре и влажности около 50% при скорости сжатия 3 мм/мин⁻¹.

МТТ-тест проводили для оценки влияния растворимых компонентов пленки на жизнеспособность клеток. Фрагменты пленок общей площадью 6 см² из каждой группы образцов инкубировали в течение 24 ч в 1 мл среды для культивирования клеток (DMEM/F12 с добавлением 100 ЕД/мл стрептомицина, 100 мкг/мл пенициллина, 1% добавки Gibco GlutaMAX, 5% фетальной бычьей сыворотки HyClone) в атмосфере, содержащей 5% CO_2 , при 37 °С. Серийные разведения экстрактов в среде добавляли в тройные лунки к субконфлюентному монослою мышинных фибробластов 3Т3, культивированному в 96-луночном планшете. Додецилсульфат натрия добавляли в отдельные лунки в качестве положительного (токсичного) контроля и отдельно в культуральную среду в качестве отрицательного контроля. Планшеты инкубировали еще 24 ч в CO_2 -инкубаторе при 37 °С. Затем среду заменяли 100 мкл раствора МТТ (0,5 мг/мл в среде Gibco DMEM/F12 без добавок) и инкубировали в CO_2 -инкубаторе при 37 °С в течение 3 ч. После удаления раствора МТТ во все лунки добавляли аликвоты диметилсульфоксида по 100 мкл и перемешивали. Жизнеспособность клеток определяли количественно путем измерения оптической плотности раствора при длинах волн 567 и 630 нм на спектрофотометре Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США).

Контактную цитотоксичность – конфлюэнтность – и жизнеспособность клеток на поверхностях засеянных стволовыми клетками пленках исследовали путем дифференциального окрашивания живых и мертвых клеток набором флуоресцентных красителей Calcein AM/EthD-1 (LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit). Мышечные фибробласты линии 3Т3 окрашивали после 76 ч инкубации на поверхности пленок. Для визуализации зеленых живых и красных мертвых клеток использовали сканирующий лазерный конфокальный микроскоп LSM 880 Airyscan (Carl Zeiss, Йена, Германия),

оснащенный модулем AiryScan и детектором GaAsP (Carl Zeiss, Йена, Германия). Z-сканы были получены с использованием линзы EC Plan-Neofluar (Carl Zeiss, Oberkochen, Германия) и лазеров с длинами волн 488 и 561 нм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для определения количества свободных первичных аминогрупп лизиновых фрагментов коллагена, необходимого при расчете степени модификации, вместо более сложного в плане пробоподготовки и временных затрат «нингидринного» метода [15–17] мы применили более удобную фотометрическую методику с использованием в качестве аналитического агента для фотометрии привитых на макромолекулу коллагена пикриламидов боковых фрагментов лизина [14, 18]. Привитые пикриламиды образуются за счет взаимодействия 2,4,6-тринитробензолсульфонат-аниона со свободными первичными аминогруппами в слабощелочной среде [18] (рис. 1).

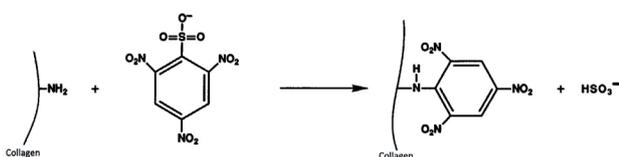


Рис. 1. Взаимодействие 2,4,6-тринитробензолсульфонат-аниона с первичными аминогруппами коллагена с образованием привитых пикриламидов

Fig. 1. Interaction of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate anion with primary amino groups of collagen with formation of grafted picrylamides

Модификацию коллагена осуществляли в слабощелочной водной среде при комнатной температуре согласно схеме, приведенной на рис. 2.

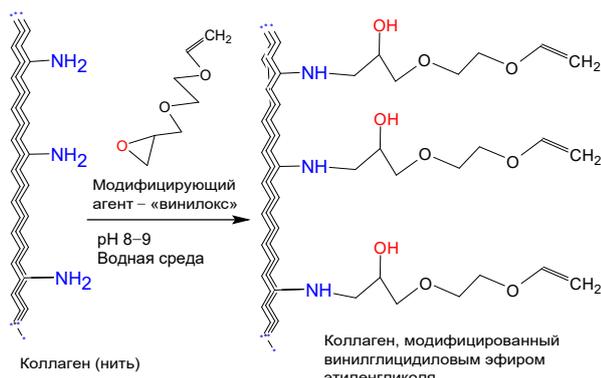


Рис. 2. Модификация коллагена «винилоксом»

Fig. 2. Modification of collagen with “Vinylox”

Попытка осуществления модификации в присутствии эквимольного по отношению к модифицирующему агенту количества триэтиламина согласно методике [14] приводила к тому, что конечный продукт после осаждения изопропанолом и последующего тщательного высушивания в вакууме при комнатной температуре не был растворим в 0,02 М уксусной кислоте даже при

нагревании до температуры кипения. В то же время после проведения аналогичных операций с коллагеном в отсутствие «винилокса» высушенный в конечном итоге образец был растворим в данном растворе кислоты даже при комнатной температуре, что указывает на протекание конкурирующих процессов, приводящих к потере растворимости.

В связи с вышесказанным модификацию коллагена осуществляли 75-кратным мольным избытком «винилокса» в отсутствие триэтиламина, но с большим, двукратным, количеством водного раствора NaHCO_3 (4 масс.%) при pH ~8,5. В этом случае мы ориентировались на вышеописанную методику успешного получения привитых пикриламидов для количественного определения первичных аминогрупп при данном значении pH. После высушенный модифицированный коллаген растворялся в 0,02 М уксусной кислоте при нагревании до ~40 °С.

Наличие винилоксидных групп остатков «винилокса» в модифицированном производном подтверждено данными ^1H -спектроскопии ядерного магнитного резонанса (рис. 3). В спектре ^1H -ЯМР малоинтенсивный сигнал при 6,73 м.д. соответствует протонам $\text{O}-\text{CH}=\text{CH}_2$ винильной группы модифицирующего агента. Пики протонов $\text{O}-\text{CH}=\text{CH}_2$ при 4,14–4,17 м.д., по-видимому, перекрываются пиками «коллагеновых» протонов при 4,10–4,25 м.д. Малая интенсивность пиков протонов при кратной связи также характерна для модифицированных глицидилметакрилатом коллагенов [14].

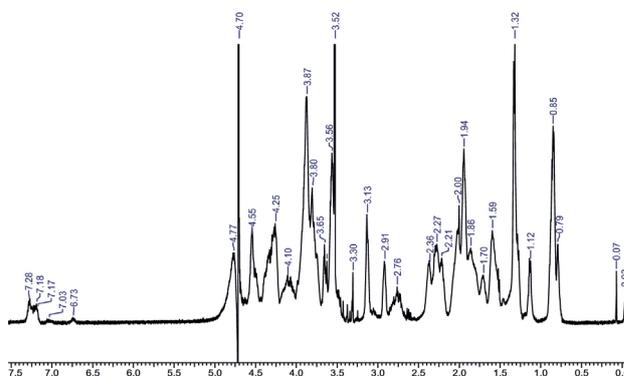


Рис. 3. ^1H -спектроскопия ядерного магнитного резонанса модифицированного «винилоксом» коллагена (3 масс.% в 0,02 М растворе CF_3COOD в D_2O)

Fig. 3. ^1H -NMR spectrum of vinylox-modified collagen (3 Wt% in 0.02 M solution of CF_3COOD in D_2O)

Согласно расчетам по формуле (1), мольное количество свободных первичных аминогрупп лизиновых фрагментов в растворимом образце модифицированного коллагена составляло $(42,51 \pm 0,57) \times 10^{-5}$ моль NH_2 / г коллагена, что соответствует степени модификации, равной 23,4%.

Далее для качественной оценки гидрофильно-гидрофобных характеристик и морфологии поверхности смарт-имплантатов на поверхности обезжиренного горячей хромовой смесью предметного стекла были изготовлены термочувствительные смарт-пленки. Исходный раствор для получения пленок был на основе свежеприготовленного 0,6% масс. раствора модифици-

рованного коллагена в 0,02 М водном растворе уксусной кислоты с добавлением поли(*N*-изопропилакриламид)а как наиболее изученного в регенеративной медицине термочувствительного смарт-полимера [2, 19, 20] (30% от массы коллагена), сшивающего агента, полиэтиленгликоль диакрилата с молекулярной массой, равной 700 Да (50% от массы коллагена), и фотоинициатора Irgacure 2959 (3% от массы коллагена). После отлива и последующего высушивания пленок при комнатной температуре и атмосферном давлении осуществляли фотоструктурирование (отверждение) пленки с помощью ультрафиолетового излучателя ОУФК-012 («Солнышко», Россия). В результате происходила фотосополимеризация кратных связей привитых на коллаген винилоксидных групп с двойными связями полиэтиленгликоль диакрилата с образованием пространственно-сшитой полимерной сетки.

На рис. 4 представлена микрофотография композиционной пленки, содержащей термочувствительный поли(*N*-изопропилакриламид), из которой видно, что поверхность содержит множество хаотично расположенных коллагеновых микрофибрилл. Данные микрофибриллы, как мы полагаем, образуются в процессе увеличения концентрации коллагеновой полимерной матрицы при высушивании образца. Вполне вероятно, что и полиэтиленгликоль диакрилат как сшивающий агент, и термочувствительные смарт-полимеры по мере высушивания образца адсорбируются на поверхности этих фибрилл, между которыми имеется свободное пространство – каналы, через которые к размножающимся стволовым клеткам могут свободно перемещаться нутриенты и выводиться продукты их жизнедеятельности. Из этого следует, что данные структуры могут с успехом выступать в качестве искусственного внеклеточного матрикса-скаффолда.

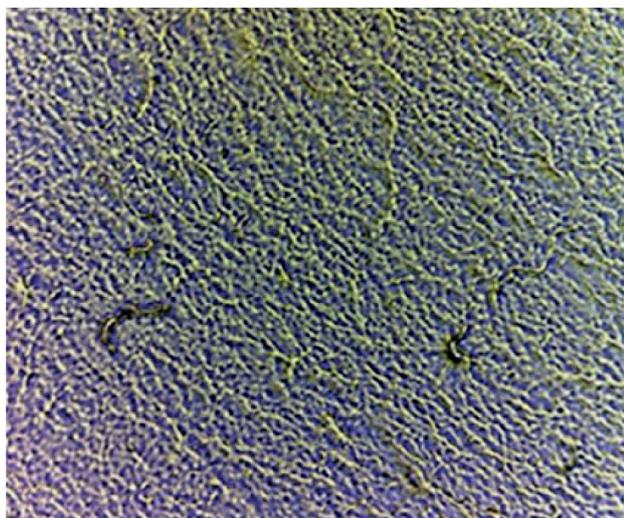


Рис. 4. Микрофотография поверхности отверждаемой ультрафиолетовым излучением пленки из коллагена, поли(*N*-изопропилакриламид)а, полиэтиленгликоль диакрилата при увеличении 400х

Fig. 4. Microphotograph of the surface of the UV-cured collagen / poly(*N*-isopropylacrylamide) / polyethylene glycol diacrylate film at a magnification of 400x

Для качественной оценки проявления гидрофильно-гидрофобных смарт-свойств пленок были проведены эксперименты по наблюдению за каплей воды на их поверхностях при комнатной температуре 20 °С и температуре, увеличенной до ~40 °С. Так, при 20 °С капля воды растекалась по поверхности, а затем медленно проникала внутрь структуры пленки из-за наличия пористости, но образцы на месте контакта не растворялись, а всего лишь частично набухали. В то же время при ~40 °С капля воды не растекалась по поверхности, а лишь медленно проникала внутрь структуры, но если эту пленку с каплей воды на поверхности быстро охлаждать, то в определенный момент она начинает растекаться по поверхности и быстро проникать внутрь структуры. Наблюдаемое явление является тепловым смарт-эффектом перехода через низшую критическую температуру растворения (НКТР), обеспечивающим наличие смарт-характеристик у поверхности, который проявляется в изменении гидрофильно-гидрофобных свойств. Таким образом, до перехода через НКТР поверхность является гидрофильной (быстрое растекание капли по поверхности с последующим проникновением внутрь структуры), тогда как после перехода через НКТР поверхность становится гидрофобной (капля воды не растекается по поверхности, а лишь медленно проникает внутрь структуры при увеличении гидрофобности поверхности при температуре выше НКТР).

Температура и степень усадки крайне важны для данного типа термочувствительных смарт-подложек, так как высокие значения усадки могут привести к отрыву от базовых подложек-носителей в процессе нагрева при биопечати с лазерным переносом (LIFT-биопечати) или пассаже выращенных на них клеточных слоев-имплантатов. Так, по данным термомеханического анализа, усадка сшитой высушенной пленки при 60–70 °С составляет всего 2–5%. Столь низкое значение можно объяснить микрофибрилярным строением пленки (см. рис. 4), где данные фибриллы играют роль компенсаторов уменьшения линейных размеров пленки при структурной реорганизации коллагеновых макромолекул. Что касается механических свойств, то модуль сжатия гидрогелевой пленки, содержащей 30% воды при 20 °С, составляет 55 кПа при компрессии около 45%, что свидетельствует о достаточной прочности данного гидрогеля, сравнимой с прочностными показателями пленок на основе глицидилметакрилированного коллагена [14].

Важно отметить, что по данным МТТ-теста полученный материал не выделял цитотоксических компонентов, сохраняя метаболическую активность стволовых клеток и обеспечивая достаточную их плотность на поверхности. Все вышеперечисленное определяет перспективность разработанных пленок в качестве термочувствительных смарт-подложек для выращивания стволовых клеток на их поверхностях с последующим LIFT-биопринтингом клеточными сфероидными с помощью точно сфокусированного лазерного излучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе предложен новый подход к модификации коллагена винилоксидными эфирами этиленгликоля, позволяющий получать растворимые в слабокислом водном растворе уксусной кислоты продукты со степенью модификации 23,4%. Фотоотвержденные полиэтиленгликоль диакрилатом биосовместимые пленки

модифицированного коллагена и поли(N-изопропилакриламид)а обладают удовлетворительными механическими характеристиками и гидрофильно-гидрофобной смарт-чувствительностью, что определяет перспективность их использования для задач регенеративной биомедицины.

REFERENCES

1. Blaeser A., Heilshorn S.C., Campos D.F.D. Smart bioinks as de novo building blocks to bioengineer living tissues. *Gels*. 2019;5(2):29. DOI: 10.3390/gels5020029.
2. Ohya S., Matsuda T. Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin as thermoresponsive three-dimensional artificial extracellular matrix: Molecular and formulation parameters vs. cell proliferation potential. *Journal of Biomaterials Science. Polymer edition*. 2005;16(7):809-827. DOI: 10.1163/1568562054255736.
3. Parenteau-Bareil R., Gauvin R., Berthod F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials*. 2010;3(3):1863-1887. DOI: 10.3390/ma3031863.
4. Kanagaraj J., Panda R.C., Jayakumar G.C. Interaction of glyoxal with collagenous matrix and its behavioral aspects for non-toxic and sustainable tanning system. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2020;17:879-890. DOI: 10.1007/s13762-019-02327-1.
5. He L., Lan W., Zhao Y., Chen S., Liu S., Cen L., et al. Characterization of biocompatible pig skin collagen and application of collagen-based films for enzyme immobilization. *RSC Advances*. 2020;10(12):7170-7180. DOI: 10.1039/C9RA10794K.
6. Liu B., Wang J., Ji L., Bai T., Zhang Y., Liu D. Structure validation of oxidized poly(2-hydroxyethyl acrylate) with multiple aldehyde groups and its application for collagen modification. *Royal Society Open Science*. 2021;8(2):201892. DOI: 10.1098/rsos.201892.
7. Adamiak K., Sionkowska A. Current methods of collagen cross-linking: review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;161:550-560. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.075.
8. Nashchekina Yu.A., Sirotkina M.Yu., Darvish D.M., Barsuk I.A., Moskalyuk O.A., Mikhailova N.A. The effect of carbodiimide on the structural, mechanical and biological properties of collagen films. *Cell and Tissue Biology*. 2021;15:586-593. DOI: 10.1134/S1990519X21060079.
9. Riacci L., Sorriento A., Ricotti L. Genipin-based crosslinking of jellyfish collagen 3D hydrogels. *Gels*. 2021;7(4):238. DOI: 10.3390/gels7040238.
10. Murueva A.V., Shershneva A.M., Nemtsev I.V. Shishatskaya E.I., Volova T.G. Collagen conjugation to carboxyl-modified poly(3-hydroxybutyrate) microparticles: preparation, characterization and evaluation *in vitro*. *Journal of Polymer Research*. 2022;29:324. DOI: 10.1007/s10965-022-03181-5.
11. Ng W.L., Chua C.K., Shen Y.-F. Print me an organ! Why we are not there yet. *Progress in Polymer Science*. 2019;97:101145. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2019.101145.
12. Ravichandran R., Islam M.M., Alarcon E.I., Samanta A., Wang S., Lundström P., et al. Functionalised type-I collagen as a hydrogel building block for bio-orthogonal tissue engineering applications. *Journal of Materials Chemistry. B*. 2016;4(2):318-326. DOI: 10.1039/c5tb02035b.
13. Behan K., Dufour A., Garcia O., Kelly D. Methacrylated cartilage ECM-based hydrogels as injectables and bioinks for cartilage tissue engineering. *Biomolecules*. 2022;12(2):216. DOI: 10.3390/biom12020216.
14. Tronci G., Russell S.J., Wood D.J. Photo-active collagen systems with controlled triple helix architecture. *Journal of Materials Chemistry. B*. 2013;1(30):3705-3715. DOI: 10.1039/c3tb20720j.
15. Buttafoco L., Kolkman N.G., Engbers-Buijtenhuijs P., Poot A.A., Dijkstra P.J., Vermes I., Feijen J. Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2006;27(5):724-734. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.06.024.
16. Huang G.P., Shanmugasundaram S., Masih P., Pandya D., Amara S., Collins G., Arinzeh T.L. An investigation of common crosslinking agents on the stability of electrospun collagen scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 2015;103(2):762-771. DOI: 10.1002/jbm.a.35222.
17. Tu R., Shen S.-H., Lin D., Hata C., Thyagarajan K., Noishiki Y., Quijano R.C. Fixation of bioprosthetic tissues with monofunctional and multifunctional polyepoxy compounds. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1994;28(6):677-684. DOI: 10.1002/JBM.820280604.
18. Bubnis W.A., Ofner III C.M. The determination of ϵ -amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry*. 1992;207(1):129-133. DOI: 10.1016/0003-2697(92)90513-7.
19. Parfenov V.A., Khesuani Y.D., Petrov S.V., Karalkin P.A., Koudan E.V., Nezhurina E.K., et al. Magnetic levitational bioassembly of 3D tissue construct in space. *Science Advances*. 2020;6(29):eaba4174. DOI: 10.1126/sciadv.aba4174.
20. Grinberg V.Y., Burova T.V., Grinberg N.V., Buyanovskaya A.G., Khokhlov A.R., Kozhunova E.Yu., et al. Functionalized thermoresponsive microgels based on N-isopropylacrylamide: energetics and mechanism of phase transitions. *European Polymer Journal*. 2020;133:109722. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109722.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Фарион Иван Александрович,
к.х.н., научный сотрудник,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
✉ fariv@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2723-6569>

Буинов Александр Станиславович,
инженер,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
buinov.aleksandr.96@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5216-685X>

Никишина Алена Николаевна,
инженер,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
alenaniknikishina@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0007-9260-7625>

Бурдуковский Виталий Федорович,
д.х.н., доцент, заместитель директора
по научной работе,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
burdvit@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3104-3591>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 26.09.2023.
Одобрена после рецензирования 18.10.2023.
Принята к публикации 31.10.2023.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ivan A. Farion,
Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
✉ fariv@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2723-6569>

Aleksandr S. Buinov,
Engineer,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
buinov.aleksandr.96@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5216-685X>

Alena N. Nikishina,
Engineer,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
alenaniknikishina@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0007-9260-7625>

Vitalii F. Burdukovskii,
Dr. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Deputy Director for Research,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
burdvit@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3104-3591>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

Information about the article

The article was submitted 26.09.2023.
Approved after reviewing 18.10.2023.
Accepted for publication 31.10.2023.

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Научная статья

УДК 546.47:547.466.33-318:547.553.1:547.642:547.592.12:615.212

EDN: BXPEAR

DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-476-482



Синтез и антиноцицептивная активность 2,2'-(1,4-фенилен)бис[3-арил-2-азаспиро[3.5]нонан-1-онов]

Р.Р. Махмудов***✉, Е.А. Никифорова*, Д.П. Зверев*,
Л.А. Балюкина*, А.П. Скачков*

*Пермский государственный национальный исследовательский университет,
г. Пермь, Российская Федерация

**Федеральный научный центр медико-профилактических технологий
управления рисками здоровью населения, г. Пермь, Российская Федерация

Аннотация. Азетидин-2-оны, или β -лактамы, обладают разнообразной биологической активностью и на протяжении многих лет привлекают внимание ученых в качестве потенциальной основы для новых лекарственных препаратов. Спиро- β -лактамы также проявляют биологическую активность, в связи с чем представляет интерес синтез и изучение свойств новых соединений этого класса. Целью работы являлось изучение антиноцицептивной активности ряда синтезированных бис(спиролактамов), а именно 2,2'-(1,4-фенилен)бис[3-арил-2-азаспиро[3.5]нонан-1-онов]. Данные бис(спироазетидин-2-оны) получены взаимодействием двукратного избытка реактива Реформатского, образованного из метил 1-бромциклогексанкарбоксилата и цинка, с N,N'-(1,4-фенилен)бис(1-арилметаниминами) при кипячении в смеси толуола и гексаметилфосфортриамина в соотношении 10:1 в течение 4 часов. Впервые синтезированы бис(спиро- β -лактамы) на основе дииминов, полученных из п-фенилендиамина и 2-метоксибензойного, п-толуилового и 3-бромбензойного альдегидов. Состав и структура не описанных ранее продуктов установлена методами ИК-, ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии и элементного анализа. Проведено исследование антиноцицептивной активности полученных соединений методом «горячая пластинка» на беспородных белых мышах обоих полов с внутрибрюшинной инъекцией. Эффект оценивался через 2 часа после введения. У ряда синтезированных соединений обнаружена антиноцицептивная активность на уровне или выше препарата сравнения метамизола натрия. В качестве мишени антиноцицептивного действия исследуемых веществ можно рассматривать нервные окончания, так как под влиянием веществ в поведении животных признаков центрального действия не наблюдается. Таким образом, проведенные исследования показали перспективность дальнейшего поиска биологически активных веществ среди соединений данного ряда.

Ключевые слова: реакция Реформатского, β -лактамы, азетидин-2-оны, спираны, биологическая активность, антиноцицептивная активность

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2023 г.

Для цитирования: Махмудов Р.Р., Никифорова Е.А., Зверев Д.П., Балюкина Л.А., Скачков А.П. Синтез и антиноцицептивная активность 2,2'-(1,4-фенилен)бис[3-арил-2-азаспиро[3.5]нонан-1-онов] // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 476–482. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-476-482. EDN: BXPEAR.

CHEMICAL SCIENCES

Original article

Synthesis and antinociceptive activity of 2,2'-(1,4-phenylene)bis[3-aryl-2-azaspiro[3.5]nonan-1-ones]

Ramiz R. Makhmudov***✉, Elena A. Nikiforova*, Dmitriy P. Zverev*,
Lyudmila A. Balyukina*, Andrey P. Skachkov*

*Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

**Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies,
Perm, Russian Federation

© Махмудов Р.Р., Никифорова Е.А., Зверев Д.П., Балюкина Л.А., Скачков А.П., 2023

Abstract. Over the years, azetidin-2-ones, or β -lactams, have received a lot of attention from scientists as potential drug candidates due to their diverse biological activity. Spiro- β -lactams also exhibit biological activity; therefore, it is of interest to synthesize and study the properties of new compounds belonging to this class. The study aims to examine the antinociceptive activity of several synthesized bis(spirolactams), specifically 2,2'-(1,4-phenylene)bis[3-aryl-2-azaspiro[3.5]nonan-1-ones]. These bis(spiroazetidine-2-ones) were obtained in the interaction of a twofold excess of the Reformatsky reagent, derived from methyl 1-bromocyclohexane carboxylate and zinc, with N,N' -(1,4-phenylene)bis(1-арилметанимины) by means of boiling them in a 10:1 mixture of toluene and hexamethylphosphorotriamide for four hours. Bis(spiro- β -lactams) on the basis of diimines derived from *p*-phenylenediamine, 2-methoxybenzaldehyde, *p*-tolualdehyde, and 3-bromobenzoic aldehyde were synthesized for the first time. The composition and structure of the previously undescribed products were established using IR, ^1H , and ^{13}C NMR spectroscopy and elemental analysis. The antinociceptive activity of the obtained compounds was studied on outbred white mice of both sexes via the hot plate test with an intraperitoneal injection. The effect was estimated two hours after administration. Several synthesized compounds were found to exhibit antinociceptive activity at or above the level of the comparator product – metamizole sodium. Nerve endings can be considered the target of the antinociceptive activity of examined substances since under the effect of these substances, no signs of central action are observed in the behavior of animals. Thus, the conducted studies showed the promise of further search for biologically active substances among the compounds of this series.

Keywords: Reformatsky reaction, β -lactams, azetidin-2-ones, spiranes, biological activity, antinociceptive activity

Funding. The Perm Research and Educational Center "Rational subsoil use" financially supported the work, 2023.

For citation: Makhmudov R.R., Nikiforova E.A., Zverev D.P., Balyukina L.A., Skachkov A.P. Synthesis and antinociceptive activity of 2,2'-(1,4-phenylene)bis[3-aryl-2-azaspiro[3.5]nonan-1-ones]. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):476-482. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-476-482. EDN: BXPEAR.

ВВЕДЕНИЕ

Реактивы Реформатского взаимодействуют с основаниями Шиффа с образованием β -аминэфиров или, в случае внутримолекулярной циклизации первоначальных продуктов присоединения, β -лактамов [1]. Цинкорганические реагенты, полученные из метиловых эфиров 1-бромциклоалканкарбоновых кислот и цинка, в реакции с имидами образуют исключительно продукты внутримолекулярной циклизации, а именно спироазетидин-2-оны [2–4], причем, если исходные имины содержат две двойные связи углерод–азот, возможно получение бис(спироазетидин-2-онов) [5]. Спироазетидин-2-оновый фрагмент входит в состав природных и синтезированных соединений, которые обладают разнообразными видами биологической активности [6–15], бис(спироазетидиноны) также обладают биологической активностью [6, 15].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Инфракрасные (ИК) спектры соединений **3** записаны в вазелиновом масле с использованием спектрофотометра ФСМ 1202 («Инфраспек», Россия). Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C этих соединений записаны на спектрометре Avance III HD 400 (Bruker, Швейцария) (рабочая частота 400 (^1H) и 100 (^{13}C) МГц) в CDCl_3 , внутренний стандарт – гексаметилдисилоксан. Элементный анализ выполняли на анализаторе vario MICRO cube (Elementar, Германия). Температуру плавления измеряли на приборе MP-70 (Mettler Toledo, Швейцария).

Исходный метиловый эфир 1-бромциклогексанкарбоновой кислоты синтезировали последовательным взаимодействием циклогексанкарбоновой кислоты с тионилхлоридом, бромом и метанолом по ранее описанному методу [1]. N,N' -(1,4-Фенилен)бис(1-арилметанимины)

получали взаимодействием *p*-фенилендиамина с соответствующими ароматическими альдегидами по известной методике [16]. Все исходные соединения были синтезированы из коммерчески доступных реагентов (Acros Organics, Alfa Aesar, Sigma Aldrich).

Синтез 2,2'-(1,4-Фенилен)бис[3-арил-2-азаспиро[3.5]нонан-1-онов] (**3a–n**) [17]. Смесь 3 г измельченного в мелкую стружку цинка, каталитического количества (5–10 мг, 0,02–0,04 ммоль) сулемы, 20 мл безводного толуола, 2 мл гексаметилфосфортриамида, 3,31 г (15 ммоль) метилового эфира 1-бромциклогексанкарбоновой кислоты (**1**) и 6 ммоль соответствующего N,N' -(1,4-Фенилен)бис(1-арилметанимина) (**2a–n**) кипятили 4 ч, охлаждали, декантировали с избытка цинка, гидролизывали 5%-й уксусной кислотой, органический слой отделяли, из водного слоя продукты реакции дважды экстрагировали этилацетатом. Органический слой, объединенный с экстрактом, высушивали безводным сульфатом натрия, после чего растворители отгоняли и продукт перекристаллизовывали из этилацетата.

Соединения **3a–k** были описаны ранее [17], их температуры плавления и спектральные характеристики согласуются с литературными данными.

2,2'-(1,4-Фенилен)бис[3-(2-метоксифенил)-2-азаспиро[3.5]нонан-1-он] (**3l**). Белое кристаллическое вещество, выход 78%, т.пл. 284–286 °С. ИК, ν , cm^{-1} : 1728 (CO). ^1H ЯМР (CDCl_3), δ , м.д.: 1,09–1,04 м (4H, CH_2 в алицикле), 1,26–1,34 м (2H, CH_2 в алицикле), 1,44–1,56 м (6H, CH_2 в алицикле), 1,65–1,75 м (2H, CH_2 в алицикле), 1,78–1,95 м (4H, CH_2 в алицикле), 2,01–2,07 м (2H, CH_2 в алицикле), 3,89 с (6H, 2 MeO), 5,06 с (2H, 2 CH), 6,84 т [2H, J 7,6 Гц, 2 (2-MeOC $_6\text{H}_4$)], 6,91 д [2H, J 7,6 Гц, 2 (2-MeOC $_6\text{H}_4$)], 7,01 д [2H, J 7,6 Гц, 1,6 Гц, 2 (2-MeOC $_6\text{H}_4$)], 7,25 д [2H, J 7,6 Гц, 1,6 Гц,

¹Beilstein F.K. Beilsteins Handbuch der Organischen Chemie / hrsg. B. Prager, P.H. Jacobson, P. Schmidt, D. Stern, F. Richter. Bd. 9. Auflage 4. Berlin: J. Springer, 1970. S. 9.

2 (2-MeOC₆H₄), 7,20 с (4H, 1,4-фенилен). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃), δ, м.д.: 22,52, 23,27, 25,62, 27,76, 33,31 (CH₂ циклогексан), 59,80 (C спиратома); 55,37 (MeO); 61,01 (C³H); 110,44, 117,95, 120,62, 123,71, 127,71, 128,91, 133,04, 157,31 (C^{Ar}); 171,79 (CO). Найдено, %: C – 76,68; H – 7,09; N – 5,01. C₃₆H₄₀N₂O₄. Вычислено, %: C – 76,57; H – 7,14; N – 4,96.

2,2'-(1,4-Фенилен)бис[3-(4-метилфенил)-2-азаспиро[3.5]нонан-1-он] (**3m**). Белое кристаллическое вещество, выход 74%, т.пл. 282–284 °С. ИК-спектр, ν, см⁻¹: 1744 (CO). ¹H ЯМР (CDCl₃), δ, м.д.: 1,01–1,10 м (2H, CH₂ в алицикле), 1,14–1,24 м (2H, CH₂ в алицикле), 1,29–1,39 м (2H, CH₂ в алицикле), 1,40–1,64 м (8H, CH₂ в алицикле), 1,80–1,90 м (4H, CH₂ в алицикле), 1,99–2,06 м (2H, CH₂ в алицикле), 2,33 с (6H, 2 Me), 4,66 с (2H, CH), 7,00 д, 7,12 д [8H, 2 (4-MeC₆H₄), J 8,8 Гц], 7,16 с (4H, 1,4-фенилен). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃), δ, м.д.: 21,28 (Me); 22,32, 23,60, 25,43, 27,75, 33,62 (CH₂ циклогексан), 59,87 (C спиратома); 66,59 (C³); 117,98, 127,25, 129,41, 132,28, 133,95, 138,01 (C^{Ar}); 171,27 (CO). Найдено, %: C – 81,29; H – 7,64; N – 5,18. C₃₆H₄₀N₂O₂. Вычислено, %: C – 81,17; H – 7,57; N – 5,26.

2,2'-(1,4-Фенилен)бис[3-(3-бромфенил)-2-азаспиро[3.5]нонан-1-он] (**3n**). Белое кристаллическое вещество, выход 63%, т.пл. 234–235 °С. ИК-спектр, ν, см⁻¹: 1728 (CO). ¹H ЯМР (CDCl₃), δ, м.д.: 1,09–1,17 м (4H, CH₂ в алицикле), 1,31–1,40 м (2H, CH₂ в алицикле), 1,43–1,64 м (8H, CH₂ в алицикле), 1,80–1,93 м (4H, CH₂ в алицикле), 2,00–2,10 м (2H, CH₂ в алицикле), 4,65 с (2H, CH), 7,08 д (2H, J 8,0 Гц), 7,08 т (2H, J 8,0 Гц), 7,08 т (2H, J 1,2 Гц), 7,45 д.т (2H, J 8,0 Гц, 1,2 Гц) [2 (3-BrC₆H₄)], 7,16 с (4H, 1,4-фенилен). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃), δ, м.д.: 22,40, 23,59, 25,33, 27,90, 33,67 (CH₂ циклогексан), 60,33 (C спиратома); 65,99 (C³); 117,98, 123,01, 125,83, 130,24, 130,33, 131,54, 133,81, 137,95 (C^{Ar}); 170,82 (CO). Найдено, %: C – 61,73; H – 5,12; N – 4,25. C₃₄H₃₄Br₂N₂O₂. Вычислено, %: C – 61,64; H – 5,17; N – 4,23.

Исследование антиноцицептивной активности соединений **3a–n**. В исследовании были использованы животные – белые мыши обоих полов. Животные поступили из питомника «Пушино» Московской области. Масса мышей составляла 22–24 г. Длительность акклиматизационного периода для животных равнялась 14 суткам.

Животные содержались в соответствии с правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986 г.), документами, регламентирующими содержание животных^{2,3}, обращение с ними также соответствовало правилам лабораторной практики (GLP, от англ. good laboratory practice) и Приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19 июня 2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Животных кормили дважды в сутки. Их пищевой рацион содержал все необходимые компоненты для нормальной жизнедеятельности. Использовали комбикорм из ООО «Лабораторкорм».

Оценку анальгетического действия препарата изучали на беспородных мышях (самках) массой 18–22 г методом

термического раздражения «горячая пластинка» по Эдди – Леймбаху [18].

Для оценки болевой чувствительности использовали анальгезиметр EH-01 (Orchid Scientific, Индия).

Исследуемые вещества вводили внутривентриально в дозе 50 мг/кг в виде взвеси в 2%-м крахмальном растворе за 30 мин до помещения животных на нагретую до 53,5 °С металлическую пластинку. Максимальной длительностью латентного периода (период cutoff) выбран интервал 40 с, так как нахождение животного на пластинке в течение более длительного времени могло привести к ожогу лап и причинению ему физических страданий. Показателем ноцицепции служила измеряемая в секундах длительность пребывания животного на «горячей пластинке» до наступления оборонительной реакции – облизывания задних лапок, потряхивания ими либо попыток выпрыгнуть. Эффект оценивали через 0,5, 1,0 и 2,0 ч после введения соединений. В опыте использовались животные с исходным временем наступления оборонительного рефлекса не более 15 с. Каждое соединение испытывали на шести животных. Результаты оценивали по увеличению времени наступления оборонительного рефлекса по сравнению с исходными данными.

Контрольной группе животных вводили 2%-ю крахмальную слизь, в качестве препарата сравнения использовали коммерчески доступную субстанцию метамизола натрия ООО «Фармхимкомплект» в дозе 93 мг/кг (ED₅₀) [19].

Статистическую обработку экспериментального материала проводили с использованием t-критерия Стьюдента [20, с. 81]. Эффект считали достоверным при $p < 0,05$.

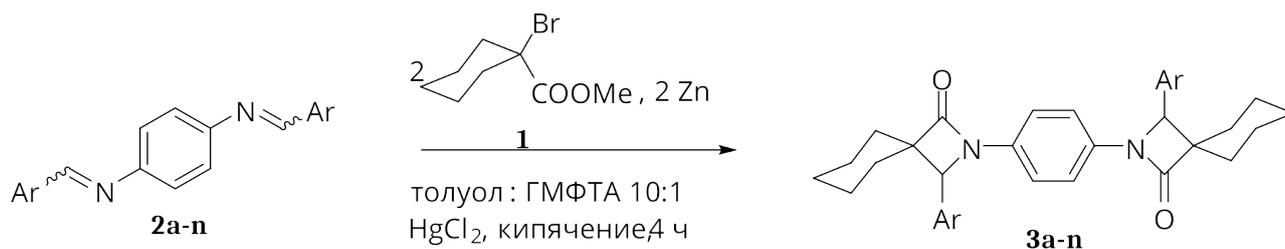
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Замещенные азетидин-2-оны, или β-лактамы, проявляют биологическую активность, в связи с чем представляет интерес синтез и исследование свойств новых соединений, имеющих в своем составе этот фрагмент. С целью поиска новых биологически активных соединений по известной методике [18] нами были синтезированы 2,2'-(1,4-фенилен)бис[3-арил-2-азаспиро[3.5]нонан-1-оны] (**3a–k**), а также ранее не описанные 2,2'-(1,4-фенилен)бис[3-(2-метоксифенил)-2-азаспиро[3.5]нонан-1-он] (**3l**), 2,2'-(1,4-фенилен)бис[3-(4-метилфенил)-2-азаспиро[3.5]нонан-1-он] (**3m**) и 2,2'-(1,4-фенилен)бис[3-(3-бромфенил)-2-азаспиро[3.5]нонан-1-он] (**3n**) (схема).

Состав и строение соединений **3l–n** подтверждены данными элементного анализа, ИК-, ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопии. В ИК-спектрах этих соединений присутствуют полосы поглощения в области 1744–1728 см⁻¹, в спектрах ЯМР ¹H характеристические сигналы метиновых протонов азетидиноновых циклов зафиксированы в области 4,65–5,06 м.д. Присутствие в спектрах ЯМР ¹H соединений **3l–n** одного набора сигналов свидетельствует о выделении их в виде одного диастереомера.

²ГОСТ 33215-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными: правила оборудования помещений и организации процедур. М.: Стандартинформ, 2016. 19 с.

³Руководство Р 1.2.3156-13 «Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья человека». М.: Изд-во ФЦГиЭ, 2014. 639 с.



Ar = Ph (**a**), 4-MeOC₆H₄ (**b**), 3,4-(MeO)₂C₆H₃ (**c**), 3,4-(OCH₂O)₂C₆H₃ (**d**), 4-Me₂NC₆H₄ (**e**),
 4-Et₂NC₆H₄ (**f**), 4-FC₆H₄ (**g**), 4-ClC₆H₄ (**h**), 4-BrC₆H₄ (**i**), 3-ClC₆H₄ (**j**), 2,4-Cl₂C₆H₃ (**k**),
 2-MeOC₆H₄ (**l**), 4-MeC₆H₄ (**m**), 3-BrC₆H₄ (**n**)

Схема синтеза 2,2'-(1,4-фенилен)бис[3-арил-2-азаспиро[3.5]нонан-1-онов] (соединений **3a-n**)

Synthesis of 2,2'-(1,4-phenylene)bis[3-aryl-2-azaspiro[3.5]nonan-1-ones] (**3a-n**)

Антиноцицептивная активность синтезированных соединений **3a-n** в дозах 50 мг/кг по результатам исследования методом «горячая пластинка»

Antinociceptive activity of compounds **3a-n** at doses of 50 mg/kg ("hot plate" test)

Соединение	Ar	Время оборонительного рефлекса через 2 ч, с
3a	Ph	21,30±0,64
3b	4-MeOC ₆ H ₄	19,60±0,68
3c	3,4-(CH ₃ O) ₂ C ₆ H ₃	22,25±1,24
3d	3,4-(OCH ₂ O) ₂ C ₆ H ₃	20,33±0,52
3e	4-Me ₂ NC ₆ H ₄	20,92±0,98
3f	4-Et ₂ NC ₆ H ₄	21,25±0,59
3g	4-FC ₆ H ₄	21,50±1,97
3h	4-ClC ₆ H ₄	19,10±0,88
3i	4-BrC ₆ H ₄	21,30±0,44
3j	3-ClC ₆ H ₄	19,00±0,63
3k	2,4-Cl ₂ C ₆ H ₃	18,22±0,70
3l	2-MeOC ₆ H ₄	21,67±1,13
3m	4-MeC ₆ H ₄	20,25±0,63
3n	3-BrC ₆ H ₄	24,08±0,91
Контроль – 2%-я крахмальная слизь		10,10±0,19
Метамизол натрия		16,33±3,02

Соединения **3a-n** были испытаны на антиноцицептивную активность методом термического раздражения «горячая пластинка». Было установлено, что наибольший эффект достигается через 2 ч после введения животным исследуемых веществ. Результаты испытаний представлены в таблице. Из данных таблицы следует, что все анализируемые соединения проявляют выраженное антиноцицептивное действие, превосходящее по активности эталон сравнения – метамизол натрия. Наиболее высокий антиноцицептивный эффект оказывает соединение **3n** с 3-бромфенильным заместителем.

Таким образом, препаративная методика синтеза позволяет получить 2,2'-(1,4-фенилен)бис[3-арил-2-азаспиро[3.5]нонан-1-оны], обладающие выраженной антиноцицептивной активностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований синтезированы неизвестные ранее бис(спироазетидин-2-оны) (**3l-n**), структуры которых охарактеризованы методами ИК-, ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопии. Все изученные соединения составляют перспективную группу органических веществ для дальнейшего целенаправленного синтеза и фармакологического скрининга с целью создания новых лекарственных средств.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Dardoize F., Moreau J.-L., Gaudemar M. Sur la reactivite des metaliquesmediaires de Reformatsky vis-a-vis de la fonction imine // Comptesrendus de l'Académie des Sciences. 1969. Vol. 268, nu. 25. P. 2228–2230.
- Kirillov N.F., Shchepin V.V. Reaction with azomethines or azines of Reformatsky reagents prepared from methyl 1-bromocycloalkanoates and zinc // Russian Journal of General Chemistry. 2005. Vol. 75, no. 4. P. 590–592. DOI: 10.1007/s11176-005-0277-z.
- Shchepin V.V., Melekhin V.S., Kirillov N.F. Reformatsky reaction of methyl 1-bromocyclobutane- and 1-bromocycloheptanecarboxylates with Schiff bases // Russian Journal of Organic Chemistry. 2007. Vol. 43, no. 11. P. 1632–1634. DOI: 10.1134/S1070428007110085.
- Nikiforova E.A., Baibarodskikh D.V., Zverev D.P., Dmitriev M.V., Kirillov N.F. Reaction of 2- and 4-(Arylmethylideneamino)phenols with Methyl 1-Bromocyclohexanecarboxylate and Zinc // Russian Journal of

- Organic Chemistry. 2021. Vol. 57, no. 8. P. 1275–1280. DOI: 10.1134/S1070428021080066.
- Kirillov N.F., Nikiforova E.A., Baibarodskikh D.V., Zakharova T.A., Govorushkin L.S. Synthesis of new bis(spiro-β-lactams) via interaction of methyl 1-bromocycloalcanecarboxylates with zinc and N,N'-bis(arylmethylidene)benzidines // Journal of Chemistry. 2019. P. 7496512. DOI: 10.1155/2019/7496512.
- Jarrahpour A., Jowkar Z., Haghighijoo Z., Heiran R., Rad J.A., Sinou V., et al. Synthesis, in-vitro biological evaluation, and molecular docking study of novel spiro-β-lactam-isatin hybrids // Medicinal Chemistry Research. 2022. Vol. 31, no. 6. P. 1026–1034. DOI: 10.1007/s00044-022-02898-8.
- Bari S.S., Bhalla A. Spirocyclic β-lactams: synthesis and biological evaluation of novel heterocycles // Heterocyclic scaffolds I: β-lactams / ed. B.K. Banik. Berlin – Heidelberg: Springer, 2010. P. 49–99. DOI: 10.1007/7081_2009_8.

- 8.** Nikiforova E.A., Makhmudov R.R., Rudin A.A., Dmitriev M.V., Baibarodskikh D.V., Kirillov N.F., et al. Reaction of *N'*-(arylmethylidene)-2-oxo-2*H*-chromene-3-carbohydrazides with methyl 1-bromocycloalkanecarboxylates and zinc // *Russian Journal of General Chemistry*. 2021. Vol. 91, no. 1. P. 64–71. DOI: 10.1134/S1070363221010060.
- 9.** Alborz M., Pournajati R., Rad J.A., Jarrahpour A., Karbalaee-Heidari H.R., Brunel J.M., et al. Design and preparation of β -lactam derivatives bearing phenanthrenimidazole as cytotoxic agents // *ChemistrySelect*. 2022. Vol. 7, no. 29. P. e202202306. DOI: 10.1002/slct.202202306.
- 10.** Ranjbari S., Behzadi M., Sepehri S., Aseman M.D., Jarrahpour A., Mohkam M., et al. Investigations of antiproliferative and antioxidant activity of β -lactam morpholino-1,3,5-triazine hybrids // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2020. Vol. 28, no. 8. P. 115408. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115408.
- 11.** Heiran R., Sepehri S., Jarrahpour A., Digiorgio C., Douafer H., Brunel J.M., et al. Synthesis, docking and evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of novel morpholine capped β -lactam derivatives // *Bioorganic Chemistry*. 2020. Vol. 102. P. 104091. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104091.
- 12.** Hosseyni S., Jarrahpour A. Recent advances in β -lactam synthesis // *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2018. Vol. 16, no. 38. P. 6840–6852. DOI: 10.1039/c8ob01833b.
- 13.** Jarrahpour A., Rezaei S., Sinou V., Latour C., Brunel J.M. Synthesis of some novel 3-spiro monocyclic β -lactams and their antibacterial and antifungal investigations // *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*. 2017. Vol. 41, no. 2. P. 337–342. DOI: 10.1007/s40995-016-0033-8.
- 14.** Rad J.A., Jarrahpour A., Ersanlı C.C., Atıoğlu Z., Akkurt M., Turos E. Synthesis of some novel indeno[1,2-*b*]quinoxalin spiro- β -lactam conjugates // *Tetrahedron*. 2017. Vol. 73, no. 8. P. 1135–1142. DOI: 10.1016/j.tet.2017.01.009.
- 15.** Jarrahpour A., Ebrahimi E., De Clereq E., Sinou V., Latour C., Bouktab L.D., et al. Synthesis of mono-, bis-spiro- and dispiro- β -lactams and evaluation of their antimalarial activities // *Tetrahedron*. 2011. Vol. 67, no. 45. P. 8699–8704. DOI: 10.1016/j.tet.2011.09.041.
- 16.** Sek D., Siwy M., Bijak K., Grucela-Zajac M., Malecki G., Smolarek K., et al. Comparative studies of structural, thermal, optical, and electrochemical properties of azines with different end groups with their azomethine analogues toward application in (opto)electronics // *Journal of Physical Chemistry A*. 2013. Vol. 117, no. 40. P. 10320–10332. DOI: 10.1021/jp407623u.
- 17.** Nikiforova E.A., Baibarodskikh D.V., Kirillov N.F., Glavatskikh L.A. Reformatsky reaction of methyl 1-bromocyclohexanecarboxylate with *N,N'*-(1,4-phenylene) bis(1-arylmethanimines) // *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2020. Vol. 56, no. 6. P. 1029–1033. DOI: 10.1134/S107042802006010X.
- 18.** Eddy N.B., Leimbach D.J. Synthetic analgesics. II. Dithie-nylbutenyl- and dithienylbutylamines // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1953. Vol. 107, no. 3. P. 385–393.
- 19.** Сигидин Я.А., Шварц Г.Я., Арзамасцев А.П., Либерман С.С. Лекарственная терапия воспалительного процесса: экспериментальная и клиническая фармакология противовоспалительных препаратов. М.: Медицина, 1988. 238 с.
- 20.** Бельский М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Медгиз, 1963. 152 с.
- 1.** Dardoize F., Moreau J.-L., Gaudemar M. On the reactivity of the Reformatsky reagent in relation to the imine function. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*. 1969;268(25):2228-2230. (In French).
- 2.** Kirillov N.F., Shchepin V.V. Reaction with azomethines or azines of Reformatsky reagents prepared from methyl 1-bromocycloalkanoates and zinc. *Russian Journal of General Chemistry*. 2005;75(4):590-592. DOI: 10.1007/s11176-005-0277-z.
- 3.** Shchepin V.V., Melekhin V.S., Kirillov N.F. Reformatsky reaction of methyl 1-bromocyclobutane- and 1-bromocycloheptanecarboxylates with Schiff bases. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2007;43(11):1632-1634. DOI: 10.1134/S1070428007110085.
- 4.** Nikiforova E.A., Baibarodskikh D.V., Zverev D.P., Dmitriev M.V., Kirillov N.F. Reaction of 2- and 4-(Arylmethylideneamino)phenols with Methyl 1-Bromocyclohexanecarboxylate and Zinc. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2021;57(8):1275-1280. DOI: 10.1134/S1070428021080066.
- 5.** Kirillov N.F., Nikiforova E.A., Baibarodskikh D.V., Zakharova T.A., Govorushkin L.S. Synthesis of new bis(spiro- β -lactams) via interaction of methyl 1-bromocycloalkanecarboxylates with zinc and *N,N'*-bis(arylmethylidene)benzidines. *Journal of Chemistry*. 2019;7496512. DOI: 10.1155/2019/7496512.
- 6.** Jarrahpour A., Jowkar Z., Haghighijoo Z., Heiran R., Rad J.A., Sinou V., et al. Synthesis, in-vitro biological evaluation, and molecular docking study of novel spiro- β -lactam-isatin hybrids. *Medicinal Chemistry Research*. 2022;31(6):1026-1034. DOI: 10.1007/s00044-022-02898-8.
- 7.** Bari S.S., Bhalla A. Spirocyclic β -lactams: synthesis and biological evaluation of novel heterocycles. In: Banik B.K. (ed.). *Heterocyclic scaffolds I: β -lactams*. Berlin – Heidelberg: Springer; 2010, p. 49-99. DOI: 10.1007/7081_2009_8.
- 8.** Nikiforova E.A., Makhmudov R.R., Rudin A.A., Dmitriev M.V., Baibarodskikh D.V., Kirillov N.F., et al. Reaction of *N'*-(arylmethylidene)-2-oxo-2*H*-chromene-3-carbohydrazides with methyl 1-bromocycloalkanecarboxylates and zinc. *Russian Journal of General Chemistry*. 2021;91(1):64-71. DOI: 10.1134/S1070363221010060.
- 9.** Alborz M., Pournajati R., Rad J.A., Jarrahpour A., Karbalaee-Heidari H.R., Brunel J.M., et al. Design and preparation of β -lactam derivatives bearing phenanthrenimidazole as cytotoxic agents. *Chemistry Select*. 2022;7(29):e202202306. DOI: 10.1002/slct.202202306.
- 10.** Ranjbari S., Behzadi M., Sepehri S., Aseman M.D., Jarrahpour A., Mohkam M., et al. Investigations of antiproliferative and antioxidant activity of β -lactam morpholino-1,3,5-triazine hybrids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2020;28(8):115408. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115408.
- 11.** Heiran R., Sepehri S., Jarrahpour A., Digiorgio C., Douafer H., Brunel J.M., et al. Synthesis, docking and evaluation

of in vitro anti-inflammatory activity of novel morpholine capped β -lactam derivatives. *Bioorganic Chemistry*. 2020;102:104091. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104091.

12. Hosseini S., Jarrahpour A. Recent advances in β -lactam synthesis. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2018;16(38):6840-6852. DOI: 10.1039/c8ob01833b.

13. Jarrahpour A., Rezaei S., Sinou V., Latour C., Brunel J.M. Synthesis of some novel 3-spiro monocyclic β -lactams and their antibacterial and antifungal investigations. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*. 2017;41(2):337-342. DOI: 10.1007/s40995-016-0033-8.

14. Rad J.A., Jarrahpour A., Ersanlı C.C., Atioğlu Z., Akkurt M., Turos E. Synthesis of some novel indeno[1,2-b]quinoxalinspiro- β -lactam conjugates. *Tetrahedron*. 2017;73(8):1135-1142. DOI: 10.1016/j.tet.2017.01.009.

15. Jarrahpour A., Ebrahimi E., De Clereq E., Sinou V., Latour C., Bouktab L.D., et al. Synthesis of mono-, bis-spiro- and dispiro- β -lactams and evaluation of their antimalarial activities. *Tetrahedron*. 2011;67(45):8699-8704. DOI: 10.1016/j.tet.2011.09.041.

16. Sek D., Siwy M., Bijak K., Grucela-Zajac M., Malecki G., Smolarek K., et al. Comparative studies of

structural, thermal, optical, and electrochemical properties of azines with different end groups with their azomethine analogues toward application in (opto)electronics. *Journal of Physical Chemistry A*. 2013;117(40):10320-10332. DOI: 10.1021/jp407623u.

17. Nikiforova E.A., Baibarodskikh D.V., Kirillov N.F., Glavatskikh L.A. Reformatsky reaction of methyl 1-bromocyclohexanecarboxylate with *N,N'*-(1,4-phenylene)bis(1-arylmethanimines). *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2020;56(6):1029-1033. DOI: 10.1134/S107042802006010X.

18. Eddy N.B., Leimbach D.J. Synthetic analgesics. II. Dithie-nylbutenyl- and dithienylbutylamines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1953;107(3):385-393.

19. Sigidin Ya.A., Shvarts G.Ya., Arzamastsev A.P., Liberman S.S. *Drug therapy of the inflammatory process: Experimental and clinical pharmacology of anti-inflammatory drugs*. Moscow: Meditsina; 1988, 238 p. (In Russian).

20. Belen'kii M.L. *Elements of quantitative assessment of pharmacological effect*. Leningrad: Medgiz; 1963, 152 p. (In Russian).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Махмудов Рамиз Рагибович,

к.фарм.н., доцент,
доцент, заведующий научно-исследовательской лабораторией,
Пермский государственный национальный исследовательский университет,
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15,
Российская Федерация,
старший научный сотрудник,
Федеральный научный центр
медико-профилактических технологий
управления рисками здоровью населения,
614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82,
Российская Федерация,
✉ bav@psu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2326-3976>

Никифорова Елена Александровна,

к.х.н., доцент,
Пермский государственный национальный исследовательский университет,
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15,
Российская Федерация,
vikro@ya.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0871-9154>

Зверев Дмитрий Павлович,

аспирант,
Пермский государственный национальный исследовательский университет,
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15,
Российская Федерация,
mitia.zwerev@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6060-7678>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ramiz R. Makhmudov,

Cand. Sci. (Pharmacology), Associate Professor,
Associate Professor, Head of the Research Laboratory,
Perm State National Research University,
15, Bukirev St., Perm, 614990,
Russian Federation,
Senior Researcher,
Federal Scientific Center for Medical and Preventive
Health Risk Management Technologies,
82 Monastyrskaya St., Perm, 614045,
Russian Federation,
✉ bav@psu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2326-3976>

Elena A. Nikiforova,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Perm State National Research University,
15, Bukirev St., Perm, 614990,
Russian Federation,
vikro@ya.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0871-9154>

Dmitriy P. Zverev,

Postgraduate Student,
Perm State National Research University,
15, Bukirev St., Perm, 614990,
Russian Federation,
mitia.zwerev@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6060-7678>

Балюкина Людмила Анатольевна,
старший преподаватель,
Пермский государственный национальный
исследовательский университет,
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15,
Российская Федерация,
balyukina@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3979-9019>

Lyudmila A. Balyukina,
Senior Lecturer,
Perm State National Research University,
15, Bukirev St., Perm, 614990,
Russian Federation,
balyukina@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3979-9019>

Скачков Андрей Павлович,
старший преподаватель,
Пермский государственный национальный
исследовательский университет,
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15,
Российская Федерация,
skachkov@psu.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2504-765X>

Andrey P. Skachkov,
Senior Lecturer,
Perm State National Research University,
15, Bukirev St., Perm, 614990,
Russian Federation,
skachkov@psu.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2504-765X>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 13.09.2023.
Одобрена после рецензирования 18.10.2023.
Принята к публикации 31.10.2023.

Information about the article

*The article was submitted 13.09.2023.
Approved after reviewing 18.10.2023.
Accepted for publication 31.10.2023.*

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 582.998.2:57.085.2
EDN: RSM MRT
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-483-493



Влияние состава питательной среды на сохранение жизнеспособности и генетической стабильности эксплантов хризантемы садовой при депонировании *in vitro*

Н.Н. Иванова✉, В.А. Цюпка, Н.В. Корзина

ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», г. Ялта, Российская Федерация

Аннотация. Для сохранения *in vitro* ценных сортов хризантемы садовой перспективно культивирование растений при низких положительных температурах. Целью данного исследования было изучение влияния концентраций хлорхолинхлорида в специализированной среде на жизнеспособность, физиологические и морфо-анатомические показатели растений хризантемы сортов Excel, Sheer Purple, William Seward, а также их генетическую стабильность после 12 месяцев депонирования в условиях генобанка *in vitro*. Верхушки микропобегов *in vitro* без листьев помещали на среду 1/4 Мурасиге – Скуга + 60,0 г/л сахарозы и 0,2–0,8 г/л хлорхолинхлорида. Экспланты сохраняли в холодильных камерах при температуре 4 °С. После 12 месяцев сохранения наблюдали снижение кинетики роста по мере увеличения концентрации хлорхолинхлорида в среде. Жизнеспособность эксплантов снижалась с 96 до 91% с ростом концентрации хлорхолинхлорида. Эффективный фотохимический квантовый выход фотосистемы II снизился более чем в два раза при депонировании по сравнению с контролем. Был выявлен ряд гистологических особенностей листьев депонируемых в генобанке *in vitro* эксплантов: у листовых пластинок уменьшались толщина листа и плотность мезофилла, деградировала палисадная ткань, отмечена высокая степень регуляции транспирации. С помощью SSR- и ISSR-анализа показано, что микропобеги исследуемых сортов хризантемы после депонирования *in vitro* идентичны исходным растениям. Проведенные исследования показали, что наличие в среде 0,6–0,8 г/л хлорхолинхлорида снижает кинетику роста эксплантов при сохранении высокой жизнеспособности и генетической стабильности.

Ключевые слова: *Chrysanthemum × morifolium* Ramat., эксплант, морфометрические параметры, депонирование *in vitro*, ISSR-анализ

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Министерства образования и науки Российской Федерации FNNS-2022-0002. Исследования осуществлены на оборудовании уникальной научной установки «Научный центр биотехнологии, геномики и депонирования растений» («ФИТОБИОГЕН») ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН» (г. Ялта, Российская Федерация).

Для цитирования: Иванова Н.Н., Цюпка В.А., Корзина Н.В. Влияние состава питательной среды на сохранение жизнеспособности и генетической стабильности эксплантов хризантемы садовой при депонировании *in vitro* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 483–493. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-483-493. EDN: RSM MRT.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Effect of growth medium composition on the viability and genetic stability of *Chrysanthemum × morifolium* Ramat. explants under *in vitro* cold storage conditions

Natalya N. Ivanova✉, Valentina A. Tsiupka, Natalia V. Korzina

Order of the Red Banner Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center RAS,
Yalta, Russian Federation

© Иванова Н.Н., Цюпка В.А., Корзина Н.В., 2023

Abstract. Cultivation of plants at low positive temperatures is promising for the *in vitro* preservation of valuable *Chrysanthemum × morifolium* Ramat. varieties. The study aims to examine the effect of chlorocholine chloride concentrations in a specialized medium on the viability and the physiological and morpho-anatomical parameters of chrysanthemum plants (Excel, Sheer Purple, and William Seward varieties), as well as their genetic stability after 12 months of cold storage under *in vitro* gene bank conditions. *In vitro* microshoot tips (without leaves) were placed on a 1/4 Murashige and Skoog medium supplemented with 60.0 g/L sucrose and 0.2–0.8 g/L chlorocholine chloride. The explants were stored in cooling chambers at a temperature of 4 °C. After 12 months of preservation, a reduction was observed in growth kinetics with increasing concentration of chlorocholine chloride in the medium. The viability of explants decreased from 96 to 91% at higher concentrations of chlorocholine chloride. The effective photochemical quantum yield of photosystem II decreased more than twice under cold storage conditions as compared to the control. Several histological features were identified in the leaves of *in vitro* explants cold-stored in the gene bank: decreased in leaf thickness and mesophyll density in leaf blades, degradation of palisade tissue, and a high degree of transpiration regulation. The SSR and ISSR analyses were used to show that the microshoots of the examined chrysanthemum varieties were identical to the original plants following *in vitro* cold storage. The conducted studies revealed that the presence of 0.6–0.8 g/L chlorocholine chloride in the medium reduces the growth kinetics of explants while maintaining their high viability and genetic stability.

Keywords: *Chrysanthemum × morifolium* Ramat., explant, morphometric parameters, *in-vitro* cold storage, ISSR analysis

Funding. Ministry of Education and Science of the Russian Federation supported the work (State task FNNS-2022-0002). Unique equipment of the “Scientific Center for Biotechnology, Genomics and Plant Deposition” (FITOBIOGEN) of Nikita Botanical Gardens (Yalta, Russian Federation) was used for the research.

For citation: Ivanova N.N., Tsiupka V.A., Korzina N.V. Effect of growth medium composition on the viability and genetic stability of *Chrysanthemum × morifolium* Ramat. explants under *in vitro* cold storage conditions. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):483-493. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-483-493. EDN: RSM MRT.

ВВЕДЕНИЕ

Хризантема (*Chrysanthemum × morifolium* Ramat.) является популярной декоративно-цветочной культурой. В настоящее время методы биотехнологии позволяют быстро размножить новые селекционные сорта и формы хризантемы, оздоровить от патогенов и сохранить генофонд ценных растений. Одним из наиболее перспективных путей сохранения биоразнообразия растений в настоящее время является создание медленно растущих коллекций *in vitro* [1–5]. В качестве основного подхода при этом рассматривается создание таких условий культивирования, при которых снижается скорость обменных процессов и используется минимальное количество питательных веществ, что позволяет эксплантам находиться в состоянии покоя длительное время при сохранении физиологической стабильности [6–8]. Это достигается путем снижения температуры культивирования и интенсивности освещения, а также повышения концентрации осмотиков, введения в состав питательной среды ретардантов [3, 9–13]. Повышенная концентрация сахарозы в питательной среде задерживает рост клеток, не вызывая токсического эффекта, и может быть использована для поддержания культур в состоянии покоя в течение длительного периода [14]. Ретарданты способны затормаживать рост растений. Они вызывают укорачивание и утолщение побега, расширение листовой пластинки [6–8]. Большое значение имеют тип и физиологическое состояние экспланта, размер культурального сосуда для хранения [3], а также система мониторинга, которая позволяет контролировать качество сохраняемых растительных образцов. При появлении негативных признаков в процессе депонирования экспланты переносят на свежие питательные среды для индукции побегообразования, а затем снова помещают на хранение *in vitro* [15].

В то же время низкие температура и интенсивность освещения имеют физиологические последствия, такие как потеря клетками воды, уменьшение дыхания, увядание, что влияет на безопасность длительного сохранения эксплантов. Ингибиторы роста меняют морфологию растений и иногда могут индуцировать метилирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) [16] и соматональные вариации [17]. Для мониторинга стабильности и целостности растений, культивируемых *in vitro*, исследователи использовали морфо-анатомические, молекулярные и биохимические признаки [18]. Анатомические особенности очень важны и играют ключевую роль в идентификации растений [19–22]. В ряде работ отражена возможность использования фотосинтетических параметров для определения функционального состояния растений при культивировании и сохранении их *in vitro* [23–26].

Целью данного исследования было изучение влияния концентраций хлорохлинхлорида (ССС) в специализированной среде на жизнеспособность, физиологические и морфо-анатомические показатели растений хризантемы садовой сортов Excel, Sheer Purple, William Seward, а также их генетическую стабильность после 12 месяцев депонирования в условиях генобанка *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В экспериментах по клональному микроразмножению в качестве эксплантов использовали верхушки побегов крупноцветковой *Chrysanthemum × morifolium* Ramat. сортов Excel, Sheer Purple, William Seward из коллекции ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН». Для закладки эксплантов хризантемы на сохранение при низкой положительной температуре применяли

методы, разработанные в лаборатории морфогенеза и депонирования растений *in vitro* [11].

Стерильные меристемы культивировали на среде Мурасиге – Скуга (МС) [27], дополненной 0,75 мг/л кинетина (Sigma, США), 2,5 мг/л сульфата аденина и 0,25 мг/л α-нафтилуксусной кислоты (Sigma, США). Питательные среды содержали 30,0 г/л сахарозы (Panreac, Испания) и 9,0 г/л агара (Panreac, Испания) [28].

Для депонирования использовали микропобеги растений, культивируемых *in vitro* в течение 10 месяцев. В стерильных условиях верхушки микропобегов длиной 1,0 см без листьев помещали на среду 1/4 МС, дополненную ССС (BASF, Германия) (0,0 г/л; 0,2 г/л; 0,4 г/л; 0,6 г/л; 0,8 г/л), 60 г/л сахарозы и 9 г/л агар-агара. Контролем служила среда 1/4 МС, дополненная 60 г/л сахарозы. Питательные среды автоклавировали при 120 °С в течение 15 мин в стерилизаторе LAC 5060S (Daihan Labtech, Южная Корея). Депонирование *in vitro* проводили при температуре 4±1 °С. Культуральные сосуды с эксплантами сохраняли в холодильных камерах марки Liebherr FKvsl 4113 (Австрия). Интенсивность освещения составляла 1,25 мкМ×м⁻²×с⁻¹. Растительный материал оценивали через 12 месяцев культивирования с помощью качественных и количественных характеристик эксплантов: длина микропобега, окраска экспланта, количество адвентивных микропобегов, количество листьев на микропобеге, количество корней первого порядка на микропобеги, общая длина корней и жизнеспособность.

Для оценки функционального состояния ассимилирующих тканей сохраняемых растений проводили исследования параметров фотосинтетической активности. Измерения флуоресценции хлорофилла осуществляли на переносном импульсном флуориметре MINI-PAM II, (HeinzWalz, Германия). Микропобеги перед измерениями показателей флуоресценции адаптировали к темноте в течение 30 мин [29]. В ходе экспериментов регистрировали следующие показатели: F_0 – нулевой, фоновый уровень флуоресценции; F_m – максимальная флуоресценция, F_s – стационарный уровень флуоресценции, свидетельствующий об установлении стабильного

и наиболее интенсивного уровня фотосинтеза; F_0' и F_m' – минимальный и максимальный уровни флуоресценции на свету. В работе использовали следующие расчетные коэффициенты: переменная флуоресценция $F_v = F_m - F_0$, максимальный фотохимический квантовый выход фотосистемы II (ФС II) F_v/F_m' , а также коэффициент спада флуоресценции $Rfd = (F_m' - F_s) / F_s$. Эффективный фотохимический квантовый выход ФС II рассчитывали по формуле $Y(II) = (F_m' - F_s) / F_m'$.

Для проведения морфо-анатомического анализа листовых пластинок и побегов хризантемы использовали растения сорта William Seward, сохраняемые на среде 1/4 МС, дополненной 0,2 или 0,8 г/л ССС, а также на среде контроля. Срезы органов растений изготавливали из свежего материала на замораживающем микротоме МЗ-2 («Точмедприбор», Украина), окрашивали раствором метиленового синего и исследовали при помощи светового микроскопа Olympus CX41 (Olympus, Япония), оснащенного цифровой камерой SC 50 (Olympus, Германия).

Оценку генетической стабильности сохраняемого материала проводили с использованием SSR- и ISSR-маркеров. Геномную ДНК выделяли из листьев сохраняемых эксплантов и листьев растений, культивируемых *in vitro*, с применением цетилтриметиламмония бромида (2×ЦТАБ) с добавлением 2%-го поливинилпирролидона [30]. Качество и количество полученной ДНК оценивали на нанофотометре NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия). Амплификацию проводили с применением набора BioMaster HS-Taq PCR (Биолабмикс, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Полимеразную цепную реакцию проводили в термоциклере C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Сингапур). Для изучения влияния длительного хранения эксплантов при низкой положительной температуре на генетическую стабильность изучаемых сортов хризантемы использовали четыре пары микросателлитных праймеров и два межмикросателлитных маркера серии UBC (табл. 1). Условия реакции были следующими: 1) начальная денатурация ДНК при 95 °С (5 мин); 2) 35 циклов по 30 с

Таблица 1. SSR- и ISSR-праймеры для постановки полимеразной цепной реакции

Table 1. SSR and ISSR primers used for polymerase chain reaction

Название праймера	Мотив	Нуклеотидная последовательность	T_m , °С	Ссылка на источник
JH30	(CA) ₈	F: GGTGAGGTGCAGAACAAGGATA R: ACCAGATTGGAATGAAACGAAA	53	Y. Zhang, et al., 2013 [31]
KNUCRY-59	(CA) ₅	F: CGGTCCTCTCAGCCTTATTG R: GGTGTGTGTGTGAAGGTGCT	57	A.A. Khaing, et al., 2013 [32]
KNUCRY-85	(CA) ₄	F: GACCAACAAAACGGAATGCT R: GTTGTCTGTCGGTTGGCTAGT	50	
KNUCRY-98	(AC) ₄	F: TCACATCACACATCACTGCAA R: TGTGTGTGAGGGACACATGA	55	
UBC 824	(TC) ₈ G	TCTCTCTCTCTCTCG	52	J.A. Rocha, et al., 2014 [33]
UBC 843	(CT) ₈ RA	CTCTCTCTCTCTCTRA (R = A, G)	53	

при 95 °С, 1 мин при температуре отжига праймеров (Tm) (см. табл. 1), 1 мин при 72 °С; 3) окончательная элонгация при 72 °С (5 мин). Амплифицированные фрагменты анализировали с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле с буфером, содержащим смесь трис(гидроксиметил)аминометана, борной кислоты и этилендиаминтетрауксусной кислоты при 100 В в течение 1–1,5 ч с использованием универсального источника питания PowerPacTM (Bio-Rad, Сингапур). Агарозный гель визуализировали с помощью системы гелъдокументации E-box (Vilber Lourmat, Франция).

Для статистической обработки полученных результатов использовали программное приложение Statistica 10.0.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные ранее исследования показали возможность 12-месячного сохранения эксплантов хризантемы некоторых сортов при низкой положительной температуре и наличии в питательной среде 60 г/л сахарозы и 0,2 г/л ССС [11, 34]. При этом наблюдалось заметное снижение кинетики роста у исследуемых сортов по сравнению с контролем при сохранении высокой жизнеспособности эксплантов. Однако многие побеги хризантемы и после 12 месяцев депонирования на питательной среде с 60 г/л сахарозы и 0,2 г/л ССС сильно вытягивались. Для дальнейшего снижения кинетики роста при сохранении морфогенетического потенциала проведены исследования по увеличению концентрации ССС в питательной среде на фоне стабильной концентрации сахарозы.

Скрининг депонируемых в течение 12 месяцев культур показал, что при концентрации ССС 0,2–0,8 г/л и сахарозы 60 г/л количество жизнеспособных эксплантов у растений хризантемы находилось в пределах 91–96%. Наблюдали замедление роста эксплантов в 2 раза по сравнению с контролем с увеличением концентрации

ССС. Так, длина адвентивных побегов снижалась с ростом концентрации ССС от 2,52 до 1,52 см у сорта Excel, от 2,96 до 1,38 см у сорта Sheer Purple и от 1,98 до 1,20 см у сорта William Seward (табл. 2, рис. 1).

Побеги и листья в течение всего периода сохранения на всех вариантах сред с ССС имели зеленую окраску, интенсивность которой незначительно усиливалась с ростом концентрации ССС.

Наблюдали появление отдельных участков с антоциановой окраской побега, что является физиологическим ответом эксплантов на длительное воздействие низкой положительной температуры. Образование корней происходило только на среде 1/4 МС, дополненной 0,2 г/л ССС. Одновременно отмечали и наличие 1–2 укороченных адвентивных микропобегов. Ни в одном из вариантов опыта не происходило формирование каллуса в основании побегов, что весьма важно для исключения самоклональной изменчивости при длительном сохранении.

Анализ морфометрических показателей изучаемых сортов хризантемы показал, что с увеличением концентрации ССС в среде до значений 0,6 и 0,8 г/л замедлялись рост побегов и образование листьев. При этом наблюдали незначительное снижение жизнеспособности эксплантов, что сопровождалось пожелтением и опадением листьев или отмиранием верхушек побегов.

Оценка флуоресценции хлорофилла в ФС II использовалась в ряде исследований для определения скорости фотосинтеза у различных растений, включая *Triticum turgidum* L. [25], *Prunus. africana* [23] и *Pseudotsuga menziesii* [35]. Более низкие значения максимального фотохимического квантового выхода ФС II при депонировании растений хризантемы *in vitro* (табл. 3) могут быть связаны со структурными изменениями фотосинтезирующих тканей, а также снижением ассими-

Таблица 2. Морфометрические характеристики эксплантов хризантемы садовой после 12 месяцев депонирования (размер исходного экспланта 1,0 см)

Table 2. Morphometric characteristics of garden chrysanthemum explants after 12-months deposition (initial explant size 1.0 cm)

Концентрация хлорхолинхлорида, г/л	Длина побега, см	Количество листьев в побеге, шт.	Количество корней в побеге, шт.	Длина корней, см	Жизнеспособность, %
Сорт Excel					
Контроль	2,60±0,05	5,20±0,20	0,00	0,00	98,00±0,26
0,2	2,52±0,16	5,20±0,48	0,60±0,40	0,70±0,40	96,40±0,27
0,4	1,90±0,04	4,60±0,40	0,00	0,00	95,70±0,33
0,6	1,60±0,07	4,20±0,20	0,00	0,00	93,40±0,40
0,8	1,52±0,08	3,40±0,40	0,00	0,00	91,20±0,39
Сорт Sheer Purple					
Контроль	3,50±0,40	7,0±0,44	0,00	0,00	97,90±0,38
0,2	2,96±0,02	7,40±0,40	1,20±0,58	0,81±0,31	96,40±0,31
0,4	1,78±0,20	4,80±0,86	0,00	0,00	92,80±0,43
0,6	1,66±0,10	5,40±0,40	0,00	0,00	92,80±0,44
0,8	1,38±0,14	4,20±0,66	0,00	0,00	91,10±0,43
Сорт William Seward					
Контроль	6,60±0,40	7,40±0,40	0,00	0,00	96,80±0,24
0,2	1,98±0,25	6,60±0,92	0,80±0,20	0,83±0,32	96,70±0,21
0,4	1,64±0,97	5,60 ±0,40	0,00	0,00	94,09±0,67
0,6	1,62±0,25	5,20±0,48	0,00	0,00	93,18±0,38
0,8	1,20±0,03	1,80±0,37	0,00	0,00	91,54±0,31

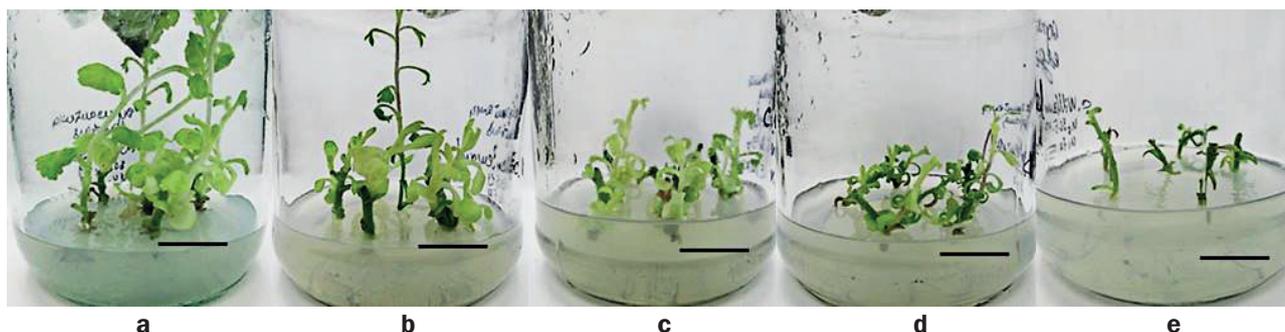


Рис. 1. Экспланты хризантемы садовой сорта William Seward после 12 месяцев депонирования при температуре 4 °С на среде 1/4 Мурасиге – Скуга: а – контроль; б – 0,2 г/л хлорхолинхлорида; с – 0,4 г/л хлорхолинхлорида; д – 0,6 г/л хлорхолинхлорида; е – 0,8 г/л хлорхолинхлорида (масштаб 1 см)

Fig. 1. William Seward chrysanthemum garden explants after 12-month deposition at 4 °C on 1/4 MS medium: a – control; b – 0.2 g/l CCC; c – 0.4 g/l CCC; d – 0.6 g/l CCC; e – 0.8 g/l CCC (scale 1 cm)

ляции под действием ретардантов. Выявлено снижение коэффициента спада флуоресценции, особенно у растений сорта Sheer Purple (см. табл. 3), однако уровень значений хлорофилл-дефицитных участков листьев растений, несущих признаки повреждения фотосинтетической системы, а также растений, потеря хлорофилла у которых вызвана осенним пожелтением или воздействием внешних неблагоприятных факторов, достигнут не был [36].

В нашем эксперименте эффективный фотохимический квантовый выход ФС II в контрольных условиях был приближен к значениям максимального фотохимического квантового выхода (см. табл. 3) и снижался более чем в 2 раза при депонировании. Определено, что концентрация ССС статистически достоверно не влияла на значение максимального фотохимического квантового выхода. При этом граница сублетального уровня по всем исследованным параметрам достигнута не была [26]. Таким образом, подобранные условия депонирования соответствуют сохранению фотосистемы в витальном состоянии, снижая ассимиляционные процессы. Лучшее жизнеспособное состояние и пластичность в регуляции фотосинтетических процессов установлено для хризантемы садовой сорта William Seward.

По данным наблюдений за морфологическими изменениями обнаружено, что листья в контроле имели характерную для хризантемы форму, при сохранении растений форма листа изменялась: упрощалась, становилась более линейной. Аналогичные наблюдения были сделаны авторами М.С. Шекхават и М. Манокари, которые отметили, что полученные *in vitro* растения обладают более мелкими листьями, более тонкими стеблями и корнями [26]. При применении невысокой концентрации ССС листья становились толще (125 мкм), а мезофилл – рыхлым с довольно большими межклетниками (рис. 2, табл. 4). Толщина губчатого мезофилла увеличилась до 110 мкм. Полученные данные согласуются с данными Д. Окелло с соавторами для *Aspilia africana* (Pers.), полученной *in vitro* из ткани листа [21]. При сохранении растений на среде 1/4 МС с добавлением 0,8 г/л ССС снижалась толщина как всего листа, так и покровных тканей и палисады. Количество слоев тканей не изменилось: был получен один слой палисадного мезофилла и три слоя губчатого. Эти структурные аномалии обусловлены не соматональными вариациями, а, скорее, стрессовой реакцией полученных *in vitro* растений на условия культивирования [26]. Отмечены изменения в морфологии, длине и плотности распределения трихом:

Таблица 3. Динамика параметров фотосинтетической активности фотосистемы II некоторых сортов хризантемы садовой при различных условиях депонирования *in vitro*

Table 3. Dynamics of photosystem II photosynthetic activity for some varieties of chrysanthemum garden under different conditions of deposition *in vitro*

Сорт	Концентрация хлорхолинхлорида, г/л				
	контроль	0,2	0,4	0,6	0,8
Максимальный фотохимический квантовый выход фотосистемы II					
Sheer Purple	0,56±0,03	0,41±0,01	0,34±0,02	0,31±0,03	0,34±0,02
Excel	0,58±0,02	0,44±0,02	0,35±0,02	0,40±0,02	0,31±0,03
William Seward	0,62±0,04	0,48±0,02	0,36±0,04	0,32±0,04	0,36±0,06
Коэффициент спада флуоресценции					
Sheer Purple	2,14±0,12	2,09±0,03	1,59±0,11	1,64±0,22	1,43±0,16
Excel	3,16±0,10	2,94±0,12	2,18±0,08	2,03±0,09	2,09±0,23
William Seward	3,07±0,18	2,16±0,16	2,05±0,20	2,74±0,18	2,51±0,29
Эффективный фотохимический квантовый выход фотосистемы II					
Sheer Purple	0,52±0,04	0,22±0,08	0,15±0,03	0,14±0,02	0,15±0,01
Excel	0,49±0,03	0,26±0,06	0,15±0,01	0,24±0,04	0,16±0,02
William Seward	0,60±0,01	0,39±0,13	0,21±0,06	0,22±0,04	0,24±0,02

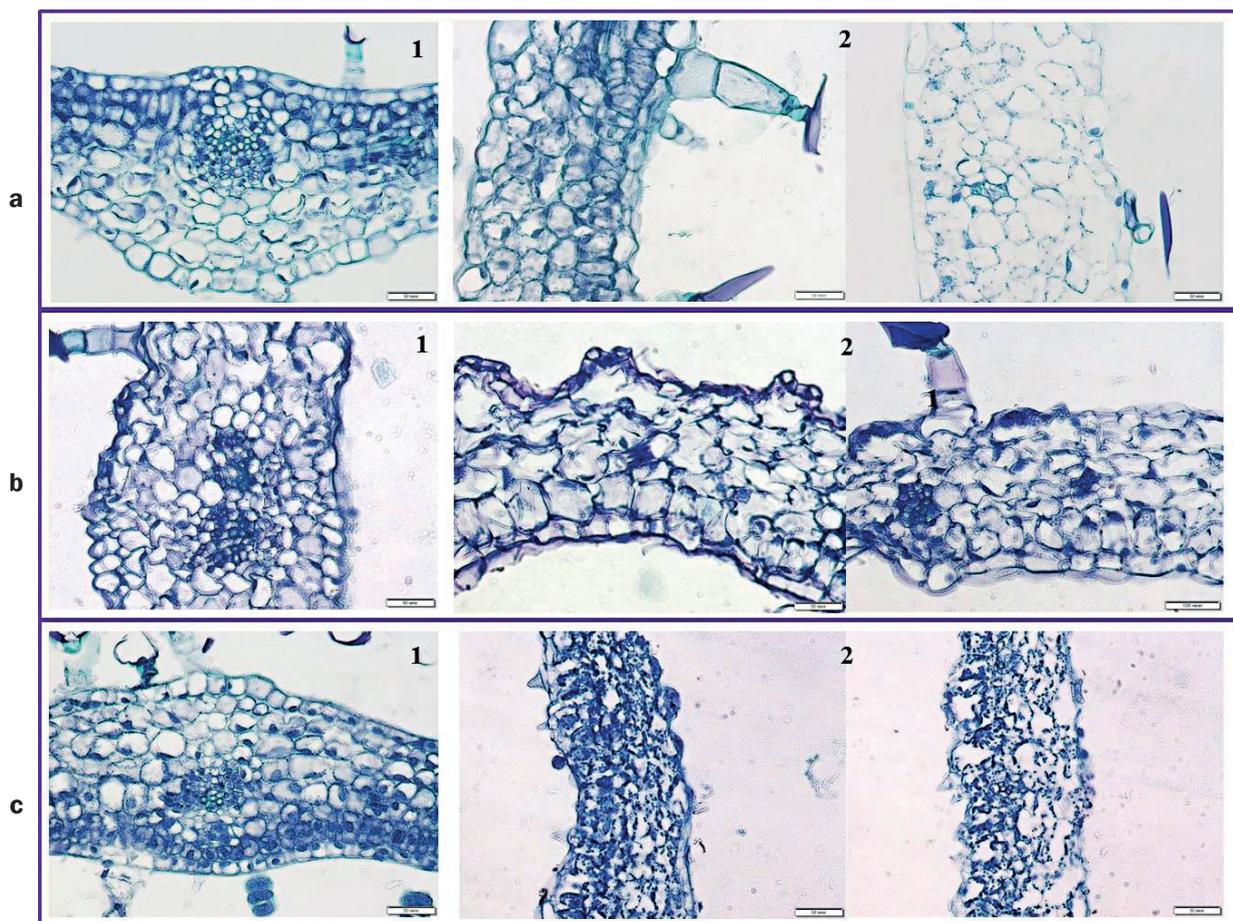


Рис. 2. Структура листьев хризантемы садовой сорта William Seward при депонировании *in vitro*: а – контроль, б – с использованием 0,2 г/л хлорхолинхлорида, с – с использованием 0,8 г/л хлорхолинхлорида; 1 – поперечный срез центральной жилки листа, 2 – срез средней части листа

Fig. 2. Structure of William Seward chrysanthemum garden leaves when deposited *in vitro*: а – control, б – using 0.2 g/l, с – using 0.8 g/l; 1 – cross section of the leaf central vein, 2 – section of the leaf middle part

Таблица 4. Основные показатели анатомической структуры листа хризантемы садовой сорта William Seward при депонировании *in vitro* ($M \pm SE$)

Table 4. Main parameters of the anatomical structure of William Seward chrysanthemum garden leaves when deposited *in vitro* ($M \pm SE$)

Показатель анатомической структуры	Концентрация хлорхолинхлорида, г/л		
	контроль	0,2	0,8
Толщина листовой пластины, мкм	190±6	208±6	153±5
Толщина адаксиальной эпидермы, мкм	23±1	27±1	13±0,5
Толщина палисадного мезофилла, мкм	42±6	51±3	39±7
Толщина губчатого мезофилла, мкм	69±3	110±15	85±10
Толщина абаксиальной эпидермы, мкм	18±2	17±1	9±3
Длина трихом, мкм	72±9	86±12	43±14
Расстояние между трихомами, мкм	103±26	125±12	78±24

при концентрации ССС 0,8 г/л появлялось большое количество мелких 1–3-клеточных простых и головчатых волосков. Побеги имели идентичную структуру, за исключением большей закладки спящих почек (рис. 3).

Основной задачей при создании коллекции *in vitro* является сохранение генотипа исходных образцов. При вегетативном размножении и размножении клона увеличивается количество митотических делений клеток, что может увеличивать накопление мутаций. Согласно

разработанной исследователями стратегии, генетическая идентификация сортовой и внутрисортовой клональной вариабельности может быть осуществлена поэтапно с использованием нескольких типов молекулярных маркеров [37]. AFLP-, SAMPL-, M-AFLP- и ISSR-маркеры помогают выявлять внутрисортовую генетическую вариабельность и характеризовать клоны с различными морфологическими и фенологическими признаками. Для выявления генетической стабильности при депонировании *in vitro*

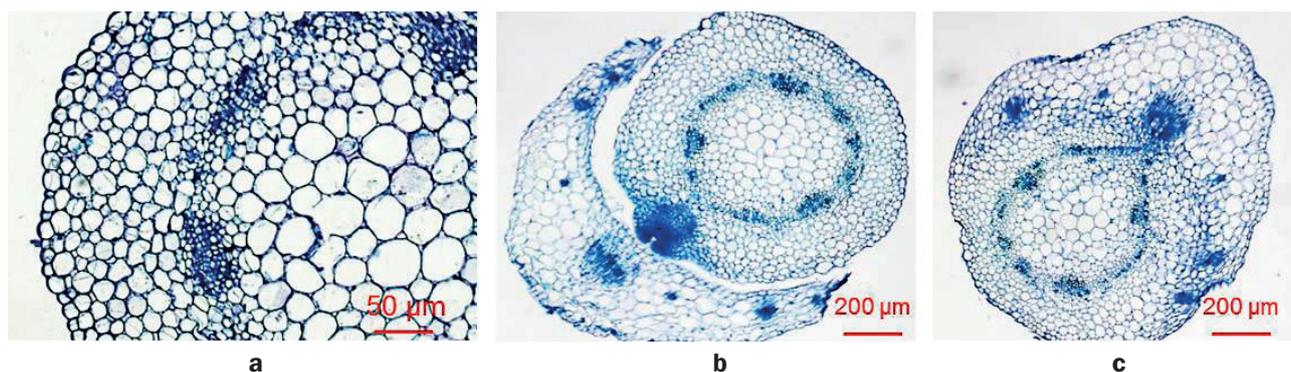


Рис. 3. Срезы побегов хризантемы садовой сорта William Seward при депонировании *in vitro*: а – контроль; б – на среде 1/4 Мурасиге – Скуга + 0,2 г/л хлорхолинхлорида; с – на среде 1/4 Мурасиге – Скуга + 0,8 г/л хлорхолинхлорида

Fig. 3. Slices of the shoots of William Seward chrysanthemum garden when deposited *in vitro*: а – control; б – 1/4 MS + 0.2 g/l CCC; с – 1/4 MS + 0.8 g/l CCC

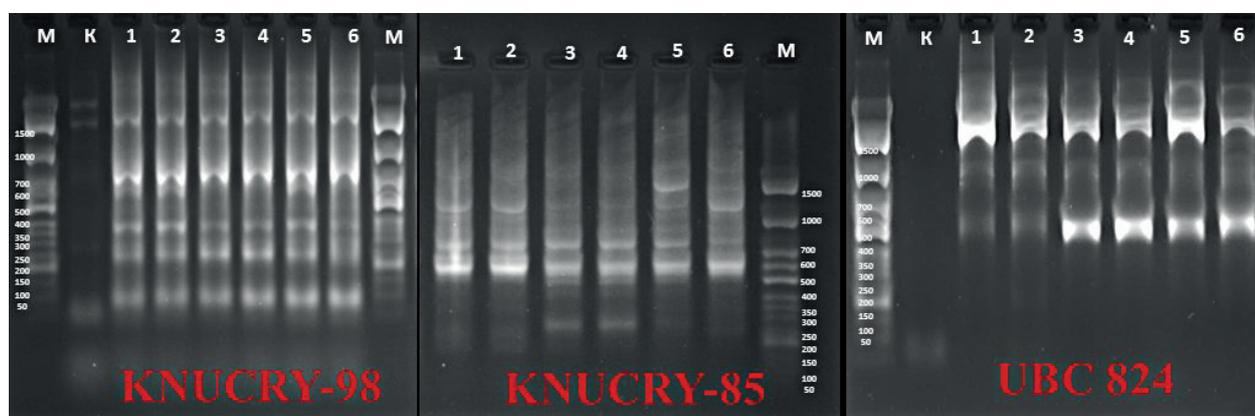


Рис. 4. Электрофорреграммы результатов SSR- и ISSR-анализа культивируемых *in vitro* растений хризантемы садовой и депонируемых микропобегов этих сортов: 1 – сорт Excel на депонировании, 2 – сорт Excel *in vitro*; 3 – сорт Sheer Purple на депонировании, 4 – сорт Sheer Purple *in vitro*; 5 – сорт William Seward на депонировании, 6 – сорт William Seward *in vitro*; М – маркер Step 50, К – отрицательный контроль

Fig. 4. Electrophoregrams of the results SSR and ISSR analysis of cultivated *in vitro* chrysanthemum plants and deposited microshoots of these cultivars: 1 – cultivar Excel on deposit, 2 – cultivar Excel *in vitro*; 3 – cultivar Sheer Purple on deposit, 4 – cultivar Sheer Purple *in vitro*; 5 – cultivar William Seward on deposit, 6 – cultivar William Seward *in vitro*; M – marker Step 50, K – negative control

мы провели сравнительный SSR- и ISSR-анализ участков геномной ДНК растений трех сортов хризантемы садовой в культуре *in vitro* и микрорастений этих сортов после 12 месяцев депонирования *in vitro* при низкой положительной температуре (рис. 4). Микросателлитные маркеры были подобраны из серий для оценки межсортового полиморфизма хризантемы [31, 32]. В результате анализа, выполненного с шестью маркерами, детектировано от одного до шести амплифицированных фрагментов размером от 220 до 1800 п.н. Наиболее информативными маркерами оказались KNUCRY-98, KNUCRY-85 и UBC-824. Всего идентифицировано 20 продуктов амплификации для сорта William Seward и по 23 фрагмента для сортов Excel и Sheer Purple. При анализе электрофорреграмм амплифицированных фрагментов генетических различий между растениями в культуре *in vitro* и сохраняемыми *in vitro* растениями не обнаружено. SSR- и ISSR-профили депонируемых растений полностью идентичны по количеству и длине ампликонов растениям исходных сортов в культуре *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты наших исследований показали возможность беспересадочного сохранения микропобегов и микрорастений изучаемых сортов хризантемы садовой в культуре *in vitro* в течение 12 месяцев. Использование CCC в концентрации 0,6 и 0,8 г/л в питательной среде 1/4 МС позволило снизить кинетику роста побегов в 2–3 раза при сохранении высокой жизнеспособности (91–92%). Применение осмотиков и ретардантов в среде способствовало возникновению структурных и функциональных перестроек, направленных на снижение ассимиляционных процессов. Закладка множественных боковых почек у депонируемых *in vitro* микропобегов также свидетельствовала о высоком морфогенном потенциале изученных сортов хризантемы после сохранения. Оптимизированная система депонирования *in vitro* обеспечивает сохранение генотипа исходных образцов, что подтверждено результатами SSR- и ISSR-анализа по трем информативным маркерам (KNUCRY-98, KNUCRY-85 и UBC-824).

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Sarasan V., Cripps R., Ramsay M., Atherton C., McMichen M., Prendergast G., et al. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2006. Vol. 42, no 3. P. 206–214. DOI: 10.1079/IVP2006769.
2. Paunesca A. Biotechnology for endangered plant conservation: a critical overview // *Romanian Biotechnological Letters*. 2009. Vol. 14, no. 1. P. 4095–4103.
3. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2011. Vol. 47, no. 1. P. 5–16. DOI: 10.1007/s11627-010-9327-2.
4. Watt M.P., Thokoane N.L., Mycock D., Blakeway F. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2000. Vol. 61. P. 161–164. DOI: 10.1023/A:1006447506869.
5. Молканова О.И., Коновалова Т.Ю. Ширнина И.В., Крахмалева И.Л., Ахметова Л.Р., Королева О.В. [и др.]. Методологические основы сохранения растений в генетическом банке *in vitro* // *Плодоводство и ягодоводство России*. 2019. Т. 58. С. 253–258. DOI: 10.31676/2073-4948-2019-58-253-258. EDN: AUUSLC.
6. Ivanova N.N., Tsiupka V.A., Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V. Rare and endemic plant species of Mountain Crimea flora: a morphogenic response to conservation in the gene bank *in vitro* // *Turczaninowia*. 2022. Т. 25. N 1. С. 24–30. DOI: 10.14258/turczaninowia.25.1.3. EDN: EEPQZI.
7. Panis B., Nagel M., Van den Houwe I. Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in *in vitro* collections and/or in liquid nitrogen // *Plants*. 2020. Vol. 9, no. 12. P. 1634. DOI: 10.3390/plants9121634.
8. Benson E., Harding K., Debouck D., Dumet D., Escobar R., Mafla G., et al. Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops. Global Public Goods Phase 2. Part 1. Project landscape and general status of clonal crop *in vitro* conservation technologies. Rome: System-Wide Genetic Resources Programme, 2011. 86 p.
9. Bell R.L., Reed B.M. *In vitro* tissue culture of pear: advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation // *Acta Horticulturae*. 2002. Vol. 596. P. 412–418. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.596.66.
10. Lambardi M., De Carlo A. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees // *Micropropagation of woody trees and fruits* / eds S.M. Jain, K. Ishii. Dordrecht: Springer, 2003. P. 815–840.
11. Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур: кол. монография / под общ. ред. И.В. Митрофановой. Симферополь: ИТ «Ариал», 2018. 260 с. EDN: YQVBFZ.
12. Тевфик А.Ш., Митрофанова И.В. Особенности получения и сохранения *Canna × hybrida hort* ex Backer в условиях *in vitro* // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2017. Т. 7. N 3. С. 99–109. DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-3-99-109. EDN: ZQJUJR.
13. Егорова Н.А., Загорская М.С., Абдурашитов С.Ф. Особенности длительного сохранения мяты сортов Ажурная и Бергамотная в коллекции *in vitro* // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2022. Т. 12. N 1. С. 64–75. DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-1-64-75. EDN: UDQENT.
14. Дорошенко Н.П., Куприкова А.С., Пузырнова В.Г. Влияние сахарозы на замедление роста и сохранение растений винограда в коллекции *in vitro* // *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2017. N 46. С. 33–48. Режим доступа: <https://journal.kubansad.ru/pdf/17/04/04.pdf> (дата обращения: 19.06.2023). EDN: YZJXNP.
15. Engelmann F, Engles J.M.M. Technology and strategies for ex situ conservation // *Managing Plant Genetic Diversity: proceedings of an International conference (Kuala Lumpur, 12–16 June 2000)*. DOI: 10.1079/9780851995229.0089.
16. Harding K. The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1994. Vol. 37. P. 31–38. DOI: 10.1007/BF00048114.
17. Kumar A. Somaclonal variation // *Potato genetics* / eds J.E. Bradshaw, G.R. Mackay. Wallingford: CAB International, 1994. P. 197–212.
18. Sonibare M.A., Adeniran A.A. Comparative micro-morphological study of wild and micropropagated *Dioscorea bulbifera* Linn. // *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014. Vol. 4, no. 3. P. 176–183. DOI: 10.1016/S2221-1691(14)60228-8.
19. Manokari M., Priyadharshini S., Shekhawat M.S. Microstructural and histochemical variations during *in vitro* to *in vivo* plant developments in *Aloe vera* (L.) Burm.f (Xanthorrhoeaceae) // *Industrial Crops Products*. 2021. Vol. 160. P. 113162. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.113162.
20. Manokari M., Priyadharshini S., Shekhawat M.S. Micro-structural stability of micropropagated plants of *Vitex negundo* L. // *Microscopy and Microanalysis*. 2021. Vol. 27, no. 3. P. 626–634. DOI: 10.1017/s1431927621000283.
21. Okello D., Yang S., Komakech R., Rahmat E., Chung Y., Gang R., et al. An *in vitro* propagation of *Aspilia africana* (Pers.) C. D. Adams, and evaluation of its anatomy and physiology of acclimatized plants // *Frontiers in Plant Science*. 2021. Vol. 12. P. 704896. DOI: 10.3389/fpls.2021.704896.
22. Mani M., Mathiyazhagan C., Dey A., Faisal M., Alatar A.A., Alok A., et al. Micro-morpho-anatomical transitions at various stages of *in vitro* development of *Crinum malabaricum* Lekhak and Yadav: a critically endangered medicinal plant // *Plant Biology*. 2023. Vol. 25, no. 1. P. 142–151. DOI: 10.1111/plb.13464.
23. Komakech R., Kim Y.-G., Kim W.J., Omujal F., Yang S., Moon B.C., et al. A micropropagation protocol for the endangered medicinal tree *Prunus africana* (Hook. f.) Kalkman: genetic fidelity and physiological parameter assessment // *Frontiers in Plant Science*. 2020. Vol. 11. P. 548003. DOI: 10.3389/fpls.2020.548003.
24. Brailko V.A., Mitrofanova O.V., Smykova N.V., Mitrofanova I.V. Some morphological and physiological features of chrysanthemum under *in vitro* culture // *Acta Horticulturae*. 2018. Vol. 1201. P. 607–612. DOI: 10.17660/ActaHortic.2018.1201.81.
25. Moustaka J., Ouzounidou G., Sperdouli I., Moustakas M. Photosystem II is more sensitive than Photosystem I to Al³⁺ induced phytotoxicity // *Materials*. 2018. Vol. 11, no 9. P. 1772. DOI: 10.3390/ma11091772.
26. Shekhawat M.S., Manokari M. Micromorphological and anatomical evaluation of *in vitro* and field transferred plants of *Coccinia indica* // *Agricultural*

Research. 2018. Vol. 7. P. 135–144. DOI: 10.1007/s40003-018-0326-6.

27. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15, no. 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

28. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Смыкова Н.В. Оздоровление и размножение *in vitro* перспективных сортов и гибридных форм хризантемы садовой селекции Никитского ботанического сада // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. 2021. N 138. С. 92–100. DOI: 10.36305/0513-1634-2021-138-92-100. EDN: IXUSZ.

29. Stirbet A., Govindjee. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2011. Vol. 104, no. 1-2. P. 236–257. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010.

30. Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components // *Plant Molecular Biology Reporter*. 1997. Vol. 15. P. 8–15. DOI: 10.1007/BF02772108.

31. Zhang Y., Wang C., Ma H., Dai S. Assessing the genetic diversity of chrysanthemum cultivars with microsatellites // *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2013. Vol. 138, no. 6. P. 479–486. DOI: 10.21273/JASHS.138.6.479.

32. Khaing A.A., Moe K.T., Hong W.J., Park C.S., Yeon K.H., Park H.S., et al. Phylogenetic relationships of chrysanthemums in Korea based on novel SSR markers //

Genetics and Molecular Research. 2013. Vol. 12, no. 4. P. 5335–5347. DOI: 10.4238/2013.November.7.8.

33. Rocha J.A., Vasconcelos S., da Silva F.M.M., Melo A.J., Silva M.F.S., de Miranda J.A.L., et al. ISSR primer selection for genetic variability analyses with jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew., Rutaceae) // *Forest Research*. 2014. Vol. 3, no. 3. P. 1000126. DOI: 10.4172/2168-9776.1000126.

34. Митрофанова И.В., Иванова Н.Н., Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П. Особенности депонирования хризантемы садовой в условиях *in vitro* // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. 2019. N 131. С. 110–117. DOI: 10.25684/NBG.boolt.131.2019.15. EDN: JZOSSS.

35. Perks M.P., Monaghan S., O'Reilly C., Osborne B.A., Mitchell D.T. Chlorophyll fluorescence characteristics, performance and survival of freshly lifted and cold stored Douglas fir seedlings // *Annals of Forest Science*. 2001. Vol. 58, no. 3. P. 225–235. DOI: 10.1051/forest:2001122.

36. Lichtenthaler H.K., Babani K. Light Adaptation and Senescence of the Photosynthetic Apparatus. Changes in Pigment Composition, Chlorophyll Fluorescence Parameters and Photosynthetic Activity // *Chlorophyll a fluorescence. Advances in photosynthesis and respiration* / eds G.C. Papageorgiou, Govindjee. Dordrecht: Springer, 2004. Vol 19. P. 713–736.

37. Meneghetti S., Calò A., Bavaresco L. A strategy to investigate the intravarietal genetic variability in *Vitis vinifera* L. for clones and biotypes identification and to correlate molecular profiles with morphological traits or geographic origins // *Molecular Biotechnology*. 2012. Vol. 52. P. 68–81. DOI: 10.1007/s12033-011-9475-6.

REFERENCES

1. Sarasan V., Cripps R., Ramsay M., Atherton C., McMichen M., Prendergast G., et al. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2006;42(3):206-214. DOI: 10.1079/IVP2006769.

2. Paunesca A. Biotechnology for endangered plant conservation: a critical overview. *Romanian Biotechnological Letters*. 2009;14(1):4095-4103.

3. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Development Biology – Plant*. 2011;47(1):5-16. DOI: 10.1007/s11627-010-9327-2.

4. Watt M.P., Thokoane N.L., Mycock D., Blakeway F. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2000;61:161-164. DOI: 10.1023/A:1006447506869.

5. Molkanova O.I., Konovalova T.Y., Shirnina I.V., Krakhmaleva I.L., Akhmetova L.R., Koroleva O.V., et al. Methodological bases of plant conservation in genebank *in vitro*. *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii = Pomiculture and small fruits culture in Russia*. 2019;58:253-258. (In Russian). DOI: 10.31676/2073-4948-2019-58-253-258. EDN: AUUSLC.

6. Ivanova N.N., Tsiupka V.A., Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V. Rare and endemic plant species of Mountain Crimea flora: a morphogenic response to conservation in the gene bank *in vitro*. *Turczaninowia*. 2022;25(1):24-30. DOI: 10.14258/turczaninowia.25.1.3. EDN: EEPQZI.

7. Panis B., Nagel M., Van den Houwe I. Challenges and prospects for the conservation of crop genetic

resources in field genebanks, in *in vitro* collections and/or in liquid nitrogen. *Plants*. 2020;9;12:1634. DOI: 10.3390/plants9121634.

8. Benson E., Harding K., Debouck D., Dumet D., Escobar R., Mafla G., et al. *Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops. Global Public Goods Phase 2. Part 1. Project landscape and general status of clonal crop in vitro conservation technologies*. Rome: System-Wide Genetic Resources Programme; 2011, 86 p.

9. Bell R.L., Reed B.M. *In vitro* tissue culture of pear: advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation. *Acta Horticulturae*. 2002;596:412-418. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.596.66.

10. Lambardi M., De Carlo A. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. In: Jain S.M., Ishii K. (eds). *Micropropagation of woody trees and fruits*. Dordrecht: Springer; 2003, p. 815-840.

11. Mitrofanova I.V. *Fundamentals of in vitro genebank creation of species, cultivars and forms in ornamental, aromatic and fruit crops*. Simferopol: IT "Arial"; 2018, 260 p. (In Russian). EDN: YQBBFZ.

12. Tefvik A.Sh., Mitrofanova I.V. *In vitro* derivation and storage characteristics of *Canna × Hybrida hort. ex backer*. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2017;7(3):99-109. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-3-99-109. EDN: ZQJUJP.

13. Yegorova N.A., Zagorskaya M.S., Abdurashytov S.F. Features of long-term preservation of Azhurnaya and Bergamotnaya mint cultivars in an *in vitro* collection. *Izvestiya*

Vuzov. *Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(1):64-75. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-1-64-75. EDN: UDQENT.

14. Doroshenko N., Kuprikova A., Puzyrnova V. Effect of sucrose on retardation of growth and preservation of grape plants in the collection *in vitro*. *Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit growing and viticulture of South Russia*. 2017;46:33-48. Available from: <https://journal.kubansad.ru/pdf/17/04/04.pdf> [Accessed 19th June 2023]. (In Russian). EDN: YZJXNP.

15. Engelmann F, Engles J.M.M. Technology and strategies for ex situ conservation. In: *Managing Plant Genetic Diversity: proceedings of an International conference*. 12–16 June 2000, Kuala Lumpur. DOI: 10.1079/9780851995229.0089.

16. Harding K. The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1994;37:31-38. DOI: 10.1007/BF00048114.

17. Kumar A. Somaclonal variation. In: Bradshaw J.E., Mackay G.R. (eds). *Potato genetics*. Wallingford: CAB International; 1994, p. 197-212.

18. Sonibare M.A., Adeniran A.A. Comparative micro-morphological study of wild and micropropagated *Dioscorea bulbifera* Linn. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014;4(3):176-183. DOI: 10.1016/S2221-1691(14)60228-8.

19. Manokari M., Priyadharshini S., Shekhawat M.S. Microstructural and histochemical variations during *in vitro* to *in vivo* plant developments in *Aloe vera* (L.) Burm.f (Xanthorrhoeaceae). *Industrial Crops Products*. 2021;160:113162. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.113162.

20. Manokari M., Priyadharshini S., Shekhawat M.S. Micro-structural stability of micropropagated plants of *Vitex negundo* L. *Microscopy and Microanalysis*. 2021;27(3):626-634. DOI: 10.1017/s1431927621000283.

21. Okello D., Yang S., Komakech R., Rahmat E., Chung Y., Gang R., et al. An *in vitro* propagation of *Aspilia africana* (Pers.) C. D. Adams, and evaluation of its anatomy and physiology of acclimatized plants. *Frontiers in Plant Science*. 2021;12:704896. DOI: 10.3389/fpls.2021.704896.

22. Mani M., Mathiyazhagan C., Dey A., Faisal M., Alatar A.A., Alok A., et al. Micro-morpho-anatomical transitions at various stages of *in vitro* development of *Crinum malabaricum* L. *Plant Biology*. 2023;25(1):142-151. DOI: 10.1111/plb.13464.

23. Komakech R., Kim Y.-G., Kim W.J., Omuja F., Yang S., Moon B.C., et al. A micropropagation protocol for the endangered medicinal tree *Prunus africana* (Hook. f.) Kalkman: genetic fidelity and physiological parameter assessment. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11:548003. DOI: 10.3389/fpls.2020.548003.

24. Brailko V.A., Mitrofanova O.V., Smykova N.V., Mitrofanova I.V. Some morphological and physiological features of chrysanthemum under *in vitro* culture. *Acta Horticulturae*. 2018;1201:607-612. DOI: 10.17660/ActaHortic.2018.1201.81.

25. Moustaka J., Ouzounidou G., Sperdouli I., Moustakas M. Photosystem II is more sensitive than Photosystem I to Al³⁺ induced phytotoxicity. *Materials*. 2018;11(9):1772. DOI: 10.3390/ma11091772.

26. Shekhawat M.S., Manokari M. Micromorphological and anatomical evaluation of *in vitro* and field transferred plants of *Coccinia indica*. *Agricultural Research*. 2018;7:135-144. DOI: 10.1007/s40003-018-0326-6.

27. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

28. Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Smykova N.V. *In vitro* cleaning up and micro-propagation of perspective chrysanthemum cultivars and new hybrid forms of the Nikita Botanical Gardens' breeding. *Byulleten' Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada = Bulletin of the State Nikitsky Botanical Gardens*. 2021;138:92-100. (In Russian). DOI: 10.36305/0513-1634-2021-138-92-100. EDN: IXTUSZ.

29. Stirbet A., Govindjee. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2011;104(1-2):236-257. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010.

30. Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1997;15:8-15. DOI: 10.1007/BF02772108.

31. Zhang Y., Wang C., Ma H., Dai S. Assessing the genetic diversity of chrysanthemum cultivars with micro-satellites. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2013;138(6):479-486. DOI: 10.21273/JASHS.138.6.479.

32. Khaing A.A., Moe K.T., Hong W.J., Park C.S., Yeon K.H., Park H.S., et al. Phylogenetic relationships of chrysanthemums in Korea based on novel SSR markers. *Genetics and Molecular Research*. 2013;12(4):5335-5347. DOI: 10.4238/2013.November.7.8.

33. Rocha J.A., Vasconcelos S., da Silva F.M.M., Melo A.J., Silva M.F.S., de Miranda J.A.L., et al. ISSR primer selection for genetic variability analyses with jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew., Rutaceae). *Forest Research*. 2014;3(3):1000126. DOI: 10.4172/2168-9776.1000126.

34. Mitrofanova I.V., Ivanova N.N., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P. Features of deposition of garden chrysanthemum under *in vitro* conditions. *Byulleten' Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada = Bulletin of the State Nikitsky Botanical Gardens*. 2019;(131):110-117. (In Russian). DOI: 10.25684/NBG.boolt.131.2019.15. EDN: JZOSSS.

35. Perks M.P., Monaghan S., O'Reilly C., Osborne B.A., Mitchell D.T. Chlorophyll fluorescence characteristics, performance and survival of freshly lifted and cold stored Douglas fir seedlings. *Annals of Forest Science*. 2001;58(3):225-235. DOI: 10.1051/forest:2001122.

36. Lichtenthaler H.K., Babani K. Light Adaptation and Senescence of the Photosynthetic Apparatus. Changes in Pigment Composition, Chlorophyll Fluorescence Parameters and Photosynthetic Activity. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (eds). *Chlorophyll a fluorescence. Advances in photosynthesis and respiration*. Dordrecht: Springer; 2004, vol. 19, p. 713-736.

37. Meneghetti S., Calò A., Bavaresco L. A strategy to investigate the intravarietal genetic variability in *Vitis vinifera* L. for clones and biotypes identification and to

correlate molecular profiles with morphological traits or geographic origins. *Molecular Biotechnology*. 2012;52:68-81. DOI: 10.1007/s12033-011-9475-6.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Иванова Наталия Николаевна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени
Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр РАН»,
298648, Республика Крым, г. Ялта,
ул. Никитский спуск, 52,
Российская Федерация,
✉ nnivanova2017@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7628-9646>

Цюпка Валентина Анатольевна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени
Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр РАН»,
298648, Республика Крым, г. Ялта,
ул. Никитский спуск, 52,
Российская Федерация,
valentina.brailko@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3853-0210>

Корзина Наталья Васильевна,
к.б.н., заведующий лабораторией,
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени
Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр РАН»,
298648, Республика Крым, г. Ялта,
ул. Никитский спуск, 52,
Российская Федерация,
natali.korz@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5220-5700>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 23.06.2023.
Одобрена после рецензирования 18.09.2023.
Принята к публикации 31.10.2023.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Natalya N. Ivanova,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Order of the Red Banner Nikita Botanical
Gardens – National Scientific Center RAS,
52, Nikitskiy Spusk, Yalta, 298648,
Crimea Republic, Russian Federation,
✉ nnivanova2017@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7628-9646>

Valentina A. Tsiupka,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Order of the Red Banner Nikita Botanical
Gardens – National Scientific Center RAS,
52, Nikitskiy Spusk, Yalta, 298648,
Crimea Republic, Russian Federation,
valentina.brailko@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3853-0210>

Natalia V. Korzina,
Cand. Sci. (Biology), Head of the Laboratory,
Order of the Red Banner Nikita Botanical
Gardens – National Scientific Center RAS,
52, Nikitskiy Spusk, Yalta, 298648,
Crimea Republic, Russian Federation,
natali.korz@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5220-5700>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 23.06.2023.
Approved after reviewing 18.09.2023.
Accepted for publication 31.10.2023.

Научная статья
УДК 634.75:581.14:58.01/.07:582.734.4:543.427.4
EDN: LJBWLS
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-494-505



Модуляция роста и аккумуляции химических элементов в растениях *Fragaria × ananassa* в условиях *in vivo* под действием хелатов кремния

Е.В. Амброс*✉, Е.С. Крупович*, Ю.П. Колмогоров**, Е.Г. Трофимова***,
И.С. Гусев****, Б.Г. Гольденберг*****

*Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация

**Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация

***Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация

****Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация

*****Центр коллективного пользования «Сибирский кольцевой источник фотонов» Института катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, пгт Кольцово, Российская Федерация

Аннотация. Значительный интерес среди биостимуляторов вызывают кремнийсодержащие препараты в связи с защитной ролью кремния в растениях от неблагоприятных факторов среды. В данной работе в качестве источника кремния использован механокомполит из шелухи риса и зеленого чая, содержащий растворимые хелатные комплексы диоксида кремния. Целью исследования являлось изучение влияния хелатов кремния на ростовые, физиологические показатели и содержание химических элементов в растениях *Fragaria × ananassa* (сорт Солнечная полянка) в условиях теплицы. Растения поливали водой без механокомполита (контроль) или водным раствором, содержащим 0,3 г/л механокомполита дважды за период. Отбор образцов проводили через неделю после последней обработки. Для определения концентрации химических элементов (Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Sr, Mo) в корнях и побегах земляники садовой предложено применение метода рентгенофлуоресцентного анализа на синхротронном излучении. Показано увеличение содержания хлорофилла а, суммы хлорофиллов а и b, каротиноидов, уменьшение содержания пероксида водорода и увеличение активности основных антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы) под действием механокомполита. Определено, что кремний накапливается под действием препарата преимущественно в побегах и оказывает влияние на аккумуляцию микро- и макроэлементов в побегах и корнях растений. Полученные результаты обосновывают использование кремнийсодержащей «зеленой химии» в качестве средств управления ростом и развитием растений земляники садовой в условиях *in vivo*.

Ключевые слова: *Fragaria × ananassa*, хелаты кремния, рост, физиологические показатели, рентгенофлуоресцентный анализ, синхротронное излучение

Благодарности. Для проведения исследований использованы материалы уникальной научной установки «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте» Центрального сибирского ботанического сада СО РАН (USU 440534). Измерения элементного состава методом рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения проводились на оборудовании Центра коллективного пользования «Сибирский центр синхротронного и терагерцового излучения» на базе уникальной научной установки «Комплекс ВЭПП-4 – ВЭПП-2000» в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда и Правительства Новосибирской области № 22-26-20061 (<https://rscf.ru/project/22-26-20061/>).

Для цитирования: Амброс Е.В., Крупович Е.С., Колмогоров Ю.П., Трофимова Е.Г., Гусев И.С., Гольденберг Б.Г. Модуляция роста и аккумуляции химических элементов в растениях *Fragaria × ananassa* в условиях *in vivo* под действием хелатов кремния // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 494–503. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-494-505. EDN: LJBWLS.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Modulation of growth and chemical element accumulation in *Fragaria* × *ananassa* plants *in vivo* under the effect of silicon chelates

Elena V. Ambros*✉, Elena S. Krupovich*, Yurii P. Kolmogorov**,

Elena G. Trofimova***, Ivan S. Gusev****, Boris G. Goldenberg*****

*Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

**V.S. Sobolev Institute of Geology and Mineralogy SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

***Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

****Budker Institute of Nuclear Physics SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

*****Synchrotron Radiation Facility – Siberian Circular Photon Source “SKIF”,

Boreskov Institute of Catalysis SB RAS, Koltsovo, Russian Federation

Abstract. Due to the protective role played by silicon in plants against unfavorable environmental conditions, silicon-containing preparations are of considerable interest as biostimulants. In this work, a mechanical composite of rice husk and green tea containing soluble silica chelate complexes was used as the source of silicon. The study aims to examine the effect of silicon chelates on the growth and physiological parameters and the chemical composition of *Fragaria* × *ananassa* plants (Solnechnaya Polyanka variety) under greenhouse conditions. The plants were watered using water without a mechanical composite (control) or an aqueous solution containing 0.3 g/L of mechanical composite twice per period. Sampling was carried out one week after the last treatment. In order to determine the concentration of chemical elements (Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Sr, and Mo) in the roots and shoots of garden strawberry, it was proposed to use synchrotron X-ray fluorescence analysis. The use of the mechanical composite was shown to increase the amount of chlorophyll a, chlorophylls a and b, and carotenoids; decrease the amount of hydrogen peroxide; and increase the activity of the main antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, and peroxidase). It was determined that under the effect of the preparation, silicon accumulates primarily in shoots, affecting the accumulation of micro- and macroelements in the shoots and roots of plants. The obtained results substantiate the use of silicon-containing “green chemistry” as a means of controlling the growth and development of garden strawberry plants under *in vivo* conditions.

Keywords: *Fragaria* × *ananassa*, silicon chelates, growth, physiological data, X-ray fluorescence analysis, synchrotron radiation

Acknowledgements. *In vitro* material from the collection of CSBG, SB RAS was used: unique scientific unit (USU) 440534: “Collection of living plants indoors and outdoors”. The detection of the elemental composition by the SR-XRF method was carried out on the equipment of the shared research center SSTRC on the basis of the VEPP-4 – VEPP-2000 complex at BINP SB RAS.

Funding. The Russian Science Foundation and the Government of the Novosibirsk Region funded this research, grant no. 22-26-20061 (<https://rscf.ru/project/22-26-20061/>).

For citation: Ambros E.V., Krupovich E.S., Kolmogorov Y.P., Trofimova E.G., Gusev I.S., Goldenberg B.G. Modulation of growth and chemical element accumulation in *Fragaria* × *ananassa* plants *in vivo* under the effect of silicon chelates. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):494-505. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-494-505. EDN: LJBWLS.

ВВЕДЕНИЕ

Земляника садовая (*Fragaria* × *ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier) является одной из самых культивируемых ягод в мире. Благодаря богатому содержанию биологически активных соединений земляника используется в рационе многих людей. При этом из-за поверхностной корневой системы, большой площади листьев и высокого содержания воды в плодах данная культура крайне чувствительна к условиям произрастания в процессе

культивирования. В связи с этим для улучшения роста и развития растений устойчивой альтернативой использования химических удобрений является применение биостимуляторов [1, 2].

Среди биостимуляторов большой интерес вызывают препараты на основе биогенного кремния (Si) [3, 4]. Считается, что такие соединения наиболее эффективно усваиваются растениями (в 2–10 раз лучше солей) [5]. Потенциально полезными для применения в качестве биостимуляторов являются

полученные из возобновляемого растительного сырья твердофазным механохимическим методом без использования органических растворителей препараты, содержащие биогенный Si в хелатной форме. В результате такой обработки растительное сырье и реагенты остаются в стабильной твердой форме, что полностью предотвращает их окисление и потерю биологической активности [6, 7]. Кроме того, наличие на территории Российской Федерации широкого спектра растительных отходов, содержащих Si, делает перспективным использование «зеленой химии» в органическом земледелии для выращивания растений.

Кремний не является эссенциальным элементом для растений, однако его присутствие в среде произрастания повышает устойчивость растений к негативным факторам различной природы [8–10]. Экзогенное применение Si улучшает рост растений и увеличивает урожайность, усиливая адаптивные реакции, связанные с активностью антиоксидантной системы растений, накоплением фенольных соединений, изменением фитогормонального статуса, скоростью фотосинтеза, поглощением минеральных элементов [11–19]. Эффекты Si связывают с модифицирующим действием на сорбционные свойства клеточных стенок, где он накапливается в форме аморфного диоксида Si, а также с образованием комплексов с различными органическими соединениями клетки и, как следствие, влиянием на метаболизм растений [20, 21]. Тем не менее, несмотря на достаточно большое количество работ по влиянию соединений Si на растения [22], необходимость Si для роста и метаболизма растений до сих пор остается предметом изучения.

Настоящее исследование сосредоточено на оценке влияния биогенного Si на рост, развитие и аккумуляцию химических элементов в растениях земляники садовой, поскольку знания о поглощении и усвоении элементов питания позволяют рационально построить систему удобрения культуры и в дальнейшем получить высокий урожай сельскохозяйственной продукции.

Для определения химического состава образцов в аналитической химии широко применяются фотометрические методы определения химических элементов [23], основанные на абсорбционной спектроскопии излучения видимого диапазона. В этих методах используют зависимость интенсивности окраски раствора от концентрации вещества в нем. В методах атомно-абсорбционной пламенной спектрометрии [24], атомно-абсорбционной электротермической спектрометрии [25], атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой [26], масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой [27] исследуемый образец переводится способами «жидкой химии» в специфический раствор для последующей атомизации в пламени, плазме и т.п. и регистрации поглощения видимого или инфракрасного излучения.

В нашей работе для определения концентраций химических элементов предложено применять энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный

анализ с использованием синхротронного излучения (РФА-СИ) [28–30]. Образцы облучаются рентгеновским излучением с энергией фотонов, достаточной для выбивания электронов с внутренних оболочек атомов и перевода атомов в возбужденное состояние. На образовавшиеся вакансии переходят электроны с внешних оболочек. Такие переходы сопровождаются высвечиванием квантов характеристического излучения с энергией, определяемой структурой атома и уникальной для каждого элемента. Исследуя энергетический спектр этого флуоресцентного излучения, можно делать выводы о качественном и количественном составе образца. Важными преимуществами метода РФА-СИ являются непрерывность полихроматического спектра синхротронного излучения и возможность выбирать из этого спектра энергию возбуждающих квантов, что дает возможность снизить пределы обнаружения для интересующих элементов. Метод является панорамным, то есть в результате одного измерения получается информация о содержании множества химических элементов. Также к преимуществам данного метода относится простота пробоподготовки: образцы необходимо высушить, измельчить и спрессовать в таблетки с одинаковой плотностью. Ко всему прочему, метод РФА-СИ относится к неразрушающим, т.е. в ходе измерения образцы не испытывают разрушающего воздействия, не изменяются, один и тот же образец может быть исследован многократно, в том числе с вариациями условий измерений (энергия возбуждения, размер и положение облучаемой области и т.п.).

Таким образом, настоящее исследование направлено на оценку содержания химических элементов в растениях земляники садовой в процессе роста, развития и адаптации к условиям *in vivo* под действием хелатов Si. В соответствии с заявленной целью поставлены следующие задачи: 1) проанализировать морфометрические параметры надземной части и корневой системы растений; 2) определить содержание основных фотосинтетических пигментов (хлорофиллов *a* и *b*, каротиноидов), пероксида водорода (H_2O_2), а также активность ферментов антиоксидантной системы (супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы) в листьях растений; 3) провести анализ содержания химических элементов в надземной части и корневой системе растений земляники садовой под действием хелатов Si в условиях *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Характеристика механокомпозита, приготовление рабочего раствора для обработки. В качестве источника хелатов Si использовали препарат, полученный в результате механохимической обработки растительного сырья (механокомпозит), характеризующийся повышенной концентрацией хелатированных растворимых форм Si [7]. Основной составляющей механокомпозита являлась шелуха риса *Oryza sativa* L. сорта Лиман (Краснодарский край, Россия) с высоким содержанием биогенного Si и листья зеленого чая *Camelia sinensis* L. (Краснодарский край, Россия), содержащие хелатирующие функциональные группы,

существенно повышающие растворимость Si с 6,5 до 34,1 мг/л. Химический состав механокомпозита был следующим: экстрактивные вещества – 16,3±1,1%; гемицеллюлоза – 22,3±0,8%; лигнин – 20,2±1,5%; целлюлоза – 38,9±2,0%; катехины – 1,4±0,2%; водорастворимый мономерный Si – 34,0±0,7 мг/л. Мас-совое соотношение рисовой шелухи и зеленого чая в механокомпозите – 10:1.

Для экспериментов использовали свежий водный раствор механокомпозита, приготовленный путем перемешивания дистиллированной воды комнатной температуры и механокомпозита в концентрации 0,3 г/л и последующего настаивания в течение 1 ч при комнатной температуре. Применение данной концентрации механокомпозита обусловлено ее успешным использованием в технологии клонального микроразмножения земляники садовой на этапе адаптации регенерантов к условиям *ex vitro* [31].

Растительный материал, условия выращивания, варианты обработки механокомпозита. В качестве объекта для исследований использована рассада земляники садовой сорта Солнечная полянка, полученная с помощью технологии клонального микроразмножения. Рассада соответствовала требованиям, предъявляемым к посадочному материалу земляники крупноплодной с закрытой корневой системой. Эксперименты по оценке влияния механокомпозита на рост и развитие растений земляники садовой проводили в условиях теплицы в течение 24 дней с 20 апреля по 15 мая 2022 года (54°49'11"N и 83°6'17"E). Растения в горшках с почвенным субстратом объемом 250 мл из смеси торфа с перлитом, перегноя, песка и кокосового субстрата (1:1:0,25:0,25) поливали водой без механокомпозита или раствором с механокомпозитом дважды за период через равные промежутки времени. Под корень каждого растения вносили 90 мл раствора при достижении полной влагоемкости субстрата 50%. В промежутках растения увлажняли водой. Выращивали растения при естественном освещении 20–25 тыс. люкс, температуре воздуха 30±2 °С днем и 23±2 °С ночью, а также относительной влажности воздуха 55–60%. Опыты проводили в двукратной повторности, в каждом варианте использовано 20 растений. Отбор образцов проводили через неделю после последней обработки.

Оценка показателей вегетативной продуктивности растений. Анализировали такие показатели, как длина розетки (см), количество листьев и корней на растение (шт.), сырая и сухая масса розеток и корней (г), площадь листовой пластинки (см²). Сухую массу растительного материала определяли трехкратным высушиванием до постоянного веса при температуре 75 °С в течение 2 ч. Площадь листовых пластинок у растений рассчитывали с помощью программы SIAMS Photolab с дополнительным модулем SIAMS MesoPlant (SIAMS, Россия).

Анализ физиологических показателей. Фотосинтетические пигменты (хлорофилл *a*, *b* и каротиноиды) экстрагировали 96%-м этиловым спиртом из листьев растений, для определения оптической плотности образцов использовали спектрофотометр UNICO 2100 UV (UNICO, США). Содержание пигментов рассчитывали по формулам Х.К. Лихтеналера и К. Бушманна [32] и выражали с последующим пересчетом содержания в миллиграммах на 1 г сырого веса.

Эндогенное содержание H₂O₂ в листьях определяли спектрофотометрическим методом, основанным на окислении ионов Fe²⁺ H₂O₂ до ионов Fe³⁺, которые образуют окрашенные соединения с ксиленоловым оранжевым [33]. Концентрацию H₂O₂ устанавливали по стандартной калибровочной кривой, используя растворы H₂O₂ различной концентрации от 273 до 1500 нг/мл. Содержание H₂O₂ выражали в микромолях на 1 г сырого веса.

Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) в листьях измеряли по скорости реакции разложения H₂O₂ в реакционной смеси согласно методике [34] и выражали в относительных единицах разложившейся H₂O₂ в минуту на 1 г сырого веса. Активность супероксидсмутазы (КФ 1.15.1.1) определяли по способности ферментного экстракта ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия до синего формазана [35] с небольшими модификациями [36] и выражали в относительных единицах на 1 г сырого веса. Активность пероксидазы (КФ 1.11.1.7) определяли по окислению кверцетина и выражали в относительных единицах на 1 г сырого веса в минуту [37]. Эксперименты по оценке физиологических показателей проводили в трех биологических и трех – пяти аналитических повторностях.

Исследования элементного состава. Исследования элементного состава методом РФА-СИ выполнялись в центре коллективного пользования «Сибирский центр синхротронного и терагерцового излучения» в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН. Метод РФА-СИ позволяет за одно измерение получать данные о содержании сразу многих элементов. Диапазон определяемых элементов определяется параметрами исследовательской установки, такими как энергия возбуждающего излучения и газовая среда. На экспериментальной станции РФА-СИ на синхротроне ВЭПП-3 измерения проводятся при нормальной атмосфере и энергии возбуждения 21 кэВ, размер пучка синхротронного излучения на образце – 2×5 мм. В этих условиях возможно достоверное определение элементов от К до Мо по ранее разработанным методикам [38]. Флуоресцентное излучение от элементов легче К (с энергией фотонов менее 4 кэВ) значительно поглощается атмосферным воздухом, и это не позволяет достоверно определить легкие элементы. Определение элементов с относительно малой атомной массой (Si, P, S, Cl) проводилось аналогичным способом на новой станции – «Технологической станции синхротронного излучения» – на синхротроне ВЭПП-4М [39, 40] в вакуумированной камере при давлении, пониженном до 10 Па, с энергией возбуждающих квантов 3,53 кэВ, размер пучка синхротронного излучения на образце – 1×4 мм. Для регистрации флуоресценции от более легких элементов, таких, как, например, С, N, O, F, требуется проводить измерения в высоком вакууме с энергией возбуждения менее 3 кэВ. Имеющиеся возможности экспериментальных станций РФА-СИ (ВЭПП-3) и «Технологической станции синхротронного излучения» (ВЭПП-4М) не позволяют получить такие условия. Для рентгено-флуоресцентного анализа образцы корней и побегов от 20 растений высушивали при температуре 50 °С до постоянной массы, затем перетирали и пресовали в таблетки массой 20 мг. Определение концентраций химических элементов проводили методом внешнего стандарта с использованием стандартного

образца травосмеси Тр-1 (ГСО 8922-2007; СО КООМЕТ 0066-2008-RU).

Статистический анализ. Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок ($M \pm m$). Для сравнения средних значений независимых выборок использовали многограновый тест Дункана (однофакторный дисперсионный анализ). Обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (Statsoft Inc., Талса, США). Двумерный кластерный анализ осуществляли с помощью программного обеспечения PAST 4.12 (Э. Хаммер, Д.А.Т. Харпер, П.Д. Райан) методом ближайшего соседа.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При тестировании новых биостимуляторов возникает необходимость не только в индикации ростовых параметров, но и в изучении особенностей физиологических процессов у растений при адаптации к факторам среды.

В нашем эксперименте обработка растений механокомпозитом существенно повлияла на развитие корневой системы растений земляники садовой (табл. 1), что согласуется с результатами других исследований, в которых показана стимуляция роста корней под действием Si у злаковых, цитрусовых, овощных культур [41]. Различия определены для длины корней и сухой массы корней. Длина корней у растений в вариантах с механокомпозитом увеличивалась относительно вариантов без механокомпозита на 30% ($P < 0,05$), сухая масса корней – на 34% ($P < 0,05$). Считается, что под действием Si изменяется архитектура клеточной стенки: она укрепляется, поскольку элемент накапливается в клетках корневого чехлика и экссудатов корневых волосков. Применение кремнийсодержащих препа-

ратов улучшает корневое питание растений, приводит к увеличению биомассы корней, их объема, общей и рабочей адсорбирующей поверхности [42].

Одним из основных показателей потенциальной продуктивности растений является содержание пигментов фотосинтеза в ассимилирующих органах. По содержанию хлорофилла можно оценить эффективность использования растениями фотосинтетически активной радиации, спрогнозировать продуктивность посадок, установить необходимость дополнительного применения удобрений и т.д. Применение механокомпозита способствовало накоплению фотосинтетических пигментов у растений закрытого грунта (см. табл. 1). Показано достоверно значимое увеличение содержания хлорофилла *a* (на 50%), суммы хлорофиллов *a* и *b* (на 40%) и изменение соотношения хлорофиллов *a/b* в сторону увеличения хлорофилла *a* в вариантах с механокомпозитом относительно контроля ($P < 0,05$). Соотношение хлорофиллов *a/b* является одной из важных характеристик для определения того, как происходит ассимиляция диоксида углерода в листьях. Увеличение этого показателя у растений свидетельствует о более эффективном использовании листьями света при обработке механокомпозитом. Формирование физиологических адаптаций под действием механокомпозита у растений в условиях теплицы подтверждается активацией антиоксидантной защитной системы. Под действием механокомпозита увеличивалось содержание каротиноидов (на 30%, $P < 0,05$). Каротиноиды предотвращают окисление хлорофилла молекулярным кислородом и регулируют степень адаптации растений к высокой интенсивности света. Содержание H_2O_2 в листьях растений под действием механокомпозита значимо уменьшалось на 24% относительно контроля ($P < 0,05$)

Таблица 1. Влияние механокомпозита на основе хелатов кремния на рост, развитие и физиологические показатели растений земляники садовой сорта Солнечная полянка

Table 1. Effect of silicon chelates based mechanocomposite on the growth, development and physiological characteristics of garden strawberry plants (cv. Solnechnaya polyanka)

Показатель	Тип обработки	
	МК-	МК+
Длина розетки, см	6,42±0,20ab	6,93±0,30a
Количество листьев, шт.	6,64±0,29a	6,80±0,20a
Площадь листовой пластинки, см ²	16,21±1,65a	17,80±1,04a
Сухая масса розетки, г	0,88±0,06a	1,00±0,05a
Длина корней, см	13,32±0,75b	17,37±0,88a
Количество корней, шт.	18,14±0,70a	17,80±0,60a
Сухая масса корней, г	0,38±0,02b	0,51±0,02a
Содержание хлорофилла <i>a</i> , мг/г сырого веса	0,68±0,08b	1,01±0,08a
Содержание хлорофилла <i>b</i> , мг/г сырого веса	0,40±0,05a	0,49±0,02a
Содержание хлорофиллов <i>a + b</i> , мг/г сырого веса	1,07±0,13b	1,50±0,10a
Соотношение хлорофиллов <i>a/b</i>	1,77±0,06b	2,08±0,11a
Содержание каротиноидов, мг/г сырого веса	0,23±0,03b	0,31±0,02a
Соотношение хлорофиллов <i>a + b</i> / каротиноидов	4,58±0,20a	5,01±0,35a
Содержание H_2O_2 , мкмоль/г сырого веса	3,08±0,28a	2,36±0,20b
Активность супероксидсмутазы, отн. ед/г сырого веса	38,92±4,77b	59,24±4,64a
Активность каталазы, отн. ед. H_2O_2 /мин. г сырого веса	8,59±2,11a	14,69±1,82a
Активность пероксидазы, отн. ед. кверцетина/мин. г сырого веса	0,44±0,11b	0,79±0,07a

Примечание. МК – механокомпозит на основе хелатов кремния: (МК-) – растения без обработки механокомпозитом, (МК+) – растения, которые поливались водным раствором с содержанием механокомпозита 0,3 г/л. Данные представлены в виде $M \pm m$. Средние значения в строках, за которыми следуют одинаковые буквы, не имеют значимого отличия друг от друга в соответствии с тестом Дункана. Значения достоверны при $P < 0,05$.

Таблица 2. Влияние механокомпозиата на основе хелатов кремния на содержание химических элементов в корнях и побегах растений земляники садовой сорта Солнечная полянка

Table 2. Effect of silicon chelates based mechanocomposite on the chemical elements content in the roots and shoots of garden strawberry plants (cv. Solnechnaya polyanka)

Элемент	Содержание, мкг/г			
	в корнях		в побегах	
	МК-	МК+	МК-	МК+
Si	3400,00±340,00	4800,00±480,00	3900,00±390,00	7400,00±740,00
P	2800,00±470,00	3200,00±550,00	4000,00±680,00	1600,00±270,00
S	1200,00±170,00	2000,00±300,00	850,00±120,00	900,00±120,00
Cl	7500,00±620,00	5900,00±500,00	6700,00±550,00	3300,00±270,00
K	17500,00±1200,00	18800,00±1300,00	20200,00±1400,00	21300,00±1500,00
Ca	6600,00±430,00	6000,00±400,00	13400,00±880,00	10900,00±700,00
Ti	60,00±6,70	57,00±6,40	29,00±3,20	52,00±5,80
Mn	60,00±4,00	69,00±4,50	30,00±2,00	48,00±3,00
Fe	565,00±46,00	856,00±70,00	93,00±7,60	57,00±4,70
Ni	1,50±0,20	1,60±0,20	0,30±0,04	0,20±0,02
Cu	3,60±0,30	4,50±0,40	1,90±0,17	2,30±0,20
Zn	13,70±1,10	18,20±1,50	13,50±1,10	14,60±1,20
Br	3,50±0,30	4,30±0,40	2,30±0,20	1,20±0,10
Rb	5,20±0,50	6,90±0,60	3,20±0,30	2,00±0,20
Sr	52,00±4,60	48,00±4,30	57,00±5,10	41,00±3,70
Mo	0,40±0,04	0,50±0,05	0,50±0,05	0,50±0,05

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm t$. В исследуемых образцах определены 12 химических элементов, кроме того присутствуют Co, As, Se в концентрации ниже пределов достоверного обнаружения (менее 1 ppm).

(см. табл. 1). Известно, что сверхпродукция H_2O_2 может вызвать окислительное повреждение макромолекул и клеточных структур, что приводит к ингибированию роста и развития растений. Изменения в содержании H_2O_2 коррелировали с увеличением активностей ключевых ферментов антиоксидантной системы, которые составляют первичное звено защиты от активных форм кислорода. Активность супероксиддисмутазы в вариантах с механокомпозиатом увеличивалась на 52%, каталазы – на 71%, пероксидазы – на 80% ($P < 0,05$) по сравнению с контролем.

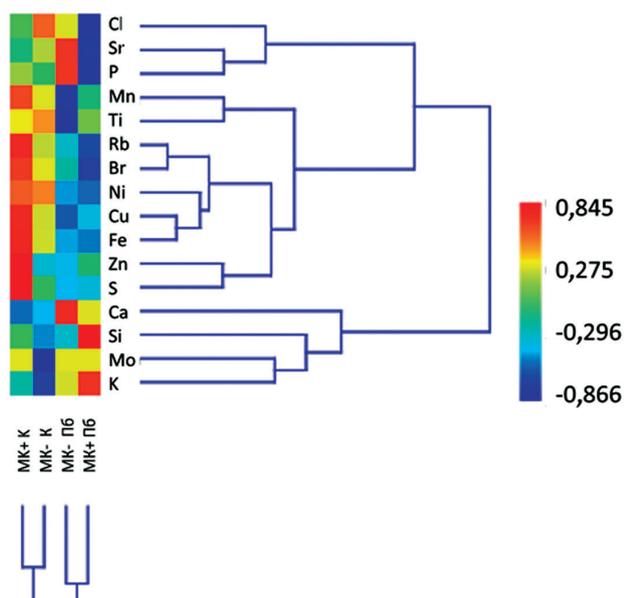
Сопоставление элементного состава растений в вариантах с обработкой механокомпозиатом и без одной выявило различия в аккумуляции Si в корнях и побегах растений земляники (табл. 2). Содержание Si в корнях образцов с обработкой механокомпозиатом увеличивалось на 41% в отличие от контрольных. Максимальное накопление Si наблюдали в побегах, его содержание было на 90% больше в вариантах с механокомпозиатом. Более того, обработка механокомпозиатом стимулировала растения к поглощению химических элементов. В большей степени механокомпозиат влиял на аккумуляцию микроэлементов. В вариантах с обработкой механокомпозиатом отмечено увеличение содержания таких микроэлементов, как: в корнях – Mn (на 15%), Fe (на 52%), Cu (на 25%), Zn (на 33%), Br (на 23%), Rb (на 33%), в побегах – Mn (на 60%), Cu (на 21%). Растения без обработки характеризовались низким содержанием микроэлементов, что, возможно, обусловлено повышенным содержанием Ca, который уменьшает подвижность и доступность микроэлементов [43].

В группе макроэлементов под действием механокомпозиата значительно увеличивались концентрации P,

S и K. В корнях растений, обработанных препаратом, по сравнению с контрольными образцами аккумуляровалось на 7% больше K, на 14% больше P и на 67% больше S. В побегах образцов с механокомпозиатом обнаружено увеличение содержания K на 5%, S на 6%. В образцах после обработки механокомпозиатом концентрации Ca уменьшались в корнях на 9%, в побегах на 19%. Уменьшение содержания Ca при применении Si объясняют снижением транспирации из-за отложения Si в клеточных стенках листьев [44], снижением поглощения Ca^{2+} из-за биоокремнения клеток корней [45] и Si-Ca взаимодействием в апопласте [46].

Для иллюстрации влияния обработки механокомпозиатом на содержание химических элементов в корнях и побегах растений земляники проведен двумерный кластерный анализ (рисунок). Данный анализ показал значительные различия элементного состава в корнях и побегах растений. В отдельные группы выделяются такие элементы, как Cl, Sr, P, большинство микроэлементов: Mn, Ti, Rb, Br, Ni, Cu, Fe, Zn и S, а также Ca, Si, Mo, K, причем Si и Ca можно выделить в отдельную группу.

Таким образом, результаты исследования показали, что земляника садовая активно поглощает Si из почвы в концентрациях, приносящих «пользу» растениям. В немногочисленных работах представлены противоречивые данные о поглощении Si растениями земляники. Известно несколько работ, в которых вид относят к растениям, аккумулирующим Si (до 3% Si на сухой вес) [47–49]. В свою очередь, М.Дж. Ходсон с соавторами [50] предположил, что земляника плохо поглощает Si. Элементный анализ показал, что под действием хелатов Si увеличивается содержание как Si, так и элементов, необходимых для фотосинтеза – P, K, S, Fe, Mn, Zn, что, возможно, опосредовано



Двумерный кластерный анализ химических элементов в корнях и побегах растений земляники садовой сорта Солнечная полянка. К – корни; Пб – побеги

Two-dimensional cluster analysis of chemical elements in the roots and shoots of strawberry plants (cv. Solnechnaya polyanka). K – roots; Пб – shoots

стимуляцией роста корней при обработке механокомпозитом и увеличением доступности этих элементов для растений. Известно, что Cu с Zn, Mn и Fe входят в состав изоформ фермента супероксидсмутазы,

который выполняет роль первичного «защитника» против активных форм кислорода, катализируя дисмутацию супероксидного анион-радикала до H_2O_2 . Аккумуляция Cu, Zn, Fe, Mn в образцах земляники под действием механокомпозита, предположительно, способствует активации процессов детоксикации с участием супероксидсмутазы и подтверждает влияние Si на работу антиоксидантной системы. Тем не менее для оценки вклада каждой изоформы в общую активность супероксидсмутазы под действием механокомпозита необходимы дальнейшие исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обработка растений земляники садовой механокомпозитом на основе хелатов Si в условиях закрытого грунта способствовала аккумуляции Si в побегах и корнях растений земляники садовой. Накопление Si под действием механокомпозита было сопряжено с увеличением биомассы корневой системы, изменением физиологических показателей и концентрации химических элементов у растений. Под действием хелатов Si увеличивалось содержание хлорофилла a, суммы хлорофиллов a и b, каротиноидов, уменьшалось содержание H_2O_2 , увеличивались активности основных антиоксидантных ферментов (супероксидсмутазы, каталазы, пероксидазы) и содержание макро- и микроэлементов, участвующих в окислительно-восстановительных процессах. Таким образом, полученные результаты дополняют знания о влиянии Si на растения, его аккумуляцию и обосновывают использование кремнийсодержащей «зеленой химии» в качестве средств управления ростом и развитием растений в сельском хозяйстве.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Durán-Lara E.F., Valderrama A., Marican A. Natural organic compounds for application in organic farming // Agriculture. 2020. Vol. 10, no. 2. P. 41. DOI: 10.3390/agriculture10020041.
2. Garza-Alonso C.A., Olivares-Sáenz E., González-Morales S., Cabrera-De la Fuente M., Juárez-Maldonado A., González-Fuentes J.A., et al. Strawberry biostimulation: from mechanisms of action to plant growth and fruit quality // Plants. 2022. Vol. 11, no. 24. P. 3463. DOI: 10.3390/plants11243463.
3. Savvas D., Ntatsi G. Biostimulant activity of silicon in horticulture // Scientia Horticulturae. 2015. Vol. 196. P. 66–81. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.09.010.
4. Schaller J., Cramer A., Carminati A., Mohsen Z. Biogenic amorphous silica as main driver for plant available water in soils // Scientific Reports. 2020. Vol. 10. P. 2424. DOI: 10.1038/s41598-020-59437-x.
5. Битюцкий Н.П. Микроэлементы высших растений. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2011. 367 с.
6. Lomovsky O.I., Lomovskiy I.O., Orlov D.V. Mechanochemical solid acid/base reactions for obtaining biologically active preparations and extracting plant materials // Green Chemistry Letters and Reviews. 2017. Vol. 10, no. 4. P. 171–185. DOI: 10.1080/17518253.2017.1339832.
7. Trofimova E.G., Podgorbunskikh E.M., Skripkina T.S., Bychkov A.L., Lomovsky O.I. Scaling of the mechano-chemical process of production of silicon chelates from plant raw materials // Bulgarian Chemical Communications. 2018. Vol. 50. P. 45–48. EDN: QWCBSX.
8. Ma J.F. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses // Soil Science and Plant Nutrition. 2004. Vol. 50, no. 1. P. 11–18. DOI: 10.1080/00380768.2004.10408447.
9. Zargar S.M., Mahajan R., Bhat J.A., Nazir M., Deshmukh R. Role of silicon in plant stress tolerance: opportunities to achieve a sustainable cropping system // 3 Biotech. 2019. Vol. 9. P. 73. DOI: 10.1007/s13205-019-1613-z.
10. Verma K.K., Song X.-P., Tian D.-D., Guo D.-J., Chen Z.-L., Zhong C.-Z., et al. Influence of silicon on biocontrol strategies to manage biotic stress for crop protection, performance, and improvement // Plants. 2021. Vol. 10, no. 10. P. 2163. DOI: 10.3390/plants10102163.
11. Nusrat A., Réthoré E., Yvin J.-C., Hosseini S.A. The regulatory role of silicon in mitigating plant nutritional stresses // Plants. 2020. Vol. 9, no. 12. P. 1779. DOI: 10.3390/plants9121779.
12. Matichenkov V.V., Bocharnikova E.A. The relationship between silicon and soil physical and chemical properties // Silicon in agriculture / eds L.E. Datnoff, G.H. Snyder, G.H. Korndörfer. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2001. P. 209–219.
13. Savvas D., Ntatsi G. Biostimulant activity of silicon in horticulture // Scientia Horticulturae. 2015. Vol. 196. P. 66–81. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.09.010.
14. Vatansever R., Ozyigit I.I., Filiz E. Essential and beneficial trace elements in plants, and their transport in roots: a review // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2017. Vol. 181. P. 464–482. DOI: 10.1007/s12010-016-2224-3.

15. Artyszak A. Effect of silicon fertilization on crop yield quantity and quality – a literature review in Europe // *Plants*. 2018. Vol. 7, no. 3. P. 54. DOI: 10.3390/plants7030054.
16. Joudmand A., Hajiboland R. Silicon mitigates cold stress in barley plants via modifying the activity of apoplasmic enzymes and concentration of metabolites // *Acta Physiologicae Plantarum*. 2019. Vol. 41. P. 29. DOI: 10.1007/s11738-019-2817-x.
17. Coskun D., Deshmukh R., Sonah H., Menzies J.G., Reynolds O, Ma J.F., et al. The controversies of silicon's role in plant biology // *New Phytologist*. 2019. Vol. 221, no. 1. P. 67–85. DOI: 10.1111/nph.15343.
18. Wang L., Dong M., Zhang Q., Wu Y., Hu L., Parson J.F., et al. Silicon modulates multi-layered defense against powdery mildew in *Arabidopsis* // *Phytopathology Research*. 2020. Vol. 2. P. 7. DOI: 10.1186/s42483-020-00048-9.
19. Artyszak A., Kondracka M., Gozdowski D., Siuda A., Litwińczuk-Bis M. Impact of foliar application of various forms of silicon on the chemical composition of sugar beet plants // *Sugar Tech*. 2021. Vol. 23. P. 546–559. DOI: 10.1007/s12355-020-00918-8.
20. Колесников М.П. Формы кремния в растениях // *Успехи биологической химии*. 2001. Т. 41. С. 301–332.
21. Luycx M., Hausman J.-F., Lutts S., Guerriero G. Silicon and plants: current knowledge and technological perspectives // *Frontiers in Plant Science*. 2017. Vol. 8. P. 411. DOI: 10.3389/fpls.2017.00411.
22. Liang Y., Nikolic M., Bélanger R., Gong H., Song A. Silicon in agriculture. From theory to practice. Dordrecht: Springer, 2015. 235 p.
23. Марченко З. Фотометрическое определение элементов / пер. с польского. М.: Мир, 1971. 502 с.
24. Levent A., Alp S., Ekin S., Karagoz S. Trace heavy metal contents and mineral of *Rosa canina* L. Fruits from Van region of Eastern Anatolia, Turkey // *Reviews in Analytical Chemistry*. 2010. Vol. 29, no. 1. P. 13–24. DOI: 10.1515/REVAC.2010.29.1.13.
25. Филатова Д.Г., Еськина В.В., Барановская В.Б., Карпов Ю.А. Современные возможности электротермической атомно-абсорбционной спектрометрии высокого разрешения с непрерывным источником спектра // *Журнал аналитической химии*. 2020. Т. 75. N 5. С. 387–393. DOI: 10.31857/S0044450220050047. EDN: ZRVTRX.
26. Kazaz S., Baydar H., Erbas S. Variations in chemical compositions of *Rosa damascena* Mill. and *Rosa canina* L. fruits // *Czech Journal of Food Sciences*. 2009. Vol. 27, no. 3. P. 178–184. DOI: 10.17221/5/2009-CJFS.
27. Серегина И.Ф., Осипов К., Большов М.А., Филатова Д.Г., Ланская С.Ю. Матричные помехи при определении элементов в биологических образцах методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой и пути их устранения // *Журнал аналитической химии*. 2019. Т. 74. N 2. С. 136–146. DOI: 10.1134/S0044450219020117. EDN: YVTUVF.
28. Трунова В.А., Зверева В.В. Метод рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения: объекты исследования // *Журнал структурной химии*. 2016. Т. 57. N 7. С. 1401–1407. DOI: 10.15372/JSC20160705. EDN: WZVIML.
29. Храмова Е.П., Сыева С.Я., Ракшун Я.В., Сороколетов Д.С. Рентгенофлуоресцентный анализ с использованием синхротронного излучения в ботанических исследованиях: элементный состав растений из Горного Алтая (сем. Fabaceae) // *Известия Российской академии наук. Серия физическая*. 2023. Т. 87. N 5. С. 733–737. DOI: 10.31857/S0367676522701265. EDN: ABLTMT.
30. Legkodymov A.A., Kuper K.E., Kolmogorov Y.P., Baranov G.N. The SRXFA station on the VEPP-4M storage ring // *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. 2019. Vol. 83, no. 2. P. 112–115. DOI: 10.3103/S1062873819020199.
31. Ambros E.V., Toluzakova S.Y., Shrainer L.S., Trofimova E.G., Novikova T.I. An innovative approach to *ex vitro* rooting and acclimatization of *Fragaria × ananassa* Duch. microshoots using a biogenic silica and green-tea-catechin-based mechanocomposite // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2018. Vol. 54, no. 4. P. 436–443. DOI: 10.1007/s11627-018-9894-1.
32. Lichtenthaler H.K., Buschmann C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-Vis spectroscopy // *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001. P. F4.3.1–F4.3.8. DOI: 10.1002/0471142913.faf0403s01.
33. Bellincampi D., Dipperro N., Salvi G., Cervone F., De Lorenzo G. Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated *rolB* gene expression in tobacco leaf explants // *Plant Physiology*. 2000. Vol. 122, no. 4. P. 1379–1385. DOI: 10.1104/pp.122.4.1379.
34. Aeby H. Catalase *in vitro* // *Methods in Enzymology*. 1984. Vol. 105. P. 121–126. DOI: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
35. Giannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants // *Plant Physiology*. 1977. Vol. 59, no. 2. P. 309–314. DOI: 10.1104/pp.59.2.309.
36. Полесская О.Г., Каширина Е.И., Алехина Н.Д. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде // *Физиология растений*. 2004. Т. 51. N 5. С. 686–691. EDN: OXNXLZ.
37. Жанаева Т.А., Лобанова И.Е., Кукушкина Т.А. Флавонолы и окисляющие их ферменты в онтогенезе гречихи посевной // *Известия Российской академии наук. Серия биологическая*. 1999. N 1. С. 105–108.
38. Сидорина А.В., Трунова В.А., Алексеева А.Н. Определение микроэлементного состава шиповника собачьего (*Rosa canina*) из разных мест произрастания методом РФА-СИ // *Химия в интересах устойчивого развития*. 2014. Т. 22. N 2. С. 181–186. EDN: SMJYYR.
39. Гольденберг Б.Г., Ракшун Я.В., Бугаев С.В., Мешков О.И., Цыбуля С.В. Проект технологической станции синхротронного излучения на ВЭПП-4М // *Известия Российской академии наук. Серия физическая*. 2019. Т. 83. N 2. С. 176–180. DOI: 10.1134/S0367676519020157. EDN: YVTWTR.
40. Goldenberg B.G., Gusev I.S., Zubavichus Y.V. Synchrotron radiation station on the VEPP-4M for practical training // *Synchrotron and free electron laser radiation: generation and application (SFR-2022): book of abstracts*. Novosibirsk: Institute of Nuclear Physics G.I Budker SB RAS, 2022. P. 123–124. EDN: JNUCCT.
41. Самсонова Н.Е. Кремний в растительных и животных организмах // *Агрохимия*. 2019. N 1. С. 86–96. DOI: 10.1134/S0002188119010071. EDN: YVTRSP.
42. Hossain M.T., Soga K., Wakabayashi K., Kamisaka S., Fujii S., Yamamoto R., et al. Modification of chemical properties of cell walls by silicon and its role in regulation of the cell wall extensibility in oat leaves // *Journal*

of Plant Physiology. 2007. Vol. 164, no. 4. P. 385–393. DOI: 10.1016/j.jplph.2006.02.003.

43. Алексеева-Попова Н.В., Дроздова И.В. Микроэлементный состав растений полярного Урала в контрастных геохимических условиях // Экология. 2013. N 2. С. 90–98. DOI: 10.7868/S0367059713020030. EDN: PVXCMB.

44. Ma J.F., Takahashi E. Interaction between calcium and silicon in water-cultured rice plants // Plant and Soil. 1993. Vol. 148. P. 107–113. DOI: 10.1007/bf02185390.

45. Fleck A.T., Schulze S., Hinrichs M., Specht A., Waßmann F., Schreiber L., et al. Silicon promotes exodermal Casparian band formation in Si-accumulating and Si-excluding species by forming phenol complexes // PLOS One. 2015. Vol. 10, no. 9. P. e0138555. DOI: 10.1371/journal.pone.0138555.

46. Dishon M., Zohar O., Sivan U. Effect of cation size and charge on the interaction between silica surfaces in 1:1, 2:1, and 3:1 aqueous electrolytes // Langmuir. 2011. Vol. 27, no. 21. P. 12977–12984. DOI: 10.1021/la202533s.

REFERENCES

1. Durán-Lara E.F., Valderrama A., Marican A. Natural organic compounds for application in organic farming. *Agriculture*. 2020;10(2):41. DOI: 10.3390/agriculture10020041.

2. Garza-Alonso C.A., Olivares-Sáenz E., González-Morales S., Cabrera-De la Fuente M., Juárez-Maldonado A., González-Fuentes J.A., et al. Strawberry biostimulation: from mechanisms of action to plant growth and fruit quality. *Plants*. 2022;11(24):3463. DOI: 10.3390/plants11243463.

3. Savvas D., Ntatsi G. Biostimulant activity of silicon in horticulture. *Scientia Horticulturae*. 2015;196:66–81. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.09.010.

4. Schaller J., Cramer A., Carminati A., Mohsen Z. Biogenic amorphous silica as main driver for plant available water in soils. *Scientific Reports*. 2020;10:2424. DOI: 10.1038/s41598-020-59437-x.

5. Bityutskii N.P. *Microelements of higher plants*. St. Petersburg: Saint Petersburg State University; 2011, 367 p. (In Russian).

6. Lomovsky O.I., Lomovskiy I.O., Orlov D.V. Mechanochemical solid acid/base reactions for obtaining biologically active preparations and extracting plant materials. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2017;10(4):171–185. DOI: 10.1080/17518253.2017.1339832.

7. Trofimova E.G., Podgorbunskikh E.M., Skripkina T.S., Bychkov A.L., Lomovsky O.I. Scaling of the mechanochemical process of production of silicon chelates from plant raw materials. *Bulgarian Chemical Communications*. 2018;50:45–48. EDN: QWCBXS.

8. Ma J.F. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Science and Plant Nutrition*. 2004;50(1):11–18. DOI: 10.1080/00380768.2004.10408447.

9. Zargar S.M., Mahajan R., Bhat J.A., Nazir M., Deshmukh R. Role of silicon in plant stress tolerance: opportunities to achieve a sustainable cropping system. *3 Biotech*. 2019;9:73. DOI: 10.1007/s13205-019-1613-z.

10. Verma K.K., Song X.-P., Tian D.-D., Guo D.-J., Chen Z.-L., Zhong C.-Z., et al. Influence of silicon on biocontrol strategies to manage biotic stress for crop protection, performance, and improvement. *Plants*. 2021;10(10):2163. DOI: 10.3390/plants10102163.

11. Nusrat A., Réthoré E., Yvin J.-C., Hosseini S.A. The regulatory role of silicon in mitigating plant nutritional stresses.

47. Miyake Y., Takahashi E. Effect of silicon on the growth and fruit production of strawberry plants in a solution culture // *Soil Science and Plant Nutrition*. 1986. Vol. 32, no. 2. P. 321–326. DOI: 10.1080/00380768.1986.10557510.

48. Ouellette S., Goyette M.-H., Labbé C., Laur J., Gaudreau L., Gosselin A., et al. Silicon transporters and effects of silicon amendments in strawberry under high tunnel and field conditions // *Frontiers in Plant Science*. 2017. Vol. 8. P. 949. DOI: 10.3389/fpls.2017.00949.

49. Kanto T., Miyoshi A., Ogawa T., Maekawa K., Aino M. Suppressing effect of liquid potassium silicate on powdery mildew of strawberry in soil // *Journal of General Plant Pathology*. 2006. Vol. 72. P. 137–142. DOI: 10.1007/s10327-005-0270-8.

50. Hodson M.J., White P.J., Mead A., Broadley M.R. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants // *Annals of Botany*. 2005. Vol. 96, no. 6. P. 1027–1046. DOI: 10.1093/aob/mci255.

Plants. 2020;9(12):1779. DOI: 10.3390/plants9121779.

12. Matichenkov V.V., Bocharnikova E.A. The relationship between silicon and soil physical and chemical properties. In: Datnoff L.E., Snyder G.H., Korndörfer G.H. (eds). *Silicon in agriculture*. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 2001, p. 209–219.

13. Savvas D., Ntatsi G. Biostimulant activity of silicon in horticulture. *Scientia Horticulturae*. 2015;196:66–81. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.09.010.

14. Vatansever R., Ozyigit I.I., Filiz E. Essential and beneficial trace elements in plants, and their transport in roots: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2017;181:464–482. DOI: 10.1007/s12010-016-2224-3.

15. Artyszak A. Effect of silicon fertilization on crop yield quantity and quality – a literature review in Europe. *Plants*. 2018;7(3):54. DOI: 10.3390/plants7030054.

16. Joudmand A., Hajiboland R. Silicon mitigates cold stress in barley plants via modifying the activity of apoplasmic enzymes and concentration of metabolites. *Acta Physiologica Plantarum*. 2019;41:29. DOI: 10.1007/s11738-019-2817-x.

17. Coskun D., Deshmukh R., Sonah H., Menzies J.G., Reynolds O, Ma J.F., et al. The controversies of silicon's role in plant biology. *New Phytologist*. 2019;221(1):67–85. DOI: 10.1111/nph.15343.

18. Wang L., Dong M., Zhang Q., Wu Y., Hu L., Parson J.F., et al. Silicon modulates multi-layered defense against powdery mildew in Arabidopsis. *Phytopathology Research*. 2020;2:7. DOI: 10.1186/s42483-020-00048-9.

19. Artyszak A., Kondracka M., Gozdowski D., Siuda A., Litwińczuk-Bis M. Impact of foliar application of various forms of silicon on the chemical composition of sugar beet plants. *Sugar Tech*. 2021;23:546–559. DOI: 10.1007/s12355-020-00918-8.

20. Kolesnikov M.P. Forms of silicon in plants. *Uspekhi biologicheskoi khimii*. 2001;41:301–332. (In Russian).

21. Luyckx M., Hausman J.-F., Lutts S., Guerriero G. Silicon and plants: current knowledge and technological perspectives. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:411. DOI: 10.3389/fpls.2017.00411.

22. Liang Y., Nikolic M., Bélanger R., Gong H., Song A. *Silicon in agriculture. From theory to practice*. Dordrecht: Springer; 2015, 235 p.

23. Marchenko Z. Photometric determination of

elements; 1971, 502 p. (Russ. ed.: *Fotometricheskoe opredelenie elementov*. Moscow: Mir; 1971, 502 p.).

24. Levent A., Alp S., Ekin S., Karagoz S. Trace heavy metal contents and mineral of *Rosa canina* L. Fruits from Van region of Eastern Anatolia, Turkey. *Reviews in Analytical Chemistry*. 2010;29(1):13-24. DOI: 10.1515/REVAC.2010.29.1.13.

25. Filatova D.G., Es'kina V.V., Baranovskaya V.B., Karpov Y.A. Present-day possibilities of high-resolution continuous-source electrothermal atomic absorption spectrometry. *Zhurnal analiticheskoi khimii*. 2020;75(5):387-393. (In Russian). DOI: 10.31857/S0044450220050047. EDN: ZRVTRX.

26. Kazaz S., Baydar H., Erbas S. Variations in chemical compositions of *Rosa damascena* Mill. and *Rosa canina* L. fruits. *Czech Journal of Food Sciences*. 2009;27(3):178-184. DOI: 10.17221/5/2009-CJFS.

27. Seregina I.F., Bol'shov M.A., Filatova D.G., Lanskaya S.Y., Osipov K. Matrix interference in the determination of elements in biological samples by inductively coupled plasma – mass spectrometry and methods for its elimination. *Zhurnal analiticheskoi khimii*. 2019;74(2):136-146. (In Russian). DOI: 10.1134/S0044450219020117. EDN: YVTUVF.

28. Trunova V.A., Zvereva V.V. X-ray fluorescent analysis using synchrotron radiation: subjects of research. *Zhurnal strukturnoi khimii*. 2016;57(7):1401-1407. (In Russian). DOI: 10.15372/JSC20160705. EDN: WZVIML.

29. Khramova E.P., Syeva S.Ya., Rakshun Ya.V., Sorokoletov D.S. Using synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis in botanical research to study the elemental composition of Altai Mountain plants of the family Fabaceae. *Izvestiya Rossiiskoi akademii nauk. Seriya fizicheskaya*. 2023;87(5):733-737. (In Russian). DOI: 10.31857/S0367676522701265. EDN: ABLTMT.

30. Legkodymov A.A., Kuper K.E., Kolmogorov Y.P., Baranov G.N. The SRXFA station on the VEPP-4M storage ring. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. 2019;83(2):112-115. DOI: 10.3103/S1062873819020199.

31. Ambros E.V., Toluzakova S.Y., Shraimer L.S., Trofimova E.G., Novikova T.I. An innovative approach to *ex vitro* rooting and acclimatization of *Fragaria* × *ananassa* Duch. microshoots using a biogenic silica and green-tea-catechin-based mechanocomposite. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2018;54(4):436-443. DOI: 10.1007/s11627-018-9894-1.

32. Lichtenthaler H.K., Buschmann C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-Vis spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001:F4.3.1-F4.3.8. DOI: 10.1002/0471142913.faf0403s01.

33. Bellincampi D., Dipperro N., Salvi G., Cervone F., De Lorenzo G. Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated *rolB* gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiology*. 2000;122(4):1379-1385. DOI: 10.1104/pp.122.4.1379.

34. Aeby H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. 1984;105:121-126. DOI: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.

35. Giannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*. 1977;59(2):309-314. DOI: 10.1104/pp.59.2.309.

36. Poleskaya O.G., Kashirina E.I., Alekhina N.D. Changes in the activity of antioxidant enzymes in wheat leaves and roots as a function of nitrogen source and supply. *Fiziologiya rastenii*. 2004;51(5):686-691. (In Russian). EDN: OXNXLZ.

37. Zhanaeva T.A., Lobanova I.E., Kukushkina T.A. Flavonols and their oxidizing enzymes in the ontogenesis of buckwheat. *Izvestiya Rossiiskoi akademii nauk. Seriya biologicheskaya*. 1999(1):105-108. (In Russian).

38. Sidorina A.V., Trunova V.A., Alekseeva A.N. Determination of the microelement composition of *Rosa canina* from different growing sites by means of XPA-SR. *Khimiya v interesakh ustoichivogo razvitiya = Chemistry for Sustainable Development*. 2014;22(2):181-186. (In Russian). EDN: SMJYYR.

39. Goldenberg B.G., Rakshun Y.V., Bugaev S.V., Meshkov O.I., Tsybulya S.V. Designing a technological station for synchrotron radiation on the VEPP-4M. *Izvestiya Rossiiskoi akademii nauk. Seriya fizicheskaya*. 2019;83(2):176-180. (In Russian). DOI: 10.1134/S0367676519020157. EDN: YVTWTR.

40. Goldenberg B.G., Gusev I.S., Zubavichus Y.V. Synchrotron radiation station on the VEPP-4M for practical training. In: *Synchrotron and free electron laser radiation: generation and application (SFR-2022): book of abstracts*. Novosibirsk: Institute of Nuclear Physics G.I. Budker SB RAS; 2022, p. 123-124. EDN: JNUUCT.

41. Samsonova N.E. Silicon in soils, plant and animal organisms. *Agrokhimiya*. 2019;1:86-96. (In Russian). DOI: 10.1134/S0002188119010071. EDN: YVTRSP.

42. Hossain M.T., Soga K., Wakabayashi K., Kamisaka S., Fujii S., Yamamoto R., et al. Modification of chemical properties of cell walls by silicon and its role in regulation of the cell wall extensibility in oat leaves. *Journal of Plant Physiology*. 2007;164(4):385-393. DOI: 10.1016/j.jplph.2006.02.003.

43. Alexeeva-Popova N.V., Drozdova I.V. Micronutrient composition of plants in the polar Urals under contrasting geochemical conditions. *Ekologiya*. 2013;2:90-98. (In Russian). DOI: 10.7868/S0367059713020030. EDN: PVXCMB.

44. Ma J.F., Takahashi E. Interaction between calcium and silicon in water-cultured rice plants. *Plant and Soil*. 1993;148:107-113. DOI: 10.1007/bf02185390.

45. Fleck A.T., Schulze S., Hinrichs M., Specht A., Waßmann F., Schreiber L., et al. Silicon promotes exodermal Casparian band formation in Si-accumulating and Si-excluding species by forming phenol complexes. *PLOS One*. 2015;10(9):e0138555. DOI: 10.1371/journal.pone.0138555.

46. Dishon M., Zohar O., Sivan U. Effect of cation size and charge on the interaction between silica surfaces in 1:1, 2:1, and 3:1 aqueous electrolytes. *Langmuir*. 2011;27(21):12977-12984. DOI: 10.1021/la202533s.

47. Miyake Y., Takahashi E. Effect of silicon on the growth and fruit production of strawberry plants in a solution culture. *Soil Science and Plant Nutrition*. 1986;32(2):321-326. DOI: 10.1080/00380768.1986.10557510.

48. Ouellette S., Goyette M.-H., Labbé C., Laur J., Gaudreau L., Gosselin A., et al. Silicon transporters and effects of silicon amendments in strawberry under high tunnel and field conditions. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:949. DOI: 10.3389/fpls.2017.00949.

49. Kanto T., Miyoshi A., Ogawa T., Maekawa K., Aino M. Suppressing effect of liquid potassium silicate on powdery mildew of strawberry in soil. *Journal of General Plant Pathology*. 2006;72:137-142. DOI: 10.1007/s10327-005-0270-8.

50. Hodson M.J., White P.J., Mead A., Broadley M.R. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. *Annals of Botany*. 2005;96(6):1027-1046. DOI: 10.1093/aob/mci255.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Амброс Елена Валерьевна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Центральный сибирский
ботанический сад СО РАН,
630090, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская,
101, Российская Федерация,
✉ ambros_ev@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2119-6503>

Крупович Елена Сергеевна,
инженер-исследователь,
Центральный сибирский
ботанический сад СО РАН,
630090, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская,
101, Российская Федерация,
e.krupovich@g.nsu.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4064-9106>

Колмогоров Юрий Петрович,
ведущий электроник,
Институт геологии и минералогии
им. В.С. Соболева СО РАН,
630090, г. Новосибирск, пр. Академика
Коптюга, 3, Российская Федерация,
kolmogorov@igm.nsc.ru
<https://orcid.org/0009-0004-1763-5456>

Трофимова Елена Геннадиевна,
научный сотрудник,
Институт химии твердого тела
и механохимии СО РАН,
630128, г. Новосибирск, ул. Кутателадзе, 18,
Российская Федерация,
shapolovaelena@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6769-3724>

Гусев Иван Сергеевич,
инженер-исследователь,
Институт ядерной физики
им. Г.И. Будкера СО РАН,
630090, г. Новосибирск, пр. Академика
Лаврентьева, 11, Российская Федерация,
gusev.ivan-gusev@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1088-2700>

Гольденберг Борис Григорьевич,
к.т.н., старший научный сотрудник,
Институт ядерной физики
им. Г.И. Будкера СО РАН,
630090, г. Новосибирск, пр. Академика
Лаврентьева, 11, Российская Федерация,
Центр коллективного пользования
«Сибирский кольцевой источник фотонов»
Института катализа им. Г.К. Борескова СО РАН,
630559, Новосибирская область, пгт Кольцово,
пр. Никольский, 1, Российская Федерация,
b.g.goldenberg@srf-skif.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9605-784X>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Elena V. Ambros,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Central Siberian Botanical Garden SB RAS,
101, Zolotodolinskaya St., Novosibirsk, 630090,
Russian Federation,
✉ ambros_ev@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2119-6503>

Elena S. Krupovich,
Engineer-Researcher,
Central Siberian Botanical Garden SB RAS,
101, Zolotodolinskaya St., Novosibirsk, 630090,
Russian Federation,
e.krupovich@g.nsu.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4064-9106>

Yurii P. Kolmogorov,
Leading Electronics Engineer,
V.S. Sobolev Institute of Geology
and Mineralogy SB RAS,
3, Akademik Koptuyug Ave., Novosibirsk, 630090,
Russian Federation,
kolmogorov@igm.nsc.ru
<https://orcid.org/0009-0004-1763-5456>

Elena G. Trofimova,
Researcher,
Institute of Solid State Chemistry
and Mechanochemistry SB RAS,
18, Kutateladze St., Novosibirsk, 630128,
Russian Federation,
shapolovaelena@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6769-3724>

Ivan S. Gusev,
Engineer-Researcher,
Budker Institute of Nuclear Physics SB RAS,
11, Akademik Lavrentiev Ave., Novosibirsk, 30090,
Russian Federation,
gusev.ivan-gusev@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1088-2700>

Boris G. Goldenberg,
Cand. Sci. (Engineering), Senior Researcher,
Budker Institute of Nuclear Physics SB RAS,
11, Akademik Lavrentiev Ave., Novosibirsk,
30090, Russian Federation,
Synchrotron Radiation Facility – Siberian Circular
Photon Source “SKIF”, Boreskov Institute
of Catalysis SB RAS,
1, Nikolsky Ave., Koltsovo, 630559,
Novosibirsk region, Russian Federation,
b.g.goldenberg@srf-skif.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9605-784X>

Вклад авторов

Е.В. Амброс – концептуализация, разработка методологии, дизайна исследования, планирование и проведение эксперимента в условиях *in vivo*, подготовка образцов, анализ результатов; написание, критический пересмотр, редактирование текста рукописи, оформление рукописи.

Е.С. Крупович – проведение измерений элементного состава образцов методом РФА-СИ на синхротроне ВЭПП-3, обработка результатов измерений.

Ю.П. Колмогоров – проподготовка для измерений элементного состава образцов, разработка методики измерения методом РФА-СИ.

Е.Г. Трофимова – разработка методики получения механокомпозиата на основе хелатов кремния и подготовка механокомопозита для эксперимента.

И.С. Гусев – разработка программного обеспечения для проведения измерений элементного состава методом РФА-СИ.

Б.Г. Гольденберг – подготовка экспериментальной аппаратуры и проведение измерений элементного состава образцов методом РФА-СИ на синхротроне ВЭПП-4М, обработка результатов измерений; редактирование текста рукописи, оформление рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 31.07.2023.
Одобрена после рецензирования 10.10.2023.
Принята к публикации 31.10.2023.

Contribution of the authors

E.V. Ambros – conceptualization, methodology, research design, planning and carrying out the *in vivo* experiment, preparation of samples, analysis of results; writing the text of the manuscript, editing the text of the manuscript, design of the manuscript.

E.S. Krupovich – measurement of the elemental composition of samples by the SR-XRF method on VEPP-3, processing of measurement results.

Yu.P. Kolmogorov – sample preparation for the measurement of the elemental composition, development of SR-XRF measurement methods.

E.G. Trofimova – obtaining a mechanocomposite based silicon chelates and preparation of mechanocomposite for experiment.

I.S. Gusev – development of software for the measurement of elemental composition by the SR-XRF method.

B.G. Goldenberg – preparation of experimental equipment and measurement of the elemental composition of samples by the SR-XRF method on VEPP-4M, processing of measurement results; editing the text of the manuscript, the design of the manuscript.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 31.07.2023.
Approved after reviewing 10.10.2023.
Accepted for publication 31.10.2023.

Научная статья

УДК 579.66

EDN: IVPAEU

DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-506-515



Влияние протатранов на биосинтез внеклеточных ферментов *Candida ethanolica* ВКМ Y-2300 T

А.С. Кирюхина*✉, Т.С. Лозовая*, С.Н. Адамович**

*Иркутский национальный исследовательский технический университет,
г. Иркутск, Российская Федерация

**Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, г. Иркутск, Российская Федерация

Аннотация. Целью представленного исследования являлось изучение возможности применения синтетических биологически активных соединений – протатранов – для увеличения липолитической и протеолитической активности дрожжей *Candida ethanolica*. Протатран 1 (трис(2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенил-сульфанилацетат) и протатран 2 (трис(2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенил-сульфонилацетат) вносили в состав питательной среды в микроконцентрациях от 1×10^{-6} до 1×10^{-8} % масс. по отдельности и совместно. Установлено, что при внесении в питательную среду протатраны разнонаправленно влияли на биосинтез ферментов дрожжами *Candida ethanolica*. Это зависело от концентраций данных соединений, а также от их отдельного либо совместного внесения. Для синтеза липаз все изученные концентрации были эффективными, так как увеличивали синтез ферментов в 1,7–8,6 раза. При совместном применении протатранов синтез ферментов был выше в 3,4–11,7 раза. Для образования протеаз наиболее эффективным было совместное внесение изучаемых протатранов в концентрации 10^{-6} % масс., при этом синтез ферментов достигал $184,8 \pm 7,02$ Ед/мл к.ж. При совместном внесении изучаемые протатраны трис(2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенил-сульфанилацетат и трис(2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенил-сульфонилацетат могут быть использованы для увеличения эффективности продуцирования внеклеточных липаз и протеаз дрожжами *Candida ethanolica*. Особенностью влияния протатранов оказалась неравномерная динамика накопления внеклеточных ферментов, проявляющаяся в наличии резких пиков в процессе культивирования дрожжей. Причины данной неравномерности требуют дополнительных исследований.

Ключевые слова: ферменты, липазы, протеазы, протатраны, *Candida ethanolica*

Благодарности. Исследования частично проведены на оборудовании Байкальского аналитического центра коллективного пользования СО РАН.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда и Правительства Иркутской области (проект № 23-26-10007).

Для цитирования: Кирюхина А.С., Лозовая Т.С., Адамович С.Н. Влияние протатранов на биосинтез внеклеточных ферментов *Candida ethanolica* ВКМ Y-2300 T // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 506–515. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-506-515. EDN: IVPAEU.

PHYSICO-CHEMICAL BIOLOGY

Original article

Effect of protatranes on the biosynthesis of extracellular enzymes of *Candida ethanolica* ВКМ Y-2300 T

Aleksandra S. Kiryukhina*✉, Tatyana S. Lozovaya*, Sergei N. Adamovich**

*Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

**A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. The study aims to explore the possibility of using synthetic biologically active compounds (protatranes) to increase the lipolytic and proteolytic activity of *Candida ethanolica*. Protatran 1 (tris(2-hydroxyethyl) ammonium-4-chlorophenyl-sulfanyl acetate) and protatran 2 (tris(2-hydroxyethyl) ammonium-4-chlorophenyl-sulfonyl acetate) were

© Кирюхина А.С., Лозовая Т.С., Адамович С.Н., 2023

added to the growth medium at trace concentrations of 1×10^{-6} – 1×10^{-8} wt% separately and together. It was established that with the introduction to the growth medium, protatranes had a multidirectional effect on the biosynthesis of enzymes by *Candida ethanolica* yeast. This effect was dependent on the concentrations of these compounds, as well as on their separate or combined introduction. All the studied concentrations were found to be effective for lipase synthesis, as they improved enzyme synthesis by 1.7–8.6 times. The combined use of protatranes increased enzyme synthesis by 3.4–11.7 times. For protease formation, the combined introduction of the studied protatranes at a concentration of 10^{-6} wt% was found to be the most effective, with enzyme synthesis reaching 184.8 ± 7.02 U/mL in the culture broth. When co-introduced, the studied protatranes tris(2-hydroxyethyl) ammonium-4-chlorophenyl-sulfanyl acetate and tris(2-hydroxyethyl) ammonium-4-chlorophenyl-sulfonyl acetate can be used to increase the production efficiency of extracellular lipases and proteases by *Candida ethanolica*. The specific effect of protatranes was revealed to be the uneven dynamics of extracellular enzyme accumulation, manifested in the presence of sharp peaks during yeast cultivation. The reasons for this unevenness require further research.

Keywords: enzymes, lipases, proteases, protatranes, *Candida ethanolica*

Acknowledgements. The studies were partially carried out on the equipment of the Baikal Analytical Center for Collective Use of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.

Funding. RSF and the Government of the Irkutsk region (project no. 23-26-10007) supported this work.

For citation: Kiryukhina A.S., Lozovaya T.S., Adamovich S.N. Effect of protatranes on the biosynthesis of extracellular enzymes of *Candida ethanolica* ВКМ Y-2300 Т. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):506-515. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-506-515. EDN: IPVAEU.

ВВЕДЕНИЕ

Значение ферментов в хозяйственной деятельности человека трудно переоценить. Они применяются практически во всех сферах: в пищевой индустрии и фармацевтике; для очистки сточных вод, загрязненных почвы и воздуха; при добыче полезных ископаемых и получении новых видов энергии и топлива; при создании комбинированных химических продуктов и пр. [1, 2]. Источником большинства ферментов являются микроорганизмы, которые обладают высокой скоростью роста, способны расти на разнообразных субстратах и синтезировать различные ферменты, в том числе ферменты класса гидролаз – липазы и протеазы [3, 4].

Протеазы представляют собой гидролитические ферменты, способные расщеплять белки до более низкомолекулярных соединений – пептидов и аминокислот. Протеолитические ферменты микробного происхождения широко используются в самых разнообразных производственных технологиях [5]. Например, протеазы применяют для очистки воды и устранения биопленок [6], для получения пищевых продуктов с повышенным содержанием пептидов и гидролизатов белков, для устранения белковых помутнений в виноделии или повышения скорости фильтрации [3, 7, 8]. В медицинской практике протеазы назначают в составе противовоспалительной терапии, при заболеваниях пищеварительной системы, а также используют в различных медицинских разработках [9–12].

Липазы – это ферменты, расщепляющие жиры до спиртов и жирных кислот. Они применяются для изготовления биодизеля, продуктов питания и напитков, кожи и текстиля, в составе моющих средств, в фармацевтике и медицине, для очистки жиросодержащих стоков [13–19].

В качестве продуцентов различных гидролаз используются культуры мицелиальных грибов, дрожжей и бактерий [19, 20]. Продуценты, способные расти на дешевом сырье, предпочтительны, в связи с чем определенный

интерес представляют дрожжи *Candida ethanolica*, которые в качестве источника углерода предпочитают использовать этанол – доступное и дешевое сырье, не содержащее примесей, хорошо растворимое в воде [10–12].

При получении продуктов микробного синтеза основной проблемой является повышение и сохранение высокой продуктивности микроорганизмов [12]. Известно, что уровень секреции целевых продуктов у микроорганизмов зависит от таких факторов окружающей среды, как температура, pH, количество и состав источников питания, использование стимуляторов роста [21, 22]. В качестве альтернативы привычным биостимуляторам и способа снижения расходов при получении ферментов интересно рассмотреть такие соединения, как протатраны. Это одна из разновидностей «атранов» – биологически-активных веществ, синтезирующихся путем взаимодействия биогенных аминов и биологически активных аналогов фитогормонов. Данные соединения хорошо растворяются в воде, устойчивы при хранении, нетоксичны ($LD_{50} = 1300$ – 6000 мг/кг). Воздействие протатранов уже изучено на нескольких биологических объектах, на которые они оказывают положительное влияние, стимулируя рост или синтез ценных метаболитов. В сравнении с другими стимуляторами роста протатраны дешевле, т.к. применяются и действуют в микроконцентрациях от 1×10^{-2} до 1×10^{-8} % масс. [23–26].

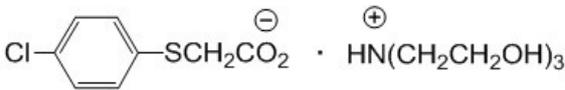
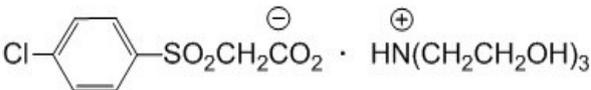
В связи с вышесказанным целью представленного исследования было изучение влияния протатранов трис(2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенил-сульфанилацетат (протатран 1) и трис(2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенил-сульфониацетат (протатран 2) на липолитическую и протеолитическую активность дрожжей *C. ethanolica* ВКМ Y-2300 Т.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве продуцента использовали дрожжи *C. ethanolica* Rybarova, Stros et Kockova-Kratochvilova 1980

Структура использованных протатранов

Structure of protatranes

Обозначение	Соединение	Структурная формула
Протатран 1	Трис(2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенил-сульфаниацетат	
Протатран 2	Трис(2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенил-сульфониацетат	

штамма ВКМ Y-2300 Т из коллекции Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН.

Дрожжи культивировали в течение 40 ч в колбах Эрленмейера объемом 500 мл с 200 мл синтетической питательной среды следующего состава, г/л [27]: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 10,0; K_2HPO_4 – 10,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,7; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0125; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0125; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0125; NaCl – 0,0063. В качестве источника углерода для культивирования дрожжей использовали этанол в количестве 1,5% об. Питательную среду стерилизовали при 1 атм в течение 15 мин, pH среды равнялся 7,0. Корректировку pH проводили внесением в питательную среду стерильных растворов 1%-й H_2SO_4 и 1%-го Na_2CO_3 .

В качестве посевного материала использовали дрожжевую суспензию. Для ее получения дрожжи культивировали в течение 48 ч на плотной питательной среде – сусло-агаре, для приготовления которой использовали сусло с концентрацией сухих веществ 6%. После выращивания дрожжей на сусло-агаре осуществляли культивирование в колбах объемом 300 мл со 100 мл синтетической питательной среды выше указанного состава в течение 24 ч. Такое получение посевного материала исключало возможность попадания остатков сусло-агара в экспериментальные колбы для культивирования, обеспечивало постоянство состава синтетической питательной среды, а также позволяло получать посевной материал с постоянной концентрацией клеток.

Готовый посевной материал вносили в экспериментальные колбы в количестве 10 мл (5% от объема среды). Количество клеток в дрожжевой суспензии перед началом культивирования составляло $3 \times 10^6 \pm 8,2 \times 10^4$ КОЕ/мл. После засева колбы с культурой помещали в инкубационный шейкер CERTOMAT BS-1 (Sartorius Stedim Biotech, Германия). Скорость перемешивания составляла 200 об/мин. Ферментативную активность внеклеточных протеаз штамма определяли по методу, описанному в источнике [28], внеклеточных липаз – по методу Ота, Ямада [29].

В качестве стимуляторов использовали протатраны 1 и 2, синтезированные на основе биогенных этаноламинов и арилхалькогенилуксусных кислот (таблица) в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского. Растворы данных химических соединений стерилизовали методом вакуумной мембранной фильтрации (диаметр пор мембраны 0,1 мкм) и вносили в питательную среду перед началом культивирования дрожжей как по отдельности, так и совместно в концентрациях 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} % масс. Все исследования проводили в трехкратной повторности. Контролем служила культура

дрожжей *C. ethanolica*, выращенная в тех же условиях без добавления протатранов.

Результаты исследований были обработаны методом вариационной статистики на персональном компьютере с использованием программы Microsoft Excel. Статистическую значимость различий оценивали по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее с помощью качественных биохимических тестов выявили, что дрожжи *C. ethanolica* в принципе способны образовывать внеклеточные липазы и протеазы [30], однако не было известно, насколько активными продуцентами данных ферментов они являются. В связи с этим мы провели исследования по количественному определению ферментов, продуцируемых дрожжами (рис. 1).

В результате проведенных исследований было показано, что дрожжи *C. ethanolica* штамма ВКМ Y-2300 Т являются активными продуцентами липаз. Синтез липаз был отмечен через сутки от начала культивирования и в процессе культивирования постоянно повышался. Максимальная активность внеклеточных липаз составила $605 \pm 6,3$ Ед/мл к.ж. на 40-й час роста культуры. При сравнении данной величины с активностью липаз известных продуцентов было выяснено, что липолитическая активность у дрожжей *C. ethanolica* выше в 2,8 раза [31, 32].

В то же время дрожжи *C. ethanolica* штамма ВКМ Y-2300 Т оказались неактивными продуцентами протеаз. Активность внеклеточных протеаз в течение 27 ч культивирования не менялась, а затем стала снижаться до нуля. Причиной, возможно, являлся неподходящий состав среды для синтеза протеаз и/или отсутствие белкового субстрата. Исходный уровень протеазы *C. ethanolica* оказался выше некоторых известных продуцентов в 3–15 раз [33, 34], однако ниже других на 40% [25] или в 2,5 раза [36].

Для оценки влияния протатранов на активность ферментов было проведено культивирование дрожжей в присутствии протатранов. Протатраны 1 и 2 вносили в питательную среду в определенной концентрации как по отдельности, так и вместе с целью выяснить, могут ли они изменять свое воздействие в данных условиях и влиять друг на друга. Результаты исследований представлены на рис. 2 и 3.

Проведенные исследования показали, что процесс синтеза липаз в присутствии изученных концентраций протатрана 1 был более интенсивным и при этом более

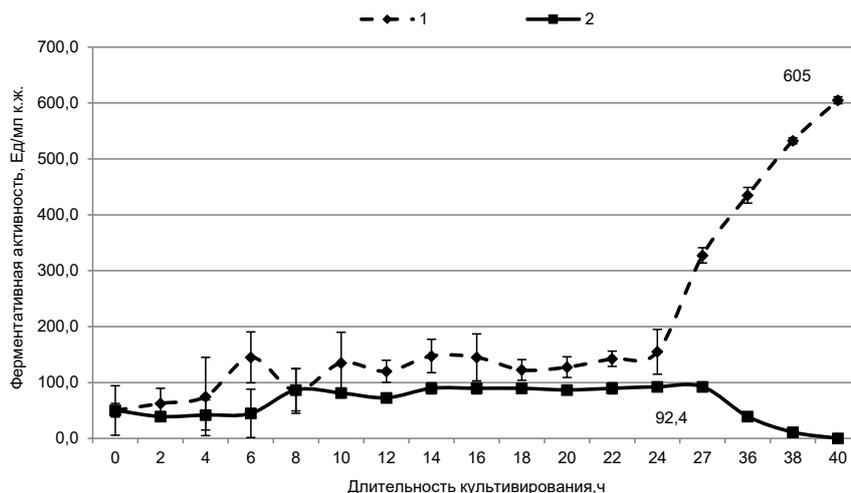


Рис. 1. Внеклеточная ферментативная активность дрожжей *Candida ethanolica* (1 – липолитическая активность; 2 – протеолитическая активность)

Fig. 1. Extracellular enzymatic activity of *Candida ethanolica* yeast (1 – lipolytic activity; 2 – proteolytic activity)

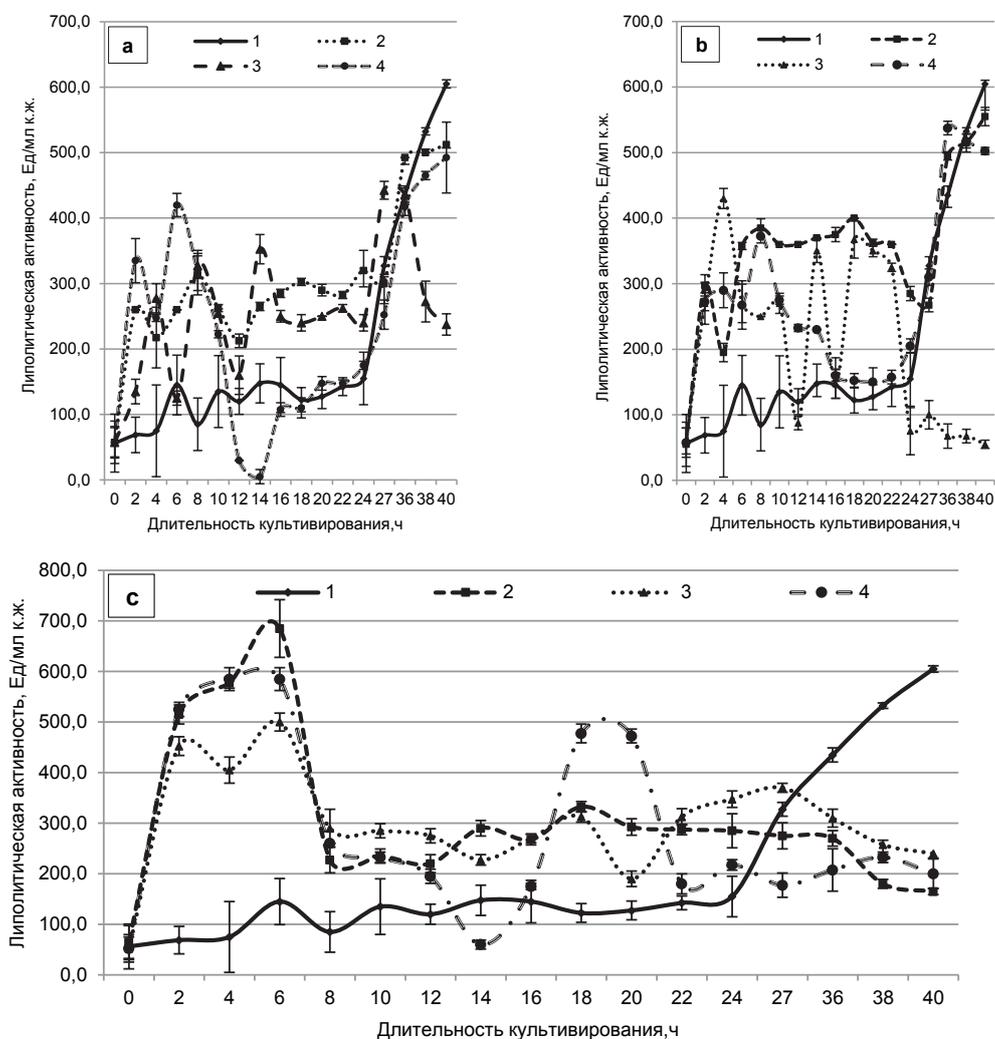


Рис. 2. Действие протатранов на активность внеклеточных липолитических ферментов: а – действие протатрана 1; б – действие протатрана 2; с – одновременное действие двух протатранов (1 – контроль; 2 – концентрация $10^{-6}\%$ масс.; 3 – концентрация $10^{-7}\%$ масс.; 4 – концентрация $10^{-8}\%$ масс.)

Fig. 2. Protatranes effect on the activity of extracellular lipolytic enzymes: а – protatran 1 action; б – protatran 2 action; с – simultaneous action of two protatranes (1 – control; 2 – concentration $10^{-6}\%$ mass; 3 – concentration $10^{-7}\%$ mass; 4 – concentration $10^{-8}\%$ mass)

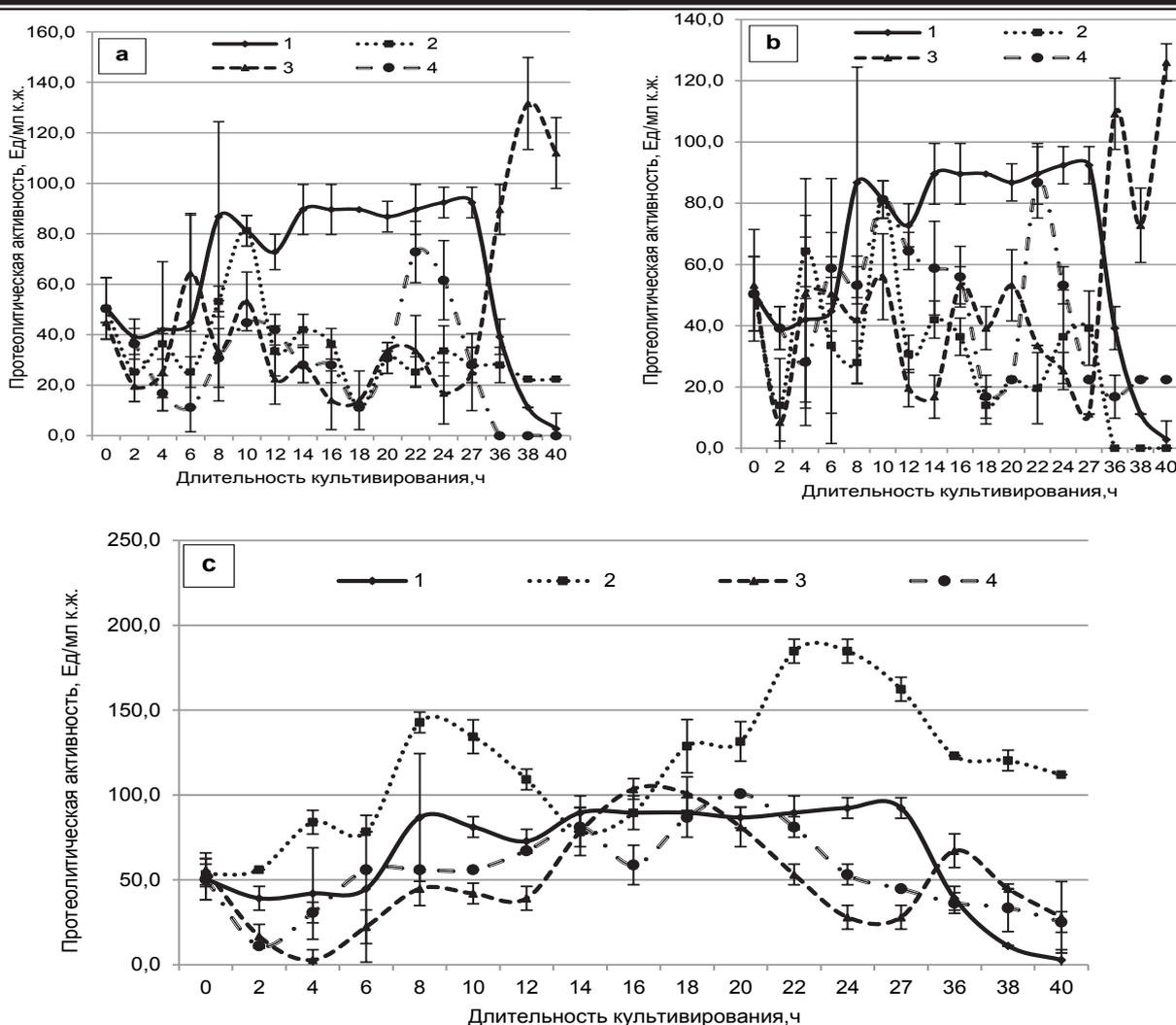


Рис. 3. Действие протатранов на активность внеклеточных протеолитических ферментов: а – действие протатрана 1; б – действие протатрана 2; с – одновременное действие двух протатранов (1 – контроль; 2 – концентрация $10^{-6}\%$ масс.; 3 – концентрация $10^{-7}\%$ масс.; 4 – концентрация $10^{-8}\%$ масс.)

Fig. 3. Protatranes effect on the activity of extracellular proteolytic enzymes: а – protatran 1 action; б – protatran 2 action; с – simultaneous action of two protatranes (1 – control; 2 – concentration $10^{-6}\%$ mass; 3 – concentration $10^{-7}\%$ mass; 4 – concentration $10^{-8}\%$ mass)

неравномерным в сравнении с контролем (см. рис. 2, а). Активность ферментов была значительно выше контроля в первые 24 ч. Наиболее эффективной оказалась концентрация протатрана $10^{-8}\%$ масс., т.к. в этом случае синтез внеклеточных липаз в 1,7–5,9 раза выше чем, в контроле (в первые 10 ч культивирования). Концентрация $10^{-6}\%$ масс. в течение 24 ч культивирования вызывала повышение уровня липаз в 1,8–4,6 раза. Динамика синтеза ферментов при концентрации $10^{-7}\%$ масс. характеризуется пиками как высокого, так и низкого уровня. Отрицательными эффектами стоит считать наличие неравномерности данного процесса в присутствии протатрана 1 и в целом более низкий уровень активности, чем в контроле, на момент окончания культивирования.

Похожие результаты были получены с применением протатрана 2. Отличие в данном случае заключалось лишь в том, что уровень активности липаз при концентрации $10^{-6}\%$ масс. оказался в 1,9–8,6 раза выше

контроля, т.е. процесс протекал более эффективно, чем при культивировании дрожжей с использованием протатрана 1 (см. рис. 2, б).

При совместном использовании протатранов уровень липаз также был выше контроля, однако в период до 8 ч уровень активности ферментов оказался гораздо выше, чем в остальное время (в 3,4–11,7 раза) (см. рис. 2, с).

При добавлении протатрана 1 или протатрана 2 наблюдалось снижение активности протеаз (см. рис. 3, а, б). После 36 ч культивирования при концентрации $10^{-7}\%$ масс. уровень протеолитической активности был несколько выше контроля. Кривые, отражающие динамику образования протеаз дрожжами, также отличались неравномерностью.

При одновременном применении протатранов 1 и 2 в одной из концентраций ($10^{-6}\%$ масс.) активность протеаз возрастала в 1,4–2,3 раза на протяжении большего периода процесса культивирования (см. рис. 3, с).

Для объяснения положительного воздействия протатранов на биосинтез ферментов, вероятно, подходит предположение о том, что они имеют в молекулах благоприятное сочетание нескольких эффектов – двойное воздействие биологически активных этаноламинов и арилхалькогенилукусусных кислот, а также возможность быстрого проникновения в живую клетку за счет водородных связей и диполь-дипольного взаимодействия с полярными группами белков и липидов [25, 37]. В свою очередь, отрицательное воздействие протатранов и неравномерность данного воздействия, по-видимому, можно объяснить слишком интенсивным воздействием данных веществ на дрожжи при внесении их в экспериментальных концентрациях, особенностями строения клеточной стенки дрожжей, их метаболизма или состава питательной среды [38]. При этом в целом воздействие на объект исследования протатрана 1 не слишком отличалось от воздействия протатрана 2, что, возможно, обусловлено схожестью их строения (см. таблицу).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящего исследования установлено, что дрожжи *S. ethanolica* являются перспективными продуцентами липаз. При этом выявлено, что синтетические

биологически активные вещества – протатраны 1 и 2 – при внесении в питательную среду в микроконцентрациях (от 1×10^{-6} до 1×10^{-8} % масс.) разнонаправленно влияют на биосинтез ферментов дрожжами *S. ethanolica*. Это зависит от концентраций данных соединений, а также от их отдельного либо совместного применения.

Для биосинтеза липаз все изученные концентрации протатранов (от 1×10^{-6} до 1×10^{-8} % масс.) увеличивали количество ферментов в 1,7–8,6 раза. Совместное применение протатранов в концентрации 1×10^{-6} % масс. усиливало биосинтез липаз в 3,4–11,7 раза.

Для образования протеаз все изученные концентрации протатранов (от 1×10^{-6} до 1×10^{-8} % масс.) были неэффективными, и только их совместное внесение в концентрации 10⁻⁶% масс. приводило к повышению синтеза ферментов в 1,4–2,3 раза.

Особенностью влияния протатранов оказалась неравномерная динамика накопления внеклеточных ферментов, проявляющаяся в виде резких пиков в процессе культивирования дрожжей. Причины данной неравномерности требуют дополнительных исследований.

Таким образом, протатраны 1 и 2 могут быть использованы для увеличения эффективности продуцирования внеклеточных липаз и протеаз дрожжами *S. ethanolica*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Хоконова М.Б. Использование дополнительных ферментных препаратов при солужении // Известия Кабардино-Балкарского государственного аграрного университета им. В.М. Кокова. 2019. N 2. С. 87–90. EDN: GPGWPN.
2. Вистовская В.П. Гидролитические ферменты в биотехнологии сыра // Известия Алтайского государственного университета. 2012. N 3-2. С. 9–12. EDN: PMDMBB.
3. Dos Santos Aguilar J.G., Sato H.H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates // Food Research International. 2018. Vol. 103. P. 253–262. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.10.044.
4. Bharathi D, Rajalakshmi G. Microbial lipases: an overview of screening, production and purification // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2019. Vol. 22. P. 101368. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101368.
5. Sharma K.M., Kumar R., Panwar S., Kumar A.. Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2017. Vol. 15, no. 1. P. 115–126. DOI: 10.1016/j.jgeb.2017.02.001.
6. Hasan M.J., Haque P., Rahman M.M. Protease enzyme based cleaner leather processing: a review // Journal of Cleaner Production. 2022. Vol. 365. P. 132826. DOI: 10.1016/j.jclepro.2022.132826.
7. Cao S., Song J., Li H., Wang K., Li Y., et al. Improving characteristics of biochar produced from collagen-containing solid wastes based on protease application in leather production // Waste Management. 2020. Vol. 105. P. 531–539. DOI: 10.1016/j.wasman.2020.02.043.
8. Chen Y., Liao X., Zhang C., Kong X., Hua Y. Hydrolyzing behaviors of endogenous proteases on proteins in sesame milk and application for producing low-phytate sesame protein hydrolysate // Food Chemistry. 2022. Vol. 385. P. 132617. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132617.
9. Rosenberg L., Lapid O., Bogdanov-Berezovsky A., Glesinger R., Krieger Y., Silberstein E., et al. Safety and efficacy of a proteolytic enzyme for enzymatic burn debridement: a preliminary report // Burns. 2004. Vol. 30, no. 8. P. 843–850. DOI: 10.1016/j.burns.2004.04.010.
10. Cogo F., Williams R., Burden R.E., Scott C.J. Application of nanotechnology to target and exploit tumour associated proteases // Biochimie. 2019. Vol. 166. P. 112–131. DOI: 10.1016/j.biochi.2019.04.021.
11. Gräwe A., Ranglack J., Weber W., Stein V. Engineering artificial signalling functions with proteases // Current Opinion in Biotechnology. 2020. Vol. 63. P. 1–7. DOI: 10.1016/j.copbio.2019.09.017.
12. Barzkar N. Marine microbial alkaline protease: an efficient and essential tool for various industrial applications // International Journal of Biological Macromolecules. 2020. Vol. 161. P. 1216–1229. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.072.
13. Chandra P., Enespa, Singh R., Arora P.K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review // Microbial Cell Factories. 2020. Vol. 19. P. 169. DOI: 10.1186/s12934-020-01428-8.
14. Ray A. Application of lipase in industry // Asian Journal of Pharmacy and Technology. 2012. Vol. 2, no. 2. P. 33–37.
15. Salgado C.A., dos Santos C.I.A., Vanetti M.C.D. Microbial lipases: propitious biocatalysts for the food industry // Food Bioscience. 2022. Vol. 45. P. 101509. DOI: 10.1016/j.fbio.2021.101509.
16. Samer M. Biological and chemical wastewater treatment processes // Wastewater treatment engineering / ed. M. Samer. InTech, 2015. P. 1–50. DOI: 10.5772/61250.
17. Agobo K.U., Arazu V.A., Uzo K., Igwe C.N. Microbial lipases: a prospect for biotechnological industrial catalysis for green products: a review // Fermentation Technology. 2017. Vol. 6, no. 2. P. 144. DOI: 10.4172/2167-7972.1000144.
18. Porwal H.J., Mane A.V., Velhal S.G. Biodegradation of dairy effluent by using microbial isolates obtained from activated sludge // Water Resources and Industry. 2015. Vol. 9. P. 1–15. DOI: 10.1016/j.wri.2014.11.002.

19. Rabbani G., Ahmad E., Ahmad A., Khan R.H. Structural features, temperature adaptation and industrial applications of microbial lipases from psychrophilic, mesophilic and thermophilic origins // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023. Vol. 225. P. 822–839. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.11.146.
20. Борисенко Е.Г., Мадзу О.Б., Пироговская Е.К., Маслова Т.А., Азанова А.А. Производство дрожжевых продуктов широкого профиля // *Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств»*. 2019. N 1. С. 3–9. DOI: 10.17586/2310-1164-2019-12-1-3-9. EDN: HETJHR.
21. Mohedano M.T., Konzock O., Chen Y. Strategies to increase tolerance and robustness of industrial microorganisms // *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2022. Vol. 7, no. 1. P. 533–540. DOI: 10.1016/j.synbio.2021.12.009.
22. Lario L.D., Pillaca-Pullo O.S., Sette L.D., Converti A., Casati P., Spampinato C., et al. Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528 // *Biotechnology Reports*. 2020. Vol. 28. P. e00546. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00546.
23. Chen Y., Wang L., Dai F., Tao M., Li X., Tan Z. Biostimulants application for bacterial metabolic activity promotion and sodium dodecylsulfate degradation under copper stress // *Chemosphere*. 2019. Vol. 226. P. 736–743. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.180.
24. Поморцев А.В., Дорофеев Н.В., Адамович С.Н., Оборина Е.Н. Влияние протатранов на физиологические параметры яровой пшеницы при хлоридном засолении // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2022. Т. 12. N 3. С. 485–490. DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-3-485-490. EDN: LTLFUE.
25. Pavlova O.N., Adamovich S.N., Novikova A.S., Gorskov A.G., Izosimova O.N., Ushakov I.A., et al. Protatranes, effective growth biostimulants of hydrocarbon-oxidizing bacteria from Lake Baikal, Russia // *Biotechnology Reports*. 2019. Vol. 24. P. e00371. DOI: 10.1016/j.btre.2019.e00371.
26. Привалова Е.А., Тигунцева Н.П., Адамович С.Н., Мирсков Р.Г., Мирскова А.Н. Трис-(2-гидроксиэтил)аммониевые ионные жидкости – новые биостимуляторы роста спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Вестник Иркутского государственного технического университета*. 2015. N 11. С. 136–141. EDN: VAUERR.
27. Пат. № 2061751, Российская Федерация, МПК C12N 1/16, C12R 1/72. Штамм дрожжей *Candida ethanolica* – продуцент биомассы / Р.Н. Бравичева, А.Д. Сатрутдинов, В.М. Благодатская, Н.Б. Градова, В.К. Ерошин, Н.А. Салихова [и др.]. Заявл. 13.04.1992; опубл. 10.06.1996.
28. Карпенко Д.В., Житков В.В., Карязин С.А. Влияние нанопрепаратов на активность протеаз // *Пиво и напитки*. 2016. N 4. С. 46–49. EDN: WMZEZV.
29. Стурова Ю.Г., Гришкова А.В. Исследование активности прегастральных липаз // *Ползуновский вестник*. 2019. N 4. С. 29–33. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2019.04.007. EDN: ZVMNLT.
30. Кирюхина А.С. Характеристика продуктивности дрожжей *Candida ethanolica* штамма ВКМ Y-2300 T // *Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология»*. 2022. Т. 39. С. 3–14. DOI: 10.26516/2073-3372.2022.39.3. EDN: KIIOKC.
31. Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е., Чан Т.Т.Х., Васильева А.В. Влияние состава питательной среды на липолитическую активность дрожжей *Yarrowia lipolytica* // *Бутлеровские сообщения*. 2013. Т. 35. N 9. С. 71–77. EDN: RBZKXX.
32. Шнайдер К.Л., Зиновьева М.Е., Гамаюрова В.С. Влияние компонентов питательной среды на биосинтез липазы дрожжами *Yarrowia (Candida) lipolytica* Y-3153 (АТСС 34088) // *Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Химическая технология и биотехнология*. 2021. N 3. С. 5–21. DOI: 10.15593/2224-9400/2021.3.01. EDN: DTLUSI.
33. Пат. № 2208633, Российская Федерация, МПК C12N 1/20, C12N 9/56, C12R 1/125. Штамм *Bacillus subtilis* P-1 – продуцент протеазы / Т.Н. Кузнецова, Р.С. Нафиков, М.М. Алсынбаев, В.Ф. Кулагин. Заявл. 14.11.2001; опубл. 20.07.2003.
34. Пат. № 2272838, Российская Федерация, МПК C12N 1/20, C12N 9/14, C12R 1/07. Штамм бактерии *Bacillus macerans* BS-04 – продуцент пектиназ, протеазы, ксиланазы и амилазы / Г.Б. Бравова, Э.А. Шишкова, Т.Е. Смирнова, В.В. Бурмистрова, Е.А. Нестеренко, О.А. Полетаева. Заявл. 21.06.2004; опубл. 27.03.2006.
35. Серба Е.М., Римарева Л.В., Погоржельская Н.С., Давыдкина В.Е., Поляков В.А. Биомасса мицелиальных грибов – субстрат для создания биологически активных добавок // *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2016. N 3-1. С. 163–165. EDN: WJUOUT.
36. Пат. № 2303066, Российская Федерация, МПК C12N 9/56, C12N 1/20, C12R 1/66. Штамм бактерий *Bacillus licheniformis* – продуцент щелочной протеазы / Н.В. Цурикова, Л.И. Нефедова, О.Н. Окунев, А.П. Сеницын, В.М. Черноглазов, Т.А. Воейкова [и др.]. Заявл. 14.11.2005; опубл. 20.07.2007.
37. Мирскова А.Н., Адамович С.Н., Мирсков Р.Г., Воронков М.Г. Фармакологически активные соли и ионные жидкости на основе 2-гидроксиэтиламинов, арилхалькогенилуксусных кислот и эссенциальных металлов // *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2014. N 9. С. 1869–1883. EDN: RGDPWU.
38. Seter M., Thomson M.J., Stoimenovski J., MacFarlane D.R., Forsyth M. Dual active ionic liquids and organic salts for inhibition of microbially influenced corrosion // *Chemical Communications*. 2012. Vol. 48. P. 5983–5985. DOI: 10.1039/c2cc32375c.

REFERENCES

1. Khokonova M.B. Use of additional enzyme preparations when combined. *Izvestiya Kabardino-Balkarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta im. V.M. Kokova*. 2019;2:87-90. (In Russian). EDN: GPGWPN.
2. Vistovskaya V.P. Hydrolytic enzymes in cheese biotechnology. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2012;3-2:9-12. (In Russian). EDN: PMDMBB.
3. Dos Santos Aguilar J.G., Sato H.H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*. 2018;103:253-262. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.10.044.

4. Bharathi D, Rajalakshmi G. Microbial lipases: an overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019;22:101368. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101368.
5. Sharma K.M., Kumar R., Panwar S., Kumar A.. Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2017;15(1):115-126. DOI: 10.1016/j.jgeb.2017.02.001.
6. Hasan M.J., Haque P., Rahman M.M. Protease enzyme based cleaner leather processing: a review. *Journal of Cleaner Production*. 2022;365:132826. DOI: 10.1016/j.jclepro.2022.132826.
7. Cao S., Song J., Li H., Wang K., Li Y., Li Y., et al. Improving characteristics of biochar produced from collagen-containing solid wastes based on protease application in leather production. *Waste Management*. 2020;105:531-539. DOI: 10.1016/j.wasman.2020.02.043.
8. Chen Y., Liao X., Zhang C., Kong X., Hua Y. Hydrolyzing behaviors of endogenous proteases on proteins in sesame milk and application for producing low-phytate sesame protein hydrolysate. *Food Chemistry*. 2022;385:132617. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132617.
9. Rosenberg L., Lapid O., Bogdanov-Berezovsky A., Glesinger R., Krieger Y., Silberstein E., et al. Safety and efficacy of a proteolytic enzyme for enzymatic burn debridement: a preliminary report. *Burns*. 2004;30(8):843-850. DOI: 10.1016/j.burns.2004.04.010.
10. Cogo F., Williams R., Burden R.E., Scott C.J. Application of nanotechnology to target and exploit tumour associated proteases. *Biochimie*. 2019;166:112-131. DOI: 10.1016/j.biochi.2019.04.021.
11. Gräwe A., Ranglack J., Weber W., Stein V. Engineering artificial signalling functions with proteases. *Current Opinion in Biotechnology*. 2020;63:1-7. DOI: 10.1016/j.copbio.2019.09.017.
12. Barzkar N. Marine microbial alkaline protease: an efficient and essential tool for various industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;161:1216-1229. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.072.
13. Chandra P., Enespa, Singh R., Arora P.K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial Cell Factories*. 2020;19:169. DOI: 10.1186/s12934-020-01428-8.
14. Ray A. Application of lipase in industry. *Asian Journal of Pharmacy and Technology*. 2012;2(2):33-37.
15. Salgado C.A., dos Santos C.I.A., Vanetti M.C.D. Microbial lipases: propitious biocatalysts for the food industry. *Food Bioscience*. 2022;45:101509. DOI: 10.1016/j.fbio.2021.101509.
16. Samer M. Biological and chemical wastewater treatment processes. In: Samer M. (ed.). *Wastewater treatment engineering*. InTech; 2015, p. 1-50. DOI: 10.5772/61250.
17. Agobo K.U., Arazu V.A., Uzo K., Igwe C.N. Microbial lipases: a prospect for biotechnological industrial catalysis for green products: a review. *Fermentation Technology*. 2017;6(2):144. DOI: 10.4172/2167-7972.1000144.
18. Porwal H.J., Mane A.V., Velhal S.G. Biodegradation of dairy effluent by using microbial isolates obtained from activated sludge. *Water Resources and Industry*. 2015;9:1-15. DOI: 10.1016/j.wri.2014.11.002.
19. Rabbani G., Ahmad E., Ahmad A., Khan R.H. Structural features, temperature adaptation and industrial applications of microbial lipases from psychrophilic, mesophilic and thermophilic origins. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;225:822-839. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.11.146.
20. Borisenko E.G., Madzou O.B., Pirogovskaya E.K., Maslova T.A., Azanova A.A. Production of yeast products of wide profile. *Nauchnyi zhurnal NIU ITMO. Seriya "Protsessy i apparaty pishchevykh proizvodstv" = Scientific journal NRU ITMO. Series "Processes and Food Production Equipment"*. 2019;1:3-9. (In Russian). DOI: 10.17586/2310-1164-2019-12-1-3-9. EDN: HETJHR.
21. Mohedano M.T., Konzock O., Chen Y. Strategies to increase tolerance and robustness of industrial microorganisms. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2022;7(1):533-540. DOI: 10.1016/j.synbio.2021.12.009.
22. Lario L.D., Pillaca-Pullo O.S., Sette L.D., Converti A., Casati P., Spampinato C., et al. Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528. *Biotechnology Reports*. 2020;28:e00546. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00546.
23. Chen Y., Wang L., Dai F., Tao M., Li X., Tan Z. Biostimulants application for bacterial metabolic activity promotion and sodium dodecylsulfate degradation under copper stress. *Chemosphere*. 2019;226:736-743. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.180.
24. Pomortsev A.V., Dorofeev N.V., Adamovich S.N., Oborina E.N. Effect of protatranes on the physiological parameters of spring wheat under chloride salinity conditions. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):485-490. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-3-485-490. EDN: LTLFUE.
25. Pavlova O.N., Adamovich S.N., Novikova A.S., Gorshkov A.G., Izosimova O.N., Ushakov I.A., et al. Protatranes, effective growth biostimulants of hydrocarbon-oxidizing bacteria from Lake Baikal, Russia. *Biotechnology Reports*. 2019;24:e00371. DOI: 10.1016/j.btre.2019.e00371.
26. Privalova E.A., Tiguntseva N.P., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Mirskova A.N. Tris-(2-hydroxyethyl)ammonium ionic liquids as new biostimulants of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol yeast. *Vestnik Irkutskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta = Proceedings of Irkutsk State Technical University*. 2015;11:136-141. (In Russian). EDN: VAUERR.
27. Bravicheva R.N., Satrutdinov A.D., Blagodatskaja V.M., Gradova N.B., Eroshin V.K., Salikhova N.A., et al. *Strain of yeast Candida ethanolica – a producer of biomass*. Patent RF, no. 2061751; 1996. (In Russian).
28. Karpenko D.V., Zhitkov V.V., Karjazin S.A. The influence of nanopreparations on the activity of proteases. *Pivo i napitki = Beer and beverages*. 2016;4:46-49. (In Russian). EDN: WMZEZV.
29. Sturova Yu.G., Grishkova A.V. Study of the activity of pregastric lipases. *Polzunovskiy vestnik*. 2019;4:29-33. (In Russian). DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2019.04.007. EDN: ZVMNLT.
30. Kiryukhina A.S. Characteristics of the yeast strain *Candida ethanolica* BKM Y-2300 T productivity. *Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya "Biologiya. Ekologiya" = The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*. 2022;39:3-14. (In Russian).

DOI: 10.26516/2073-3372.2022.39.3. EDN: KIIOKC.

31. Gamayurova V.S., Zinovyeva M.E., Tran T.T.H., Vasileva A.V. Influence of the composition of the nutrient medium on the biosynthesis of lipase by yeasts *Yarrowia lipolytica*. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Communications*. 2013;35(9):71-77. (In Russian). EDN: RBZKXX.

32. Shnaider K.L., Zinov'eva M.E., Gamayurova V.S. Effect of growth medium components on the biosynthesis of yeast lipase *Yarrowia (Candida) lipolytica* Y-3153 (ATCC 34088). *Vestnik Permskogo natsional'nogo issledovatel'skogo politekhnicheskogo universiteta. Khimicheskaya tekhnologiya i biotekhnologiya = PNRPU Bulletin. Chemical Technology and Biotechnology*. 2021;3:5-21. (In Russian). DOI: 10.15593/2224-9400/2021.3.01. EDN: DTLUSI.

33. Kuznetsova T.N., Nafikov R.S., Alsynbaev M.M., Kulagin V.F. *Strain Bacillus subtilis P-1 as producer of protease*. Patent RF, no. 2208633; 2003. (In Russian).

34. Bravova G.B., Shishkova E.A., Smirnova T.E., Burmistrova V.V., Nesterenko E.A. Poletaeva O.A. *Strain of bacterium Bacillus macerans BS-04 as producer of pectinases, protease, xylanase and amylase*. Patent RF, no. 2272838; 2006. (In Russian).

35. Serba E.M., Rimareva L.V., Pogorzshelskaya N.S., Davyidkina V.E., Polyakov V.A. The biomass of filamentous fungi as a substratum for the creation of biologically active additives. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN = Proceedings of the RAS Ufa Scientific Centre*. 2016;3-1:163-165. (In Russian). EDN: WJUOUT.

36. Tsurikova N.V., Nefedova L.I., Okunev O.N., Sinitsyn A.P., Chernoglazov V.M., Voejkova T.A., et al. *Bacterium strain bacillus licheniformis as alkaline protease producer*. Patent RF, no. 2303066; 2007. (In Russian).

37. Mirskova A.N., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Voronkov M.G. Pharmacologically active salts and ionic liquids based on 2-hydroxyethylamines, arylchalcogenylacetic acids, and essential metals. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya*. 2014;9:1869-1883. (In Russian). EDN: RGDPUW.

38. Seter M., Thomson M.J., Stoimenovski J., MacFarlane D.R., Forsyth M. Dual active ionic liquids and organic salts for inhibition of microbially influenced corrosion. *Chemical Communications*. 2012;48:5983-5985. DOI: 10.1039/c2cc32375c.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Кирюхина Александра Сергеевна,

аспирант,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
✉ alexandra.kirukhina@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0009-0305-6556>

Лозовая Татьяна Сергеевна,

к.б.н., доцент,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
tnike75@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0002-1905-6250>

Адамович Сергей Николаевич,

д.х.н., ведущий научный сотрудник,
Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
mir@irioch.irk.ru
<https://orsid.org/0000-0003-1276-924X>

Вклад авторов

А.С. Кирюхина, Т.С. Лозовая – проведение экспериментальной работы по оценке биологической эффективности протатранов; обсуждение полученных результатов; написание статьи.
С.Н. Адамович выполнение работы по синтезу протатранов; обсуждение полученных результатов.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Aleksandra S. Kiryukhina,

Postgraduate Student,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉ alexandra.kirukhina@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0009-0305-6556>

Tatyana S. Lozovaya,

Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
tnike75@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0002-1905-6250>

Sergei N. Adamovich,

Dr. Sci. (Chemistry), Leading Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
mir@irioch.irk.ru
<https://orsid.org/0000-0003-1276-924X>

Contribution of the authors

A.S. Kiryukhina, T.S. Lozovaya – carrying out the experimental work on the assessment of the protatranes biological effectiveness; discussion of the obtained results; writing the article.
S.N. Adamovich – carrying out the experimental work on protatranes synthesis; discussion of the obtained results.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 19.03.2023.
Одобрена после рецензирования 12.10.2023.
Принята к публикации 31.10.2023.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 19.03.2023.
Approved after reviewing 12.10.2023.
Accepted for publication 31.10.2023.

Научная статья

УДК 581.1

EDN: FNBXUJ

DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-516-522



Влияние гиперэкспрессии гена альтернативной внешней NADH-дегидрогеназы арабидопсиса на устойчивость трансформированных растений табака к отрицательной температуре

Г.Б. Боровский, Е.Л. Горбылева, А.И. Катышев, Н.Е. Коротаева,
Е.А. Полякова, Д.В. Пятрикас, И.В. Федосеева✉, А.М. Шигарова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Российская Федерация

Аннотация. Целью исследования являлось подтверждение функциональной активности и локализации трансгенного белка At_NDB2 арабидопсиса в клетках табака, а также оценка влияния перманентной экспрессии «внешней» альтернативной NADH-дегидрогеназы на устойчивость теплолюбивого растения к низкой температуре. Белок и митохондрии выделяли из листьев растений табака, выращенных при 25 °С (день/ночь) на стадии 7 листьев. С помощью электрофореза и иммуноблоттинга показана локализация белка At_NDB2 в митохондриях. Функциональная активность At_NDB2 подтверждена с помощью полярографии изолированных митохондрий и специфического ингибитора комплекса I митохондрий ротенона. Также выявлено, что у трансгенных растений скорость цианидрезистентного дыхания и активность фермента альтернативной оксидазы существенно выше, чем у растений дикого типа. Для определения устойчивости к низким температурам исходные и трансгенные растения табака в почвогрунте выращивали до стадии 2–3 и 6–7 листьев, после чего выдерживали при температуре от 3 до минус 3 °С в течение суток в темноте и оставляли для отрастания при 25 °С на 7 суток. Установлено, что устойчивость трансгенных и нетрансформированных растений не отличается, хотя ранее было показано, что у трансгенных растений окислительный стресс при низкой температуре снижен по сравнению с растениями дикого типа. Таким образом, было обнаружено, что активность альтернативной NADH-дегидрогеназы снижает окислительный стресс, увеличивает активность альтернативной оксидазы, но не повышает устойчивость *Nicotiana tabacum* к отрицательной температуре.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, At_NDB2, нефосфорилирующее дыхание, устойчивость, низкая температура

Благодарности. В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00097 (<https://rscf.ru/project/23-24-00097/>).

Для цитирования: Боровский Г.Б., Горбылева Е.Л., Катышев А.И., Коротаева Н.Е., Полякова Е.А., Пятрикас Д.В. [и др.]. Влияние гиперэкспрессии гена альтернативной внешней NADH-дегидрогеназы арабидопсиса на устойчивость трансформированных растений табака к отрицательной температуре // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 516–522. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-516-522. EDN: FNBXUJ.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Effect of the overexpression of external alternative NADH dehydrogenase gene in *Arabidopsis* on the resistance of transformed tobacco plants to negative temperatures

Gennadii B. Borovskii, Elena L. Gorbyleva, Alexander I. Katyshev, Natalia E. Korotaeva,
Elizaveta A. Polyakova, Darya V. Pyatrikas, Irina V. Fedoseeva✉, Anastasiya M. Shigarova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

© Боровский Г.Б., Горбылева Е.Л., Катышев А.И., Коротаева Н.Е., Полякова Е.А., Пятрикас Д.В., Федосеева И.В., Шигарова А.М., 2023

Abstract. The study aims to confirm the functional activity and localization of the At_NDB2 transgenic protein of *Arabidopsis* in tobacco cells and to evaluate the effect produced by the permanent expression of external alternative NADH dehydrogenase on the resistance of a heat-loving plant to low temperatures. Proteins and mitochondria were isolated from the leaves of tobacco plants grown at 25 °C (day/night) at the 7-leaf stage. At_NDB2 protein localization in mitochondria was determined via electrophoresis and immunoblotting. The functional activity of At_NDB2 was confirmed through the polarography of isolated mitochondria and the specific mitochondrial complex I inhibitor (rotenone). It was also found that the cyanide-resistant respiration rate and the activity of an alternative oxidase enzyme were significantly higher in transgenic plants than in wild-type plants. In order to determine the resistance to low temperatures, the parent and transgenic tobacco plants were grown in soil until the 2–3 and 6–7 leaf stages, after which they were kept at 3 to -3 °C for a day in the dark and left to regrow at 25 °C for seven days. Although it was previously shown that oxidative stress is reduced in transgenic plants at low temperatures as compared to wild-type plants, it was established that the tolerance of transgenic and nontransformed plants does not differ. Thus, alternative NADH dehydrogenase activity was found to reduce oxidative stress and increase alternative oxidase activity, without enhancing the resistance of *Nicotiana tabacum* to negative temperatures.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, At_NDB2, non-phosphorylating respiration, tolerance, low temperature

Acknowledgements. The equipment of Center of Collective Use “Bioanalitika” of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of SB RAS was used.

Funding. Russian Science Foundation, project no. 23-24-00097 (<https://rscf.ru/project/23-24-00097/>), supported the work.

For citation: Borovskii G.B., Gorbyleva E.L., Katyshev A.I., Korotaeva N.E., Polyakova E.A., Pyatrikas D.V., et al. Effect of the overexpression of external alternative NADH dehydrogenase gene in *Arabidopsis* on the resistance of transformed tobacco plants to negative temperatures. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):516-522. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-516-522. EDN: FNBXUJ.

ВВЕДЕНИЕ

При энергозапасующем окислении NADH митохондриями функционирует комплекс I дыхательной цепи, который является одной из точек генерации мембранного потенциала. У большинства организмов его работа ингибируется ротеноном. Часть организмов, в том числе растения, грибы и некоторые микроорганизмы, также имеет дыхание, не чувствительное к ротенону. NADH или NADPH при этом окисляются несколькими ферментами, локализованными на наружной или на внутренней стороне внутренней митохондриальной мембраны. У арабидопсиса найдены три группы таких NAD(P)H-дегидрогеназ второго типа (ND II): NDA (два гена), NDB (четыре гена), и NDC (один ген) [1]. Установлена локализация данных ферментов: NDB1–NDB4 являются внешними (расположены на наружной стороне внутренней мембраны митохондрий), а NDA1–NDA2 и NDC1 – внутренними (обращены к митохондриальному матриксу) [2]. Точные физиологические функции конкретных белков семейства NDII не определены. Наиболее распространенной точкой зрения является их вовлеченность (вместе с альтернативной оксидазой (АОХ)) в формирование нефосфорилирующей дыхательной цепи при окислительном стрессе и метаболическом дисбалансе [3, 4]. Известно также, что при многих стрессах, например при засухе, практически все гены, кодирующие белки альтернативных путей митохондриального транспорта электронов, участвуют в стрессовой реакции растений и адаптации к неблагоприятным условиям [5]. С этими представлениями согласуются и наши данные о том, что в прорастающих семенах сохраняется способность митохондрий к окислению экзогенного NADH при действии отрицательной температуры на мито-

хондрии и именно окисление внешнего NADH главным образом обеспечивает энергетический метаболизм у растений при низких температурах [6]. Показано, что отсутствие внутренних альтернативных NADH-дегидрогеназ NDA1 и NDA2 снижает выживаемость проростков арабидопсиса при аноксии/реоксигенации, уменьшает квантовый выход фотосистемы II и увеличивает генерацию активных форм кислорода, тогда как гиперэкспрессия генов этих белков, напротив, снижает ее [7].

Ранее было показано, что ген NDB2 играет роль в устойчивости арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) к засухе и избыточному освещению, поскольку линии с нарушенным синтезом этого белка демонстрировали чувствительность к данным стрессам [4]. И напротив, устойчивые к засухе разновидности демонстрировали значительно более высокую экспрессию NDB2 (как и ряда других генов альтернативных путей дыхания), чем чувствительные к данному стрессовому фактору растения [8].

Прямых экспериментов, указывающих на защитную роль экспрессии белка NDB2 при низкой температуре у растений, проведено не было. В качестве модельного объекта нами были созданы трансгенные растения табака (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1), гиперэкспрессирующие ген *A. thaliana* At_NDB2 [9, 10]. Целью проведенной работы являлось подтверждение функциональной активности и правильной локализации трансгенного белка NDB2 арабидопсиса в клетках табака, а также оценка влияния перманентной экспрессии «внешней» альтернативной NADH-дегидрогеназы на устойчивость теплолюбивого растения к низкой температуре.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Создание вектора, трансформация и верификация трансформации табака подробно описаны в работе [10]. Семена табака после стерилизации раскладывали в чашки Петри на агаризованную питательную среду, содержащую 1/2 солей согласно источнику [11], и выращивали в ростовых климатических камерах (Binder, Германия) при освещении 140 мкмоль/(м²×с), фотопериоде 16/8 (день/ночь) и температуре 25 °С до двухнедельного возраста, а затем пересаживали в горшочки с почвосмесью и выращивали растения в тех же условиях до эксперимента на устойчивость до стадии 2–3 или 6–7 настоящих листьев либо выделения митохондрий на стадии 7 листьев.

Выделение митохондрий проводили по источнику [12] с модификациями. 80–100 г зеленых листьев табака растирали в охлажденной ступке в среде выделения (0,4 М сахароза, 50 мМ трис-НСl (рН 7,6), 1 мМ этиленгликольтетрауксусная кислота (ЭГТА), 10 мМ КН₂РO₄, 20 мМ аскорбат, 0,1%-й поливинилпирролидон, 0,5%-й бычий сывороточный альбумин (БСА), 0,5%-й цистеин). После первого центрифугирования (3800 g, 5 мин) из надосадочной жидкости получали осадок (16500 g, 20 мин), который ресуспендировали в среде промывания, содержащей все компоненты среды выделения, кроме цистеина. После еще одной серии центрифугирований (3800 g, 5 мин, затем 16500 g, 20 мин) осадок очень мягко ресуспендировали в среде для очистки (0,4 М сахароза, 50 мМ трис-НСl (рН 7,2), 0,1%-й БСА) и наслаивали на ступенчатый градиент перколла, содержащий 36, 50 и 60% перколла, 0,4 М сахарозу, 50 мМ трис-НСl (рН 7,2) и 0,1% БСА. После центрифугирования (18000 g, 30 мин) собирали очищенные митохондрии, которые располагались между слоями 50 и 35%-го перколла, и дважды промывали в среде (0,4 М сахароза, 10 мМ КН₂РO₄, 0,1%-й БСА) с помощью центрифугирования (17000 g, 10 мин). Полученный после второго осаждения осадок митохондрий использовали для полярографии или в качестве очищенной фракции для электрофореза.

Отбор проб для оценки митохондриальной локализации NDB2 производили после гомогенизации листьев в ступке (1), после серии дифференциальных центрифугирований (2) и после очистки органелл в градиенте перколла с помощью электрофореза (3). Белок осаждали пятикратным объемом охлажденного до минус 20 °С ацетона (8500 g, 10 мин) и растворяли в буфере для образца с додецилсульфатом натрия (ДАС-Na). По 30 мкг белка из каждой пробы разделяли электрофоретически в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии ДАС-Na и переносили на нитроцеллюлозную мембрану в системе miniProtean III (BioRad, США) в соответствии с инструкцией. Для идентификации белка NDB2 использовали первичные антитела (PHY1403A, PhytoAB, США) и вторичные антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой (Sigma, США). Визуализацию антител проводили с использованием хромогенов BCIP (5-bromo-6-chloro-3-indolylphosphate-p-toluidine salt, Gerbu, Германия) и NBT (Nitrotetrazolium blue chloride, AppliChem, Германия).

Скорость поглощения кислорода определяли полярографически с использованием электрода Кларка (Oxytherm, Hansatech Instr., Великобритания), как описано

в работе [13], в ячейке объемом 1,4 мл при температуре 25 °С. Реакционная среда содержала 0,3 М сахарозу, 10 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,5), 10 мМ КCl, 5 мМ MgCl₂, 20 мМ MOPS, 5 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) и 0,3% БСА. В качестве субстратов окисления использовали 10 мМ малат в присутствии глутамата и 1 мМ NADH. Глутамат добавляли для устранения оксалоацетатного ингибирования. При окислении NADH из состава реакционной среды исключали ЭДТА и для активации Ca²⁺-зависимой NDB добавляли 0,06 мМ CaCl₂. Транспорт электронов в комплексе I блокировали 9 мкМ ротенона. Максимальную скорость окисления субстратов измеряли в присутствии 100–200 мкМ аденозиндифосфата (состояние 3). Из полярограмм рассчитывали скорость поглощения кислорода в метаболическом состоянии 3 (V_3 , скорость фосфорилирующего дыхания), скорость поглощения кислорода в метаболическом состоянии 4 (V_4 , скорость нефосфорилирующего дыхания), коэффициент дыхательного контроля по Чансу – Вильямсу (коэффициент дыхательного контроля равен отношению V_3/V_4) и отношение АДФ/О. Активность цитохромного пути рассчитывали как дыхание, ингибируемое 1,2 мМ KCN, а активность альтернативного пути дыхания, связанного с функционированием АОХ, – как дыхание, ингибируемое 6 мМ бензгидроксамовой кислоты в присутствии KCN (цианидрезистентное дыхание, чувствительное к бензгидроксамовой кислоте, или потенциальная (максимально возможная) активность альтернативного пути дыхания). За 100% принимали скорость поглощения кислорода митохондриями в состоянии 3 до добавления ингибиторов. Интактность внешней мембраны митохондрий рассчитывали по разнице скоростей аскорбат-зависимого поглощения кислорода, стимулируемого цитохромом с в отсутствие и в присутствии 0,04%-го детергента Тритон X-100 и чувствительного к KCN.

Тестирование устойчивости к низкой температуре проводили в испытательной камере (Binder, Германия) выдерживанием растений в течение 24 ч при температурах от 3 до минус 3 °С в темноте с последующим отращиванием в ростовой камере в течение недели.

Нормальность распределения определяли с помощью теста Шапиро – Уилкса. Данные представлены как $M \pm S.D.$ Статистическую значимость различий определяли при помощи критерия Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее нами был описан процесс создания трансгенных по *At_NDB2* линий табака, доказательства интеграции в геном, высокой экспрессии матричной рибонуклеиновой кислоты гена *At_NDB2* в листьях табака и накопление белка NDB2 в трансформированных растениях. При этом оказалось, что скорость роста у трансформированных растений линии S13 несколько ниже, чем у растений дикого типа при оптимальной (25 °С) и субоптимальной (20 °С) температурах [10].

В рамках данного исследования нами была показана митохондриальная локализация белкового продукта гена *At_NDB2* в растениях табака линии S13. Количество детектируемого антителами белка NDB2 арабидопсиса последовательно возрастало с увеличением степени

очистки митохондрий из листьев табака (рисунок), что свидетельствует о том, что трансгенный белок находится в митохондриях.



Митохондриальная локализация белка NDB2 *Arabidopsis thaliana* в листьях табака. Пробы для выделения белка были отобраны после осаждения грубых остатков (1), после серии дифференциальных центрифугирований (2) и после очистки органелл в градиенте перколла (3). Белок подготавливали и выявляли иммуноблоттингом так, как это описано в экспериментальной части. Слева обозначены молекулярные веса маркеров

Mitochondrial localization of the NDB2 protein of *Arabidopsis thaliana* in tobacco leaves. Samples for protein isolation were taken after precipitation of coarse residues (1), after a series of differential centrifugations (2), and after purification of organelles in the percoll gradient (3). The protein was prepared and detected by immunoblotting as described in the experimental part. The molecular weights of the markers are indicated on the left

С помощью ингибитора комплекса I митохондрий ротенона, используя изолированные митохондрии контрольных и трансформированных растений, мы установили, что продукт гена *At_NDB2* в митохондриях табака метаболически активен (таблица). Об этом свидетельствует процент ротенон-устойчивого дыхания при использовании малата, который оказался значительно выше у органелл, изолированных из трансформированных растений. Показана также увеличенная в два раза в сравнении с растениями контрольной группы активность цианидрезистентного дыхания (альтернативный путь) при использовании NADH (и на треть при использовании малата) в митохондриях из растений табака с экспрессией гена *At_NDB2*. Данные свидетельствуют об увеличении активности

Некоторые параметры функциональной активности митохондрий, изолированных из листьев табака, трансгенного по *At_NDB2*, и растений дикого типа

Parameters of the functional activity of mitochondria isolated from tobacco leaves transgenic by *At_NDB2* and wild-type plants

Показатель	Дикий тип		Линия S13	
	Малат	NADH	Малат	NADH
АДФ/О	3,32±0,63 ^a	1,90±0,72 ^a	1,80±0,69 ^b	2,30±0,58 ^a
Коэффициент дыхательного контроля	2,24±0,32 ^a	1,81±0,39 ^a	2,01±0,43 ^a	1,91±0,41 ^a
Поглощение O ₂ , нмоль/(мин×мг белка)				
Скорость в фосфолирующем состоянии	16,38±3,70 ^a	14,50±3,56 ^a	22,34±4,10 ^a	26,90±5,13 ^b
Цитохромный путь	10,26±0,97 ^a	16,30±5,67 ^a	10,87±0,41 ^a	14,81±1,90 ^a
Альтернативный путь	7,26±1,50 ^a	5,93±1,42 ^a	10,90±0,85 ^b	11,62±3,20 ^b
Процент ингибирования ротеноном	52,25±8,60 ^a	-	29,75±13,00 ^b	-

Примечание. Цитохромный путь оценивали с помощью ингибитора KCN (1,2 мМ); альтернативный путь оценивали с помощью бензгидроксамовой кислоты (6 мМ) в присутствии KCN. Концентрация малата – 10 мМ, NADH – 1 мМ, ротенона – 6 мкМ. Представлено сравнение параметров для исходного генотипа и линии S13, поиск значимых отличий выполнен для конкретного субстрата (ингибитора) с использованием критерия Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Одинаковые буквы означают отсутствие значимых отличий. $M \pm SD$, $n = 3-8$.

АОХ в митохондриях линии S13 и, вероятно, повышении экспрессии генов АОХ.

Далее была проанализирована устойчивость молодых растений линии S13 и контрольных растений к низкой температуре. Растения в почвогрунте на стадии 2–3 или 6–7 листьев выдерживали в климатической камере в темноте при температурах в диапазоне от 3 до минус 3 °С в течение 24 ч. Изначально мы предполагали, что табак как теплолюбивое растение будет существенно повреждаться при низких положительных температурах, однако этого не произошло. Оказалось, что для растений критической является температура минус 2 °С. Эту температуру растения не выдерживали и погибали. При минус 1 °С часть листьев отмирала спустя некоторое время, но растения не погибали. Разницы в устойчивости между линией с повышенной экспрессией гена *At_NDB2* и нетрансформированными растениями табака при данной схеме эксперимента не было обнаружено.

Известно, что экспрессия генов *NDB* и *АОХ* взаимосвязана. Так, величина экспрессии *АОХ1а* у *A. thaliana* влияет на уровень экспрессии *NDB2* как при комфортных условиях, так и при повышенном облучении ультрафиолетом [14]. Экспрессия этих генов скоординирована при ответе на различные абиотические факторы, что предполагает регуляцию общими промоторными элементами [15–19]. У трансгенных растений табака (*N. sylvestris* L. с гиперэкспрессией *StNDB1* картофеля (*Solanum tuberosum* L.) наблюдали увеличение активности *АОХ* [20]. Схожий эффект наблюдали в ряде аналогичных трансгенных линий арабидопсиса. При этом координированная экспрессия генов *NDB* и *АОХ* и совместная работа белков, которые они кодируют, обеспечивает активность полноценного функционального нефосфорилирующего пути транспорта электронов с использованием NAD(P)H [4]. Предполагается, что в исследуемых нами трансгенных растениях табака вследствие повышенной экспрессии *At_NDB2* *A. thaliana* происходит активация дыхания через нефосфорилирующий путь (*NDB2* – Q/QH2 – *АОХ*), поскольку нами показано, что потенциальная активность *АОХ*

в изолированных митохондриях трансгенного табака значительно повышена (см. таблицу). При этом, как было показано ранее, и скорость альтернативного дыхания у листьев трансформантов, выращенных при 20 °С, была достоверно выше, чем у листьев растений дикого типа, выращенных при такой же температуре [10]. Вероятно, повышение скорости альтернативного дыхания и определяет более низкий уровень генерации активных форм кислорода в трансгенных растениях в условиях воздействия субоптимальной температуры [10]. В то же время нами было установлено, что снижение генерации активных форм кислорода при холодовом стрессе не приводит к повышению устойчивости растений (как это можно было бы ожидать) к небольшим отрицательным

температурам, по крайней мере при используемой в данной работе схеме воздействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате экспериментальной работы с трансгенными по гену *NDB2* из *A. thaliana* (*At_NDB2*) молодыми растениями табака было показано митохондриальное расположение трансгенного белка, его функциональная активность, сопутствующая активация АОХ и цианидрезистентного дыхательного пути. Тем не менее активность альтернативной NADH-дегидрогеназы не увеличивала устойчивость данного теплолюбивого растения к низким положительным и небольшим отрицательным температурам.

REFERENCES

1. Michalecka A.M., Svensson A.S., Johansson F.I., Agius S.C., Johanson U., Brennicke A., et al. Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light. *Plant Physiology*. 2003;133(2):642-652. DOI: 10.1104/pp.103.024208.
2. Elhafez D., Murcha M.W., Clifton R., Soole K.L., Day D.A., Whelan J. Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in Arabidopsis: intraorganelle location and expression. *Plant and Cell Physiology*. 2006;47(1):43-54. DOI: 10.1093/pcp/pci221.
3. Møller I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 2001;52(1):561-591. DOI: 10.1146/annurev.arplant.52.1.561.
4. Sweetman C., Waterman C.D., Rainbird B.M., Smith P.M.C., Jenkins C.D., Day D.A., et al. *AtNDB₂* is the main external NADH dehydrogenase in mitochondria and is important for tolerance to environmental stress. *Plant Physiology*. 2019;181(2):774-788. DOI: 10.1104/pp.19.00877.
5. Yerlikaya B.A., Ates D., Abudureyimu B., Aksoy E. Effect of climate change on abiotic stress response gene networks in *Arabidopsis thaliana*. In: Prakash C.S., Fiaz S., Fahad S. (eds). *Principles and practices of OMICS and genome editing for crop improvement*. Cham: Springer; 2022, p. 149-172.
6. Stupnikova I., Benamar A., Tolleter D., Grelet J., Borovskii G., Dorne A.J., Macherel D. Pea seed mitochondria are endowed with a remarkable tolerance to extreme physiological temperatures. *Plant Physiology*. 2006;140(1):326-335. DOI: 10.1104/pp.105.073015.
7. Jethva J., Lichtenauer S., Schmidt-Schippers R., Steffen-Heins A., Poschet G., Wirtz M., et al. Mitochondrial alternative NADH dehydrogenases NDA1 and NDA2 promote survival of reoxygenation stress in Arabidopsis by safeguarding photosynthesis and limiting ROS generation. *New Phytologist*. 2023;238(1):96-112. DOI: 10.1111/nph.18657.
8. Alizadeh R., Kumleh H.H., Rezadoost M.H. The simultaneous activity of cytosolic and mitochondrial antioxidant mechanisms in neutralizing the effect of drought stress in soybean. *Plant Physiology Reports*. 2023;28(1):78-91. DOI: 10.1007/s40502-022-00704-6.
9. Borovskii G.B., Korotaeva N.E., Katyshev A.I., Fedoseeva I.V., Fedyeva A.V., Kondakova M.A., et al. The overexpression of the Arabidopsis *NDB2* gene in tobacco plants affects the expression of genes encoding the alternative mitochondrial electron transport pathways and stress proteins. In: *Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology: abstracts of the 6th International scientific conference*. 14–18 June 2021, Novosibirsk. Novosibirsk; 2021, p. 42.
10. Korotaeva N.E., Shigarova A.M., Katyshev A.I., Fedoseeva I.V., Fedyeva A.V., Sauchyn D.V., et al. Effect of expression of the *NDB2* heterologous gene of *Arabidopsis thaliana* on growth and respiratory activity of *Nicotiana tabacum*. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2023;70:93. DOI: 10.1134/S1021443723600885.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
12. Hameed M.W., Juszcak I., Bock R., van Dongen J.T. Comparison of mitochondrial gene expression and polysome loading in different tobacco tissues. *Plant Methods*. 2017;13:112. DOI: 10.1186/s13007-017-0257-4.
13. Gabelnykh O.I., Yakovenko K.V., Polyakova E.A., Korsukova A.V., Stepanov A.V., Fedotova O.A., et al. Functioning of mitochondria in transgenic potato tubers with the *gox* gene for glucose oxidase from *Penicillium funiculosum* during different storage periods. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2022;69:112. DOI: 10.1134/S1021443722060097.
14. Garmash E.V., Velegzhaninov I.O., Ermolina K.V., Rybak A.V., Malyshev R.V. Altered levels of *AOX1a* expression result in changes in metabolic pathways in *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation. *Plant Science*. 2020;291:110332. DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.110332.
15. Clifton R., Lister R., Parker K.L., Sappl P.G., Elhafez D., Millar A.H., et al. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 2005;58:193-212. DOI: 10.1007/s11103-005-5514-7.
16. Yoshida K., Noguchi K. Differential gene expression profiles of the mitochondrial respiratory components in illuminated Arabidopsis leaves. *Plant and Cell Physiology*. 2009;50(8):1449-1462. DOI: 10.1093/pcp/pcp090.
17. Smith C., Barthet M., Melino V., Smith P., Day D., Soole K. Alterations in the mitochondrial alternative NAD(P) H dehydrogenase *NDB4* lead to changes in mitochondrial

electron transport chain composition, plant growth and response to oxidative stress. *Plant and Cell Physiology*. 2011;52(7):1222-1237. DOI: 10.1093/pcp/pcr073.

18. Sweetman C., Waterman C.D., Wong D.C.J., Day D.A., Jenkins C.L.D., Soole K.L. Altering the balance between AOX1A and NDB2 expression affects a common set of transcripts in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*. 2022;13:876843. DOI: 10.3389/fpls.2022.876843.

19. Wanniarachchi V.R., Dametto L., Sweetman C., Shavrukov Y., Day D.A., Jenkins C.L.D., et al. Alternative

respiratory pathway component genes (AOX and ND) in rice and barley and their response to stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(3):915. DOI: 10.3390/ijms19030915.

20. Liu Y.J., Norberg F.E.B., Szilágyi A., De Paepe R., Åkerlund H.-E., Rasmusson A.G. The mitochondrial external NADPH dehydrogenase modulates the leaf NADPH/NADP⁺ ratio in transgenic *Nicotiana glauca*. *Plant and Cell Physiology*. 2008;49(2):251-263. DOI: 10.1093/pcp/pcn001.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Боровский Геннадий Борисович,

д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе, Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, Российская Федерация, borovskii@sifibr.irk.ru <https://orcid.org/0000-0002-5089-5311>

Горбылева Елена Леонидовна,

к.б.н., младший научный сотрудник, Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, Российская Федерация, dzubina@sifibr.irk.ru <https://orcid.org/0000-0002-6858-380X>

Катышев Александр Игоревич,

к.б.н., старший научный сотрудник, Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, Российская Федерация, byacky78@mail.ru <https://orcid.org/0000-0001-7856-0460>

Коротаева Наталья Евгеньевна,

к.б.н., старший научный сотрудник, Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, Российская Федерация, korotaeva73@sifibr.irk.ru <https://orcid.org/0000-0003-4236-389X>

Полякова Елизавета Алексеевна,

аспирант, ведущий инженер, Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, Российская Федерация, polyackova.elizaveta727@yandex.ru <https://orcid.org/0000-0002-4830-5888>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Gennadii B. Borovskii,

Dr. Sci. (Biology), Professor, Vice-director, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, 132, Lermontov St., Irkutsk, 664033, Russian Federation, borovskii@sifibr.irk.ru <https://orcid.org/0000-0002-5089-5311>

Elena L. Gorbyleva,

Cand. Sci. (Biology), Researcher, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, 132, Lermontov St., Irkutsk, 664033, Russian Federation, dzubina@sifibr.irk.ru <https://orcid.org/0000-0002-6858-380X>

Alexander I. Katyshev,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, 132, Lermontov St., Irkutsk, 664033, Russian Federation, byacky78@mail.ru <https://orcid.org/0000-0001-7856-0460>

Natalia E. Korotaeva,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, 132, Lermontov St., Irkutsk, 664033, Russian Federation, korotaeva73@sifibr.irk.ru <https://orcid.org/0000-0003-4236-389X>

Elizaveta A. Polyakova,

Postgraduate Student, Lead Engineer, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, 132, Lermontov St., Irkutsk, 664033, Russian Federation, polyackova.elizaveta727@yandex.ru <https://orcid.org/0000-0002-4830-5888>

Пятрикас Дарья Валерьевна,
к.б.н., научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
galdasova@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0009-0001-0444-0447>

Федосеева Ирина Владимировна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
✉ fedoseeva.irina2009@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6529-9304>

Шигарова Анастасия Михайловна,
к.б.н., научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
anas_shig@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0000-8502-4826>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 08.09.2023.
Одобрена после рецензирования 13.10.2023.
Принята к публикации 31.10.2023.

Darya V. Pyatrikas,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
galdasova@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0009-0001-0444-0447>

Irina V. Fedoseeva,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ fedoseeva.irina2009@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6529-9304>

Anastasiya M. Shigarova,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
anas_shig@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0000-8502-4826>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

Information about the article

The article was submitted 08.09.2023.
Approved after reviewing 13.10.2023.
Accepted for publication 31.10.2023.

Научная статья
УДК 57.044:579.26:504.05:631.46
EDN: LUBZKE
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-523-531



Реакция микробного сообщества ризосферы растений-фиторемедиантов на нефтяное загрязнение и применение биопрепаратов

А.С. Григориади*✉, Н.В. Зобкова**, Ю.М. Сотникова*,
А.А. Ямалеева*, Р.Г. Фархутдинов*

*Уфимский университет науки и технологий, г. Уфа, Российская Федерация

**Оренбургский государственный медицинский университет, г. Оренбург, Российская Федерация

Аннотация. Целью представленного исследования являлась оценка микробиологической активности ризосферы растений, произрастающих в условиях нефтяного загрязнения и в присутствии биопрепаратов разного спектра действия. В качестве растений-фиторемедиантов были выбраны подсолнечник однолетний (*Helianthus annuus* L.) и житняк гребневидный (*Agropyron cristatum* L.). Для обработки почвы использовали углеводородокисляющий препарат «Ленойл» и два препарата неспецифического действия, оказывающие ростстимулирующее влияние: «Елена» и «Азолен». Для проведения биоремедиации с использованием растений была выбрана концентрация поллютанта в почве 4%. В результате исследования было показано, что в ризосфере растений под влиянием загрязнения незначительно увеличивалось общее микробное число и количество микроскопических грибов, но снижалась численность аминоавтотрофов и целлюлозолитиков. Внесение в почву неспецифических биопрепаратов активировало развитие микроорганизмов-деструкторов, несмотря на то, что микроорганизмы в составе препаратов не предназначены для детоксикации и очистки почвы. Под влиянием биопрепаратов в ризосфере растений подсолнечника и житняка отмечалось увеличение или стабилизация микробиологической активности, что может свидетельствовать об их положительном влиянии на микробиологические процессы, протекающие в почве, находящейся в условиях загрязнения. В целом в ризосфере растений *Agropyron cristatum* L. складывалась более благоприятная среда для развития таких групп бактерий, как аминоавтотрофы, целлюлозолитики, микромицеты и углеводородокисляющие бактерии. Среди изученных вариантов обработки почвы биопрепаратами для фиторемедиационных мероприятий предпочтительным является совмещение внесения в нефтезагрязненную почву биопрепарата «Ленойл» и посадки растений-фиторемедиантов.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение, фиторемедиация, *Helianthus annuus* L., *Agropyron cristatum* L., микробные препараты, ризосферная микробиота

Благодарности. В работе использовались биопрепараты, предоставленные ЗАО НПП «Биомедхим» (<http://bmch.su>).

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке проекта Российского научного фонда № 23-24-00358 (<https://rscf.ru/project/23-24-00358/>).

Для цитирования: Григориади А.С., Зобкова Н.В., Сотникова Ю.М., Ямалеева А.А., Фархутдинов Р.Г. Реакция микробного сообщества ризосферы растений-фиторемедиантов на нефтяное загрязнение и применение биопрепаратов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 523–531. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-523-531. EDN: LUBZKE.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Response of the rhizosphere microbial community of phytoremediation plants to oil pollution and the application of biopreparations

Anna S. Grigoriadi*✉, Natalia V. Zobkova**, Yuliya M. Sotnikova*,
Anna A. Yamaleeva*, Rashit G. Farkhutdinov*

*Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russian Federation

**Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

© Григориади А.С., Зобкова Н.В., Сотникова Ю.М., Ямалеева А.А., Фархутдинов Р.Г., 2023

Abstract. The present study aims to evaluate microbiological activity in the rhizosphere of plants growing under oil pollution conditions and in the presence of biopreparations having a different spectrum of action. Common sunflower (*Helianthus annuus* L.) and crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.) were selected as phytoremediation plants. The soil was treated with the hydrocarbon-oxidizing preparation "Lenoil" and two preparations of nonspecific action having a growth-stimulating effect: "Elena" and "Azolen". A soil pollutant concentration of 4% was selected for conducting plant-based bioremediation. The study showed a slight increase in the total microbial count and the microscopic fungi count in the rhizosphere of plants due to pollution, while indicating a decrease in the count of amino-autotrophs and cellulolytics. The introduction of non-specific biopreparations into the soil promoted the growth of destructive microorganisms despite the fact that microorganisms in the preparations are not designed for soil detoxification and decontamination. Under the effect of biopreparations, the rhizosphere of sunflower and wheatgrass plants exhibited an increase or stabilization of microbiological activity, which may indicate their positive effect on microbiological processes occurring in contaminated soil. The rhizosphere of *Agropyron cristatum* L. plants generally provided a more favorable environment for the development of such groups of bacteria as amino-autotrophs, cellulolytics, micromycetes, and hydrocarbon-oxidizing bacteria. Of the studied variants of soil treatment with biopreparations for phytoremediation purposes, it is recommended to combine the application of the "Lenoil" biopreparation and the planting of phytoremediation plants in oil-contaminated soil.

Keywords: oil pollution, phytoremediation, *Helianthus annuus* L., *Agropyron cristatum* L., microbial preparations, rhizosphere microbiota

Acknowledgements. CJSC RPE "Biomedkhim" (<http://bmch.su/>) kindly provided with biological preparations for the study.

Funding. The Russian Science Foundation, (project no. 23-24-00358, <https://rscf.ru/project/23-24-00358/>) supported the study.

For citation: Grigoriadi A.S., Zobkova N.V., Sotnikova Yu.M., Yamaleeva A.A., Farkhutdinov R.G. Response of the rhizosphere microbial community of phytoremediation plants to oil pollution and the application of biopreparations. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):523-531. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-523-531. EDN: LUBZKE.

ВВЕДЕНИЕ

Нефть и продукты ее переработки являются частой причиной загрязнения почвы и, как следствие, нарушения структуры микробиомов и фитоценозов [1–3]. Это приводит к изъятию из оборота загрязненных земель, реабилитировать которые крайне сложно. Разработка эффективных методов борьбы с данным типом поллютантов является перспективным направлением экологической биотехнологии. К биообъектам, применяемым в технологиях рекультивации почв, относятся микроорганизмы, в первую очередь углеводородоксиляющие, и растения-фиторемедианты [4–6]. Бактерии имеют способность утилизировать нефтяные углеводороды за счет активации ферментных систем и являются ведущим звеном в процессе детоксикации ксенобиотиков. Роль растений в очистке почвы от нефтяного загрязнения значительно сложнее. Они способны аккумулировать, экстрагировать, стабилизировать поллютанты, ко всему прочему, в их прикорневой зоне создаются условия, в которых активно происходит размножение и рост микроорганизмов, участвующих в деструкции углеводородов [7–10]. Для усиления эффективности мероприятий по очистке и восстановлению плодородия почвы перспективно использовать комплексные методы, включающие как биопрепараты, так и растения-фиторемедианты. Однако, так или иначе, ключевым объектом в процессе рекультивации остаются микроорганизмы. В связи с этим целью представленного исследования являлась оценка микробиологической активности ризосферы растений, произрастающих в условиях нефтяного загрязнения и в присутствии биопрепаратов разного спектра действия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве растений-фиторемедиантов нами были выбраны подсолнечник однолетний (*Helianthus annuus* L.) и житняк гребневидный (*Agropyron cristatum* L.). Подсолнечнику предпочтение было отдано из-за его способности аккумулировать загрязнители [11]. В свою очередь житняк, обладая мочковатой корневой системой, образует дерновину [12], что увеличивает площадь, благоприятную для развития микроорганизмов.

Для постановки опыта использовали чернозем южный Оренбургской области. По 400 г почвы помещали в вегетационные сосуды объемом 0,5 л с дренажом, загрязняли товарной нефтью в концентрации 4%. Повторность опыта была трехкратной. Спустя 30 суток, исходя из рекомендаций производителя, вносили биопрепараты из расчета 0,3 мл на 100 г почвы и производили посев заранее простерилизованных в хлорсодержащем растворе семян растений-фиторемедиантов в количестве 3–5 шт. в каждый сосуд. Далее сосуды помещали на световую площадку при 12-часовом световом дне и температуре 22–25 °С. Полив растений осуществляли через день. Для дальнейших исследований использовали 30-суточные растения. В качестве контроля использовали растения, выращенные на незагрязненной почве.

Для обработки почвы применялись микробные препараты разнонаправленного действия. В качестве активного агента деструкции нефтяных углеводородов использовали препарат «Ленойл», в состав которого входят бактерии *Pseudomonas turukhanskensis* ИБ 1.1 (титр не менее 1×10^8 КОЕ/г). Препарат «Азолен», созданный на основе бактерий *Azotobacter vinelandii* ИБ (титр $(4-8) \times 10^9$ КОЕ/мл), представляет собой биоудобрение, обогащающее почву биогенным азотом, и обладает

фунгицидным и ростостимулирующим действием. Препарат «Елена», состоящий из *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 (титр $(2-3) \times 10^9$ КОЕ/мл), предназначен для оздоровления и восстановления плодородия земли и для защиты растений от инфекций. Выбор данных препаратов обусловлен тем, что один из них представляет собой активные углеводородокисляющие бактерии [13], второй может способствовать нормализации баланса между азотом и углеродом, который всегда нарушен в случае нефтяного загрязнения¹, третий же способен защитить растения-фиторемедианты от влияния фитопатогенных грибов, являющихся характерными представителями нарушенной почвы [14].

Почвенные образцы ризосферы получали путем встряхивания прилипших частиц с корней растений и далее счищали стерильным скальпелем с соблюдением условий стерильности². Для определения микробиологической активности почвы использовали показатели численности микроорганизмов разных эколого-физиологических групп. Культивирование гетеротрофных бактерий, микроорганизмов, использующих минеральные формы азота (аминоавтотрофов), целлюлозолитических микроорганизмов, микроскопических грибов и углеводородокисляющих микроорганизмов проводили на следующих питательных средах: мясо-пептонный агар, крахмал-аммиачный агар, среда Гетчинсона, Чапека и Диановой – Ворошиловой соответственно³.

Обработку результатов и построение диаграмм проводили с помощью лицензированного пакета программ Excel (MS Office 2010). Рассчитывали среднее арифметическое, ошибку средней арифметической, доверительный интервал.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предварительно нами проводилось исследование уровня фитотоксичности почв с разным уровнем загрязнения в отношении выбранных растений для выявления оптимальной концентрации нефти, которая не будет значительно подавлять ростовые процессы и в которой растения будут способны выполнять функции фиторемедиантов. Исходная всхожесть семян житняка гребневидного была хуже, чем всхожесть семян подсолнечника, и составляла 46%. С увеличением концентрации нефти для обоих растений показатель снижался (рис. 1). Начиная с уровня загрязнения 6% всхожесть

снижалась на 35% и более. Также была оценена всхожесть семян подсолнечника под влиянием биопрепаратов. В результате было выявлено, что препараты «Ленойл» (всхожесть 65%) и «Елена» (всхожесть 57%) не оказали значительного влияния на прорастание семян по сравнению с вариантом опыта, в котором использовалась водопроводная вода (всхожесть 67%). Обработка препаратом «Азолен» стимулировала прорастание семян до уровня 95%.

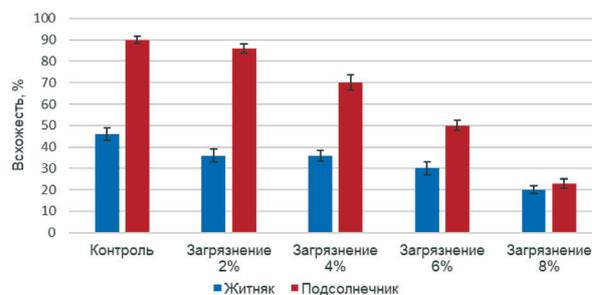


Рис. 1. Всхожесть семян растений-фиторемедиантов под влиянием разных концентраций нефти в почве

Fig. 1. Germination of seeds of phytoremediant plants under the influence of different oil concentrations for soil pollution

Дополнительно была проведена морфометрическая оценка проростков растений подсолнечника в условиях загрязнения почвы нефтью в разных концентрациях (табл. 1). Нефтяные углеводороды оказывали на растение токсическое действие, что выразилось в снижении длины как подземной, так и надземной части. Однако снижение параметров было неравномерным. В вариантах опыта с 4 и 6%-м загрязнением морфометрические показатели не сильно отличались друг от друга, в частности при увеличении концентрации нефти длина корня снижалась на 31 и 37%. В связи с этим однозначно выделить уровень загрязнения, с которого начинается интенсивное влияние поллютанта, не удалось. Умеренное изменение длины проростков при достаточно высокой степени загрязнения не было связано с улучшением состояния растений: это явление, скорее, вызвано тем, что некоторые компоненты нефти по своей химической структуре напоминают стимуляторы роста растений [15–17]. Также следует отметить обратную зависимость массы проростков от концентрации поллютанта в почве (см. табл. 1).

Таблица 1. Морфометрические параметры растений *Helianthus annuus* L. под влиянием разных концентраций нефти в почве

Table 1. Morphometric parameters of *Helianthus annuus* L. plants under the influence of different oil concentrations in the soil

Показатель	Контроль	Концентрация нефти, %			
		2	4	6	8
Длина корня, мм	58,10±3,80	40,50±4,25	36,90±1,80	29,40±1,90	17,40±1,70
Длина стебля, мм	28,10±2,45	20,50±2,10	18,80±1,90	16,80±1,50	13,80±1,25
Масса проростка, г	1,54±0,11	1,83±0,15	1,32±0,07	1,24±0,07	0,80±0,04

¹Биккинина А.Г. Разработка технологии рекультивации нефтезагрязненных объектов с использованием комплекса микробиологических препаратов: дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.23. Уфа, 2007. 113 с.

²Асеева И.В., Бабьева И.П., Бызов Б.А., Гузев В.С., Добровольская Т.Г., Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии: учеб. пособие. М.: Изд-во МГУ, 1991. 304 с.

³Практикум по микробиологии / под ред. А.И. Нетрусова: учеб. пособие. М.: ИЦ «Академия», 2005. 608 с.

Таким образом, для проведения дальнейшей биоремедиации с использованием растений была определена концентрация нефти в 4%. Аналогичные данные неоднократно были получены нами, а также другими исследователями [18, 19].

Использование микробных препаратов для рекультивации нефтезагрязненной почвы, безусловно, влияет на количественный состав аборигенной микробиоты, в том числе в ризосфере растений-фиторемедиантов. Наиболее общими показателями, характеризующими почвенный микробоценоз, являются значение общего микробного числа (ОМЧ) и численность аминокислототрофов. Показатель ОМЧ соответствует численности гетеротрофных бактерий, выросших на питательной среде общего назначения. Нефтезагрязнение не оказало значительного влияния на количество гетеротрофных микроорганизмов в ризосфере подсолнечника и привело к стимуляции развития данной группы на 44% в прикорневой зоне житняка (рис. 2). После внесения препарата «Ленойл» ОМЧ в загрязненной почве по сравнению с загрязненными образцами ризосферы подсолнечника не изменилось, в почвенных же образцах житняка отмечалось незначительное снижение указанного параметра, что может быть отнесено к погрешностям отбора проб. Рядом авторов уже отмечалось подобное явление роста числа гетеротрофных бактерий, и объяснялось оно тем, что углеводороды нефти могут использоваться в качестве источника углерода [20, 21]. Использование препаратов «Елена» и «Азолен» привело к незначительной стимуляции роста гетеротрофных микроорганизмов в ризосфере житняка, показатель ОМЧ вырос по сравнению с контролем на 48 и 30% соответственно. Однако в случае подсолнечника влияние рекультивирующих биоагентов не оказало стимулирующего влияния на показатель ОМЧ. Наблюдаемый рост численности гетеротрофных бактерий может быть связан с тем, что для некоторых видов почвенных бактерий в ризосфере житняка за счет корневых выделений создается благоприятная среда как в условиях загрязнения, так и в присутствии биопрепаратов.

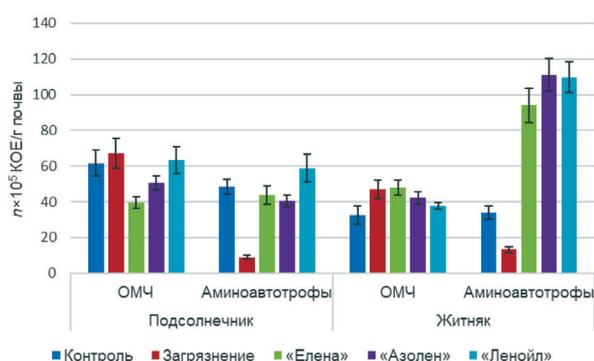


Рис. 2. Численность гетеротрофных микроорганизмов и аминокислототрофов в ризосфере растений в условиях загрязнения и рекультивации

Fig. 2. The number of heterotrophic microorganisms and aminoautotrophs in the rhizosphere of plants under the influence of pollution and bioremediation

При изучении изменения численности аминокислототрофов было выявлено значительное ингибирующее влияние на них нефти (см. рис. 2). Показатель снизился

в 2,5 и 5 раз в ризосфере житняка и подсолнечника соответственно, что может быть связано с общим обеднением нефтезагрязненной почвы азотом [22]. В прикорневой зоне подсолнечника численность микроорганизмов, использующих минеральные формы азота, под влиянием биопрепаратов восстановилась до контрольных значений. В ризосфере житняка численность аминокислототрофов под влиянием препаратов «Елена», «Азолен» и «Ленойл» выросла в 8 раз (см. рис. 2). Наличие доступных минеральных форм азота способствует развитию аминокислототрофов, что подтверждает положительное влияние житняка на азотный баланс в почве [23], а также свидетельствует о восстановлении нарушенного равновесия между содержанием углерода и азота, характерного для нефтезагрязненных почв [22, 24]. Также следует отметить дисбаланс в соотношениях численности гетеротрофов и микроорганизмов, использующих минеральные формы азота, в ризосфере житняка. Показатель соотношения численности бактерий на соответствующих питательных средах (крахмал-амиачный агар / мясо-пептонный агар) характеризуется как коэффициент минерализации [25]. Увеличение численности аминокислототрофов приводит к росту данного коэффициента, что свидетельствует об интенсивности процессов минерализации, которая в числе прочего может затрагивать компоненты нефти. Таким образом, обработка биопрепаратами в значительной степени стимулировала развитие микроорганизмов, использующих минеральные формы азота, в ризосфере всех исследуемых растений-фиторемедиантов, что может свидетельствовать об изменении нарушенного азотного баланса в почве. Различий же во влиянии препаратов отмечено не было.

В составе прикорневой микробиоты к постоянно присутствующим микроорганизмам относятся представители микроскопических грибов (микромикеты) и целлюлозолитиков. Из данных, представленных в табл. 2, видно, что численность целлюлозолитиков снизилась под влиянием загрязнения нефти в ризосфере подсолнечника и житняка в 10 и 6 раз соответственно. Указанная группа микроорганизмов является высокочувствительной к действию поллютанта, что было показано уже неоднократно [5, 26]. Обработка препаратом «Ленойл» благоприятно повлияла на показатель численности целлюлозолитиков в прикорневой зоне житняка, однако токсическое действие полностью не ликвидировалось и восстановление до контрольных значений не произошло. Из всех препаратов в опытах с растениями подсолнечника на численность целлюлозоразрушающих микроорганизмов наиболее благоприятное влияние оказал препарат «Елена». Тем не менее и в данном варианте опыта показатель был в 2 раза ниже контрольных значений.

Микроскопические грибы способны активно развиваться в нарушенных почвах [27, 28], что подтвердилось результатами проведенного опыта. В присутствии нефти в почве численность микромикетов выросла в 2,3 раза в ризосфере подсолнечника и на 87% в ризосфере житняка. Обработка биопрепаратами привела к снижению данного показателя в прикорневой зоне подсолнечника (см. табл. 2), что свидетельствует о нормализации соотношения бактерий и грибов в микробиоме почвы. Внесение препарата «Азолен» перед посевом житняка

Таблица 2. Численность некоторых эколого-физиологических групп микроорганизмов в ризосфере растений в условиях загрязнения и рекультивации

Table 2. The number of some ecologo-physiological groups of microorganisms in the rhizosphere of plants under the influence of pollution and bioremediation

Показатель	Углеродородокисляющие микроорганизмы, $n \times 10^3$ КОЕ/г почвы		Микромицеты, $n \times 10^2$ пропагул/г почвы		Целлюлозолитики, $n \times 10^2$ КОЕ/г почвы	
	<i>Helianthus annuus</i> L.	<i>Agropyron cristatum</i> L.	<i>Helianthus annuus</i> L.	<i>Agropyron cristatum</i> L.	<i>Helianthus annuus</i> L.	<i>Agropyron cristatum</i> L.
Контроль	1,10±0,04	0,53±0,02	12,00±1,61	19,30±2,46	28,20±1,91	58,90±4,10
Загрязнение	7,50±0,22	11,00±0,44	27,70±2,23	35,70±3,35	2,70±0,30	9,30±0,51
«Елена»	40,00±2,10	10,30±0,51	11,10±2,12	29,50±3,42	15,60±1,97	15,90±2,47
«Азолен»	11,50±0,81	18,00±1,62	9,30±1,34	37,30±2,74	12,20±1,82	31,30±2,69
«Ленойл»	140,00±11,20	132,40±7,90	4,80±0,34	30,40±3,25	8,80±0,79	40,70±3,25

не повлияло на численность микроскопических грибов. Препарат «Елена» оказал благоприятное воздействие на данный показатель, снизив этот параметр на 17% по сравнению с образцами загрязненной почвы. Однако желаемого биофунгицидного действия от данного препарата получено не было.

К специфической группе микроорганизмов, развивающихся в смоделированных условиях, относятся углеродородокисляющие бактерии. Они присутствуют в почве естественным образом, однако внесение питательного субстрата в виде нефтяных углеводородов приводит к росту их численности [4, 5, 29]. Аналогичные выводы были получены нами при анализе данной группы микроорганизмов в ризосфере растений-фиторемедиантов (см. табл. 2). Внесение в почву товарной нефти привело к увеличению показателя в 7 и 21 раз в ризосфере подсолнечника и житняка соответственно. Значительного роста углеродородокисляющих микроорганизмов после применения неспецифического биопрепарата «Азолен» отмечено не было. В образцах, обработанных препаратом «Ленойл», зарегистрированы максимальные значения численности данной группы микроорганизмов. Достоверной разницы между показателями в прикорневой зоне подсолнечника и житняка не выявлено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате предварительных исследований фитотоксичности различных концентраций нефти в отношении изучаемых растений было определено,

что для проведения фиторемедиации содержание поллютанта может составлять 4% от массы почвы без существенного негативного влияния на растения.

В результате оценки численности разных групп микроорганизмов в ризосфере растений *Helianthus annuus* L. и *Agropyron cristatum* L. отмечалось увеличение или стабилизация микробиологической активности при обработке нефтезагрязненной почвы всеми исследуемыми биопрепаратами, что может свидетельствовать об их положительном влиянии на микробиологические процессы, протекающие в почве, находящейся в условиях загрязнения. В целом в ризосфере растений *Agropyron cristatum* L. складывалась более благоприятная среда для развития таких групп бактерий, как аминокислототрофы, целлюлозолитики, микромицеты и углеродородокисляющие бактерии. Это может быть связано со спецификой как самой корневой системы растения, так и прикорневых выделений, характерных для растений семейства Злаки.

Из представленных вариантов обработки почвы для ее восстановления и очищения от нефтяного загрязнения наиболее предпочтительным оказалось совмещение внесения в загрязненную почву биопрепарата «Ленойл» и выращивания растений-фиторемедиантов. В данном случае происходило усиление потенциала предложенного способа рекультивации в результате внесения углеродородокисляющих микроорганизмов в виде биопрепарата, а также вследствие растительно-микробного взаимодействия, которое вносит большой вклад в процессы детоксикации поллютантов [6, 9, 21].

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Мелехина Е.Н., Канев В.А., Маркарова М.Ю., Надежкин С.М., Новаковский А.Б., Таскаева А.А. [и др.]. Оценка состояния загрязненных нефтью экосистем Европейской Субарктики: мультидисциплинарный подход // Теоретическая и прикладная экология. 2020. N 2. С. 123–129. DOI: 10.25750/1995-4301-2020-2-123-129. EDN: WWQBYT.
2. Рябухина М.В., Филиппова А.В., Рябинина З.Н. Фитомониторинг районов сбора нефти и газа со скважин Романовского месторождения Оренбургской области // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2015. N 6. С. 202–204. EDN: VDOOVV.

3. Shi L., Liu Z., Yang L., Fan W. Effects of oil pollution on soil microbial diversity in the Loess hilly areas, China // Annals of Microbiology. 2022. Vol. 72. P. 26. DOI: 10.1186/s13213-022-01683-7.
4. Логинов О.Н., Силищев Н.Н., Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф. Биорекультивация: микробиологические технологии очистки нефтезагрязненных почв и техногенных отходов. М.: Наука, 2009. 111 с. EDN: QLAIWR.
5. Коршунова Т.Ю., Четвериков С.П., Бакаева М.Д., Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф., Четверикова Д.В. [и др.]. Микроорганизмы в ликвидации последствий нефтяного загрязнения (обзор) // Прикладная биохимия

и микробиология. 2019. Т. 55. N 4. С. 338–349. DOI: 10.1134/S0555109919040093. EDN: HNVQRU.

6. Wang A., Fu W., Feng Y., Liu Z., Song D. Synergetic effects of microbial-phytoremediation reshape microbial communities and improve degradation of petroleum contaminants // *Journal of Hazardous Materials*. 2022. Vol. 429. P. 128396. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.128396.

7. Merkl N., Schultze-Kraft R., Infante C. Phytoremediation in the tropics – influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids // *Environmental Pollution*. 2005. Vol. 138, no. 1. P. 86–91. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.02.023.

8. Kechavarzi C., Pettersson K., Leeds-Harrison P., Ritchie L., Ledin S. Root establishment of perennial ryegrass (*L. perenne*) in diesel contaminated surface soil layers // *Environmental Pollution*. 2007. Vol. 145, no. 1. P. 68–74. DOI: 10.1016/j.envpol.2006.03.039.

9. Турковская О.В., Позднякова Н.Н., Муратова А.Ю., Дубровская Е.В., Голубев С.Н. Деградационный потенциал растений и микроорганизмов в отношении полициклических ароматических углеводородов // *Биомика*. 2018. Т. 10. N 2. С. 193–201. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-27. EDN: XVBOHZ.

10. Kafle A., Timilsina A., Gautam A., Adhikari K., Bhattarai A., Aryal N. Phytoremediation: mechanisms, plant selection and enhancement by natural and synthetic agents // *Environmental Advances*. 2022. Vol. 8. P. 100203. DOI: 10.1016/j.envadv.2022.100203.

11. Киреева Н.А., Григориади А.С., Багаутдинов Ф.Я. Фиторемедиация как способ очищения почв, загрязненных тяжелыми металлами // *Теоретическая и прикладная экология*. 2011. N 3. С. 4–10. EDN: OOFKOH.

12. Деревянникова М.В. Изучение коллекции житняка гребневидного (*Agropyron pectiniforme*) по зимостойкости и энергии весеннего отрастания травостоя в условиях Ставропольского края // *Сельскохозяйственный журнал*. 2020. N 5. С. 30–36. DOI: 10.25930/2687-1254/005.5.13.2020. EDN: XKDIKJ.

13. Коршунова Т.Ю., Логинов О.Н. Токсикологическая оценка биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»® – NORD, СХП // *Токсикологический вестник*. 2017. N 3. С. 58–60. DOI: 10.36946/0869-7922-2017-3-58-60. EDN: ZAGZJT.

14. Киреева Н.А., Рафикова Г.Ф., Галимзянова Н.Ф., Логинов О.Н., Григориади А.С., Якупова А.Б. Влияние биофунгицида Елена на комплексы микромицетов нефтезагрязненных почв различных типов при биоремедиации // *Микология и фитопатология*. 2010. Т. 44. N 1. С. 53–62. EDN: OIYKXZ.

15. Угрехелидзе Д.Ш., Дурмишидзе С.В. Поступление и детоксикация органических ксенобиотиков в растениях. Тбилиси: Мецниереба, 1984. 230 с.

16. Талайбекова Г.Т., Кожобаев К.А., Токпаева Ж.К., Эсенжанова Г.К., Тотубаева Н.Э. Фитотестирование нефтезагрязненных почв с помощью фитотолерантных растений // *Проблемы региональной экологии*. 2019. N 2. С. 20–24. DOI: 10.24411/1728-323X-2019-12020. EDN: MVBVAX.

17. Da Silva Correa H., Maranho L.T. The potential association of *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. with bacterial consortium for petroleum degradation in contaminated soil // *SN Applied Sciences*. 2021. Vol. 3. P. 80. DOI: 10.1007/s42452-020-04070-6.

18. Athar H.-R., Ambreen S., Javed M., Hina M., Rasul S., Zafar Z.U., et al. Influence of sub-lethal crude oil concentration on growth, water relations and photosynthetic capacity of maize (*Zea mays* L.) plants // *Environmental Science and Pollution Research*. 2016. Vol. 23. P. 18320–18331. DOI: 10.1007/s11356-016-6976-7.

19. Сотникова Ю.М., Григориади А.С., Федяев В.В., Гарипова М.И., Фархутдинов Р.Г. Оценка влияния биопрепаратов на морфометрические и физиологические показатели растений-ремедиантов в условиях нефтяного загрязнения почв // *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки*. 2022. N 1. С. 51–63. DOI: 10.21685/2307-9150-2022-1-5. EDN: QYJLLE.

20. Kitamura R.S.A., Maranho L.T. Phytoremediation of petroleum hydrocarbons-contaminated soil using *Desmodium incanum* DC., Fabaceae // *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*. 2016. Vol. 7, no. 1. DOI: 10.7603/s40682-016-0001-1.

21. Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф., Столярова Е.А., Логинов О.Н. Эффективность ассоциаций растений семейства бобовых и ростстимулирующих бактерий для восстановления нефтезагрязненных почв // *Агрохимия*. 2021. N 4. С. 87–96. DOI: 10.31857/S0002188121040074. EDN: AMIIVV.

22. Пиковский Ю.И. Природные и техногенные потоки углеводов в окружающей среде. М.: Изд-во МГУ, 1993. 206 с.

23. Панасов М.Н., Денисов Е.П., Уполовников Д.А., Денисов К.Ю., Марс А.М. Житняк как эффективный фитомелиорант в сухостепном Заволжье // *Нива Поволжья*. 2008. N 3. С. 47–54. EDN: JSILIF.

24. Chaudhary D.K., Bajagain R., Jeong S.-W., Kim J. Development of a bacterial consortium comprising oil-degraders and diazotrophic bacteria for elimination of exogenous nitrogen requirement in bioremediation of diesel-contaminated soil // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019. Vol. 35. P. 99. DOI: 10.1007/s11274-019-2674-1.

25. Енкина О.В. Коробский Н.Ф. Микробиологические аспекты сохранения плодородия черноземов Кубани. Краснодар: Агропромполиграфист, 1999. 150 с.

26. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Велигонова Н.В., Патрушева Е.В., Азнаурьян Д.К., Вальков В.Ф. Изменение комплекса почвенных микроорганизмов при загрязнении чернозема обыкновенного нефтью и нефтепродуктами // *Агрохимия*. 2007. N 12. С. 44–48. EDN: IBJUID.

27. Терехова В.А. Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем. М.: Наука, 2007. 214 с.

28. Liu Q., Tang J., Liu X., Song B., Zhen M., Ashbolt N.J. Vertical response of microbial community and degrading genes to petroleum hydrocarbon contamination in saline alkaline soil // *Journal of Environmental Sciences*. 2019. Vol. 81. P. 80–92. DOI: 10.1016/j.jes.2019.02.001.

29. Wasen A.-A.A. Biodegradation and phytotoxicity of crude oil hydrocarbons in an agricultural soil // *Chilean Journal of Agricultural Research*. 2019. Vol. 79. Iss. 2. P. 266–277. DOI: 10.4067/S0718-58392019000200266.

REFERENCES

1. Melekhina E.N., Kanev V.A., Markarova M.Yu., Nazdezhkin S.M., Nowakowski A.B., Taskaeva A.A., et al. Assessment of the state of oil-polluted ecosystems of European Subarctic: a multidisciplinary approach. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya = Theoretical and Applied Ecology*. 2020;2:123-129. (In Russian). DOI: 10.25750/1995-4301-2020-2-123-129. EDN: WWQBYT.
2. Ryabukhina M.V., Filippova A.V., Ryabinina Z.N. Phytomonitoring of areas of oil-and-gas production boring wells of the Romanovsky oil field in Orenburg Region. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2015;6:202-204. (In Russian). EDN: VDOOVB.
3. Shi L., Liu Z., Yang L., Fan W. Effects of oil pollution on soil microbial diversity in the Loess hilly areas, China. *Annals of Microbiology*. 2022;72:26. DOI: 10.1186/s13213-022-01683-7.
4. Loginov O.N., Silishchev N.N., Boiko T.F., Galimzyanova N.F. *Bioremediation: microbiological technologies for cleaning oil-contaminated soils and industrial waste*. Moscow: Nauka; 2009, 111 p. (In Russian). EDN: QLAIWR.
5. Korshunova T.Y., Chetverikov S.P., Bakaeva M.D., Kuzina E.V., Rafikova G.F., Chetverikova D.V., et al. Microorganisms in the elimination of oil pollution consequences (review). *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2019;55(4):338-349. (In Russian). DOI: 10.1134/S0555109919040093. EDN: HNVQRU.
6. Wang A., Fu W., Feng Y., Liu Z., Song D. Synergetic effects of microbial-phytoremediation reshape microbial communities and improve degradation of petroleum contaminants. *Journal of Hazardous Materials*. 2022;429:128396. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.128396.
7. Merkl N., Schultze-Kraft R., Infante C. Phytoremediation in the tropics – influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of gram-inoids. *Environmental Pollution*. 2005;138(1):86-91. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.02.023.
8. Kechavarzi C., Pettersson K., Leeds-Harrison P., Ritchie L., Ledin S. Root establishment of perennial ryegrass (*L. perenne*) in diesel contaminated surface soil layers. *Environmental Pollution*. 2007;145(1):68-74. DOI: 10.1016/j.envpol.2006.03.039.
9. Turkovskaya O.V., Pozdnyakova N.N., Muratova A.Yu., Dubrovskaya E.V., Golubev S.N. Potential of plants and microorganisms to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biomika = Biomics*. 2018;10(2):193-201. (In Russian). DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-27. EDN: XVBOHZ.
10. Kafle A., Timilsina A., Gautam A., Adhikari K., Bhattarai A., Aryal N. Phytoremediation: mechanisms, plant selection and enhancement by natural and synthetic agents. *Environmental Advances*. 2022;8:100203. DOI: 10.1016/j.envadv.2022.100203.
11. Kireeva N.A., Grigoriadi A.S., Bagautdinov F.Ya. Phytoremediation as a way to purifying soils contaminated with heavy metals. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya = Theoretical and Applied Ecology*. 2011;3:4-10. (In Russian). EDN: OOFKOH.
12. Derevyannikova M.V. The study of the crested wheat grass collection (*Agropyron pectiniforme*) on winter hardness and energy of spring aftergrowing of grass in the Stavropol territory. *Sel'skokhozyaistvennyi zhurnal = Agricultural Journal*. 2020;5:30-36. (In Russian). DOI: 10.25930/2687-1254/005.5.13.2020. EDN: XKDIKJ.
13. Korshunova T.Yu., Loginov O.N. Toxicological assessment of bio preparation oildestructor «Lenoil»® – NORD, SHP. *Toksikologicheskii vestnik = Toxicological Review*. 2017;(3):58-60. (In Russian). DOI: 10.36946/0869-7922-2017-3-58-60. EDN: ZAGZJT.
14. Kireeva N.A., Rafikova G.F., Galimzyanova N.F., Loginov O.N., Grigoriadi A.S., Yakupova A.B. Influence of biofungicide Elena on micromycetes complexes of oil-polluted soils under bioremediation. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. (In Russian). 2010;44(1):53-62. EDN: OIYKXZ.
15. Ugrekhelidze D.Sh., Durmishidze S.V. *Intake and detoxification of organic xenobiotics in plants*. Tbilisi: Metsniereba; 1984, 230 p. (In Russian).
16. Talaipekova G.T., Kozhobaev K.A., Tokpaieva J.K., Esenzhanova G.K., Totubaeva N.E. Phytotesting of oil-contaminated soils using phytotolerant plants. *Problemy regional'noi ekologii = Regional Environmental Issues*. 2019;2:20-24. (In Russian). DOI: 10.24411/1728-323X-2019-12020. EDN: MVBVAX.
17. Da Silva Correa H., Maranhão L.T. The potential association of *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. with bacterial consortium for petroleum degradation in contaminated soil. *SN Applied Sciences*. 2021;3:80. DOI: 10.1007/s42452-020-04070-6.
18. Athar H.-R., Ambreen S., Javed M., Hina M., Rasul S., Zafar Z.U., et al. Influence of sub-lethal crude oil concentration on growth, water relations and photosynthetic capacity of maize (*Zea mays* L.) plants. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016;23:18320-18331. DOI: 10.1007/s11356-016-6976-7.
19. Sotnikova YU.M., Grigoriadi A.S., Fedyayev V.V., Garipova M.I., Farkhutdinov R.G. The effect's evaluation of biological products on the morphometric and physiological parameters of plants-remediants in conditions of soil oil pollution. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Povolzhskii region. Estestvennye nauki = University proceedings. Volga region. Natural sciences*. 2022;1:51-63. (In Russian). DOI: 10.21685/2307-9150-2022-1-5. EDN: QYJLLE.
20. Kitamura R.S.A., Maranhão L.T. Phytoremediation of petroleum hydrocarbons-contaminated soil using *Desmodium incanum* DC., Fabaceae. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*. 2016;7(1). DOI: 10.7603/s40682-016-0001-1.
21. Kuzina E.V., Rafikova G.F., Stolyarova E.A., Loginov O.N. Efficiency of associations of legume plants and growth-stimulating bacteria for restoration of oil-contaminated soils. *Agrokhimiya*. 2021;4:87-96. (In Russian). DOI: 10.31857/S0002188121040074. EDN: AMIIYV.
22. Pikovskii Yu.I. *Natural and technogenic flows of hydrocarbons in the environment*. Moscow: Lomonosov Moscow State University; 1993, 206 p. (In Russian).
23. Panasov M.N., Denisov E.P., Upolovnikov D.A., Denisov K.Yu., Mars A.M. Zhitnyak as an effective phytomeliorant in the dry steppe Trans-Volga. *Niva Povolzh'ya*. 2008;3:47-54. (In Russian). EDN: JSILIF.
24. Chaudhary D.K., Bajagain R., Jeong S.-W., Kim J. Development of a bacterial consortium comprising

oil-degraders and diazotrophic bacteria for elimination of exogenous nitrogen requirement in bioremediation of diesel-contaminated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019;35:99. DOI: 10.1007/s11274-019-2674-1.

25. Enkina O.V. Korobskii N.F. *Microbiological aspects of preserving the fertility of Kuban chernozem*. Krasnodar: Agroprompoligrafist; 1999, 150 p. (In Russian).

26. Kolesnikov S.I., Kazeev K.Sh., Veligonova N.V., Patrusheva E.V., Aznaur'yan D.K., Val'kov V.F. Changes in the complex of soil microorganisms in ordinary chernozem contaminated with oil and oil products. *Agrokhimiya*. 2007;12:44-48. (In Russian). EDN: IBJUID.

27. Terekhova V.A. *Micromycetes in ecological evaluation of aquatic and terrestrial ecosystems*. Moscow: Nauka; 2007, 214 p. (In Russian).

28. Liu Q., Tang J., Liu X., Song B., Zhen M., Ashbolt N.J. Vertical response of microbial community and degrading genes to petroleum hydrocarbon contamination in saline alkaline soil. *Journal of Environmental Sciences*. 2019;81:80-92. DOI: 10.1016/j.jes.2019.02.001.

29. Wasen A.-A.A. Biodegradation and phytotoxicity of crude oil hydrocarbons in an agricultural soil. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 2019;79(2):266-277. DOI: 10.4067/S0718-58392019000200266. .

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Григориади Анна Сергеевна,

к.б.н., доцент,
Уфимский университет науки и технологий,
450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32,
Российская Федерация,
✉ GrigoriadiAS@uust.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6891-1693>

Зобкова Наталья Викторовна,

старший преподаватель,
Оренбургский государственный
медицинский университет,
460014, г. Оренбург, ул. Советская, 6,
Российская Федерация,
zobkova_natali@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0003-4023-5242>

Сотникова Юлия Михайловна,

к.б.н., старший преподаватель,
Уфимский университет науки и технологий,
450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32,
Российская Федерация,
sotnikova-bashedu@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6636-9685>

Ямалеева Анна Александровна,

д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник,
Уфимский университет науки и технологий,
450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32,
Российская Федерация,
frg2@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9546-0461>

Фархутдинов Рашит Габдулхаевич,

д.б.н., профессор, профессор,
Уфимский университет науки и технологий,
450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32,
Российская Федерация,
frg2@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2541-8994>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anna S. Grigoriadi,

Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Ufa University of Science and Technology,
32, Zaki Validi St., Ufa, 450076,
Russian Federation,
✉ GrigoriadiAS@uust.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6891-1693>

Natalia V. Zobkova,

Senior Lecturer,
Orenburg State Medical University,
6, Sovetskaya St., Orenburg, 460014,
Russian Federation,
zobkova_natali@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0003-4023-5242>

Yuliya M. Sotnikova,

Cand. Sci. (Biology), Senior Lecturer,
Ufa University of Science and Technology,
32, Zaki Validi St., Ufa, 450076,
Russian Federation,
sotnikova-bashedu@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6636-9685>

Anna A. Yamaleeva,

Dr. Sci. (Biology), Professor, Leading Researcher,
Ufa University of Science and Technology,
32, Zaki Validi St., Ufa, 450076,
Russian Federation,
frg2@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9546-0461>

Rashit G. Farkhutdinov,

Dr. Sci. (Biology), Professor, Professor,
Ufa University of Science and Technology,
32, Zaki Validi St., Ufa, 450076,
Russian Federation,
frg2@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2541-8994>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 09.06.2023.
Одобрена после рецензирования 24.10.2023.
Принята к публикации 31.10.2023.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 09.06.2023.
Approved after reviewing 24.10.2023.
Accepted for publication 31.10.2023.

Научная статья
УДК 582.29:57.042:577.115
EDN: UISMLE
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-532-544



Изменение липидного состава лишайника *Peltigera canina* при действии повышенной температуры

Ю.Н. Валитова*✉, В.Р. Хабибрахманова*^{***}, О.П. Гурьянов*,
В.Л. Уваева*, А.Ф. Хайруллина*, Д.Ф. Рахматуллина*, Е.И. Галеева*,
Т.В. Трифонова*, Л.В. Викторова*, Ф.В. Минибаева*

*Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук»,
г. Казань, Российская Федерация

**Казанский национальный исследовательский технологический университет,
г. Казань, Российская Федерация

Аннотация. Организмы-экстремофилы способны выживать в экстремальных условиях посредством уникальных механизмов устойчивости. К таким организмам относятся лишайники – симбиотические ассоциации грибов и водорослей и/или цианобактерий. Высокая стрессовая устойчивость лишайников помимо прочих факторов обусловлена их способностью синтезировать широкий спектр метаболитов, в том числе разнообразные по химической структуре липидные соединения. Несмотря на очевидную важность, биохимические механизмы стрессовой устойчивости лишайников, опосредованные изменениями липидного профиля, изучены недостаточно полно. Пельтигеровые лишайники являются обособленным отделом лишайников, для которых характерны высокие темпы роста и индексы метаболической активности. Учитывая умеренный климат произрастания данных лишайников, можно предположить, что они могут обладать повышенной чувствительностью к перепадам температур. Эти факторы обусловили выбор эпигейного лишайника *Peltigera canina* в качестве объекта нашего исследования. В настоящей работе были изучены стресс-индуцированные изменения редокс-статуса лишайника *P. canina*, а также изменения его липидного состава при действии повышенной (40 °С) температуры. Воздействие неблагоприятной температуры на гидратированные талломы лишайника приводило к увеличению содержания перекиси водорода, феноксидазной активности, а также повышению уровня перекисного окисления липидов, что является важной составляющей стрессового ответа лишайника. Стресс-индуцированное изменение редокс-статуса талломов лишайника стимулировало увеличение содержания антиоксидантных агентов липофильной природы: резко возростал уровень α -токоферола, увеличивалось содержание каротиноидов, в частности β -каротина. Таким образом, накопление липофильных антиоксидантов является важной частью липид-опосредованного стрессового ответа лишайника *P. canina* на повышение температуры.

Ключевые слова: лишайник, липиды, каротиноиды, α -токоферол, окислительный стресс, температурный стресс

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук» (оценка редокс-параметров), а также при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-14-00362 (Ю.Н. Валитова, анализ липидного состава).

Для цитирования: Валитова Ю.Н., Хабибрахманова В.Р., Гурьянов О.П., Уваева В.Л., Хайруллина А.Ф., Рахматуллина Д.Ф. [и др.]. Изменение липидного состава лишайника *Peltigera canina* при действии повышенной температуры // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 532–544. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-532-544. EDN: UISMLE.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Changes in the lipid composition of *Peltigera canina* at an elevated temperature

Juliya N. Valitova*✉, Venera R. Khabibrakhmanova*^{**}, Oleg P. Guryanov*,
Veronika L. Uvaeva*, Aisylu F. Khairullina*, Daniya F. Rakhmatullina*, Ekaterina I. Galeeva*,
Tatyana V. Trifonova*, Larisa V. Viktorova*, Farida V. Minibayeva*

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Science Centre of the Russian Academy of Science,
Kazan, Russian Federation

**Kazan National Research Technological University, Kazan, Russian Federation

© Валитова Ю.Н., Хабибрахманова В.Р., Гурьянов О.П., Уваева В.Л., Хайруллина А.Ф., Рахматуллина Д.Ф., Галеева Е.И., Трифонова Т.В., Викторова Л.В., Минибаева Ф.В., 2023

Abstract. Extremophile organisms can survive under extreme conditions through tolerance mechanisms. Such organisms include lichens, which are symbiotic associations of fungi and algae and/or cyanobacteria. Among other factors, the high stress tolerance of lichens can be attributed to their ability to synthesize a wide range of metabolites, including chemically diverse lipid compounds. Despite their obvious relevance, the biochemical mechanisms of stress tolerance in lichens that are mediated by changes in the lipid profile remain understudied. Peltigerous lichens constitute a separate division of lichens characterized by high growth rates and metabolic activity indices. Taking into account the temperate climate in which these lichens grow, it can be assumed that they may be highly sensitive to temperature fluctuations. These factors led to the choice of *Peltigera canina*, epigeic lichen, as the subject matter of this study. The present work examined stress-induced changes in the redox status of *P. canina*, as well as changes in its lipid composition at an elevated temperature (40 °C). The exposure of hydrated lichen thalli to an unfavorable temperature led to an increase in the level of hydrogen peroxide, phenoloxidase activity, and lipid peroxidation, which constitutes an important part of stress response in lichen. The stress-induced changes in the redox status of lichen thalli stimulated an increase in lipophilic antioxidant agents: a dramatic increase in the level of α -tocopherol and an increase in carotenoids, specifically β -carotene. Thus, the accumulation of lipophilic antioxidants constitutes an important part of the lipid-mediated stress response of *P. canina* to temperature elevation.

Keywords: lichen, lipids, carotenoids, α -tocopherol, oxidative stress, temperature stress

Funding. This work was partially performed within the framework of the state assignment of the FRC KazSC RAS (analysis of redox parameters), and with the financial support of the Russian Science Foundation, grant no. 22-14-00362 (J.N. Valitova, analysis of lipid composition).

For citation: Valitova J.N., Khabibrakhmanova V.R., Guryanov O.P., Uvaeva V.L., Khairullina A.F., Rakhmatullina D.F., et al. Changes in the lipid composition of *Peltigera canina* at an elevated temperature. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):532-544. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-532-544. EDN: UISMLE.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема стрессовой устойчивости живых организмов является предметом пристального внимания ученых в течение многих лет. В связи с этим повышенный интерес исследователей вызывают экстремофилы – организмы, способные выживать в экстремальных условиях посредством уникальных механизмов устойчивости. К таким организмам относятся и лишайники, которые представляют собой симбиотические ассоциации между грибами (микобионтами) и водорослями и/или цианобактериями (фотобионтами). Температурный стресс является достаточно обычным явлением для лишайников, произрастающих зачастую в неблагоприятных условиях. В настоящее время известно, что большинство лишайников в высушенном состоянии чрезвычайно устойчивы к высокотемпературному стрессу, тогда как гидратированные талломы обладают значительно большей чувствительностью к изменению температуры [1, 2]. Интересной группой лишайников являются лишайники порядка Пельтигеровые, широко распространенные по всему миру и произрастающие в умеренном климате. Данные лишайники являются обособленным отделом лишайников и относятся к отдельной ветви лишайникового сообщества. Известно, что они отличаются высокими темпами роста и активным редокс-метаболизмом [3]. В связи с этим можно предположить, что пельтигеровые лишайники протестострируют выраженную реакцию к действию неблагоприятных температур. Одним из известных представителей пельтигеровых является эпигейный двухкомпонентный цианолишайник *Peltigera canina*, который был выбран в качестве объекта наших исследований. Известно, что важной составляющей стрессового ответа живого организма на воздействие абиотических стрессовых факторов является увеличение образования активных форм кислорода (АФК) [4] и развитие окислительного стресса, который сопровождается перекисным окислением липидов и

повреждением клеточных мембран. В связи с этим актуально изучение стресс-индуцированных изменений в липидном профиле лишайников, в том числе в содержании липофильных соединений, обладающих антиоксидантными свойствами. В настоящее время биохимические механизмы стрессовой устойчивости лишайников, опосредованные изменениями липидного профиля, изучены недостаточно полно. Целью настоящей работы было изучение изменений липидного состава лишайника *P. canina* при действии повышенной температуры. Понимание биохимических основ липид-опосредованных стрессовых ответов лишайников поможет более углубленно и детально разобраться в механизмах стрессовой устойчивости экстремофилов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования служили талломы лишайника *P. canina*, собранного на территории Республики Татарстан в мае 2023 года. После сбора и предварительной очистки талломы лишайника высушивали при комнатной температуре. Высушенный материал помещали в морозильную камеру (минус 20 °C) на хранение до использования в экспериментах.

Стрессовая обработка лишайника *Peltigera canina*. Талломы лишайника, выложенные в один слой, гидратировали в контейнерах на вискозных салфетках, увлажненных дистиллированной водой, в течение двух суток при температуре 5 °C. Перед стрессовой обработкой контейнеры с гидратированными талломами оставляли на 2 ч при комнатной температуре, после чего их раскладывали по 1,0±0,1 г на диски фильтровальной бумаги, смоченной 1,5 мл дистиллированной воды, которые были уложены на чашки Петри. Для стрессовой обработки чашки Петри с образцами закрывали, помещали в термостат ТСО-1/80 СПУ (Смоленское СКТБ СПУ, Россия) и оставляли при температуре 40 °C на 30 мин, 1 ч, 2 ч, 3 ч с целью изучения динамики образования

перекиси при действии повышенной температуры для понимания окислительных процессов, происходящих в талломах лишайника при температурном стрессе. В остальных экспериментах опытные образцы помещались в термостат и оставались при температуре 40 °С на 3 ч, поскольку стресс-индуцированные изменения липидного состава талломов происходят в течение более длительного времени, чем быстрые стрессовые изменения редокс-статуса клеток. Контролем во всех экспериментах служили гидратированные талломы лишайника, выдержанные в течение 2 ч после гидратации при комнатной температуре.

Оводненность талломов лишайника определяли в каждой временной точке высушиванием до постоянного веса на анализаторе влажности АВГ-60 («Госметр», Россия).

Определение уровня перекиси водорода. Определение уровня перекиси водорода производили согласно источникам [5, 6]. Таллом лишайника (1:4 вес/об.) гомогенизировали в 0,05 М растворе Na-фосфатного буфера с pH 6,2, после центрифугировали в течение 10 мин при 11340 g. Концентрацию H₂O₂ в супернатанте определяли с использованием ксиленолового оранжевого в присутствии Fe²⁺ при 560 нм.

Измерение содержания гидроксильного радикала. Измерение содержания гидроксильного радикала осуществляли согласно материалу [7]. Образование гидроксильных радикалов оценивали по скорости окисления дезоксирибозы. 0,5 г таллома лишайника помещали в 20 мл 0,5 М раствора Na-фосфатного буфера с pH 5, содержащего хинон (2 мМ), Fe⁺³ (20 мМ), оксалиновую кислоту (60 мМ), дезоксирибозу (140 мМ). Реакционную смесь перемешивали на качалке в течение 1 ч, после чего были отобраны пробы по 0,99 мл. В качестве «стоп»-раствора в пробы добавляли 0,01 мл 50%-й ортофосфорной кислоты. Подготовленные пробы замораживали. Перед началом анализа их размораживали, отбирали по 0,05 мл раствора образца, добавляли 0,25 мл 2,5%-го раствора трихлоруксусной кислоты и 0,25 мл 1%-го раствора тиобарбитуровой кислоты в 50 мМ растворе гидроксида натрия и доводили объем реакционной смеси до 1 мл дистиллированной водой. Затем смесь нагревали при температуре 90 °С в течение 15 мин и охлаждали. Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре при 532 нм. Результаты анализа были преобразованы в эквивалент малонового диальдегида с использованием коэффициента экстинкции \mathcal{E} , равного 156 мМ⁻¹×см⁻¹.

Определение уровня перекисного окисления липидов. Об уровне перекисного окисления липидов судили по накоплению малонового диальдегида, определяемого по продукту его реакции с тиобарбитуровой кислотой [8]. 0,5 г таллома лишайника растирали с 1,5 мл 20%-го раствора трихлоруксусной кислоты. Гомогенат центрифугировали 5 мин при 11340 g. К 0,05 мл супернатанта добавляли 0,45 мл 20%-го раствора трихлоруксусной кислоты и 0,5 мл 1%-го раствора тиобарбитуровой кислоты в 50 мМ растворе гидроксида натрия. Затем смесь нагревали на кипящей бане при температуре 90 °С в течение 30 мин и охлаждали. Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре

при 532 нм. Для вычисления содержания малонового диальдегида использовали коэффициент экстинкции \mathcal{E} , равный 156 мМ⁻¹×см⁻¹.

Измерение активности редокс-ферментов. Измерение активности редокс-ферментов отслеживали согласно источникам [9, 10]. Ферментный экстракт получали путем гомогенизации 0,1 г лишайника в жидком азоте и последующей экстракции в 2 мл 0,05 М Na-фосфатного буфера с pH 7,0 в течение 1 ч. Гомогенат центрифугировали при 8000 g 30 мин. Активность ферментов определяли спектрофотометрически на приборе UV-1600 (Shimadzu, Япония) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Активность пероксидазы класса III (КФ 1.11.1.7) определяли по скорости окисления 1 мМ о-дианизидина при 460 нм ($\mathcal{E}_{460} = 30,0 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$) в присутствии 1 мМ H₂O₂ в 70 мМ Na-цитратном буфере с pH 5,5. Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) оценивали по снижению оптической плотности в области светорассеяния H₂O₂ при 240 нм ($\mathcal{E}_{240} = 43,6 \text{ М}^{-1} \times \text{см}^{-1}$) ежесекундно в течение 120 с. Реакционная смесь содержала 0,44 мл 0,5 М К, Na-фосфатного буфера с pH 7,0, 0,01 мл экстракта и 0,05 мл 20 мМ H₂O₂.

Экстрагирование липидов из лишайника *Peltigera canina*. Экстрагирование липидов из лишайника *P. canina* осуществляли согласно методике, описанной в источнике [11]. 1 г таллома лишайника растирали в жидком азоте и добавляли смесь хлороформа и метанола (1:2), для интенсификации извлечения липидов смесь в колбе подвергали обработке ультразвуком при помощи ультразвуковой ванны «Сапфир» («Сапфир», Россия). Выход липидных веществ рассчитывали гравиметрическим методом¹.

Тонкослойная хроматография. Исследование состава липидов проводили с помощью автоматизированной системы для тонкослойной хроматографии фирмы CAMAG (Швейцария). Экстракты липидов растворяли в смеси хлороформа и метанола (1:1) (10 мг/мл). Для хроматографии использовали пластины Cat.N 1.05626.0001 (Merck KGaA, Германия). Нанесение растворов экстрактов и стандартов – α-токоферола, кофермента Q, олеиновой кислоты (Sigma-Aldrich, США, степень чистоты не менее 95%) – на хроматографическую пластину выполняли на автоматическом аппликаторе Linomat 5 (CAMAG, Швейцария) в виде треков шириной 7 мм. Разделение липофильных соединений проводили в автоматической камере для элюирования ADC 2 (CAMAG, Швейцария), линия фронта подвижной фазы составляла 80 мм. В качестве подвижной фазы использовали соединение гексана, этилового эфира и уксусной кислоты (80:20:1). Далее пластины опрыскивали 10%-м раствором H₂SO₄ в этаноле с помощью пульверизатора («Ленхром», Россия), высушивали и нагревали в течение 20 мин при температуре 150 °С. После проводили денситометрическое сканирование хроматографических пластин на спектроденситометре TLC Scanner 4 (CAMAG, Швейцария) при следующих параметрах: режим – отражательная абсорбция, длина волны – 490 нм, щель – 6,0×0,4 мм, скорость сканирования – 20 мм/с, разрешение – 100 мкм/шаг, математический фильтр – Savitsky – Golay 7. Количественное определение α-токоферола, кофер-

¹ОФС 1.2.1.0010.15. Потеря в массе при высушивании. Утв. Приказом Минздрава России от 31.10.2018 г. № 749. Введ. 01.12.2018 г.

мента Q и жирных кислот в исследуемых экстрактах осуществляли с помощью полученных калибровочных уравнений (табл. 1).

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Исследование состава каротиноидов проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе LicArt 62 («Лабконцепт», Россия). Пробоподготовку и разделение пигментов осуществляли согласно источнику [12] с небольшими модификациями. Образец таллома лишайника растирали в жидком азоте, из полученного порошка отбирали навеску массой 0,1 г и переносили ее в пробирку типа Эппендорф, далее к ней добавляли 0,5 мл ацетона. Для интенсификации извлечения каротиноидов смесь в пробирках типа Эппендорф в течение 5 мин подвергали обработке ультразвуком при помощи ультразвуковой ванны «Сапфир» («Сапфир», Россия), далее в течение 5 мин центрифугировали при 6700 g. Супернатант отделяли, а к осадку добавляли 0,5 мл ацетона. Стадии экстрагирования повторяли до максимально полного извлечения пигментов (5–6 стадий). Полученные экстракты объединяли и высушивали на роторном испарителе. Для высокоэффективной жидкостной хроматографии использовали следующие соединения: элюент А – ацетонитрил – метанол – вода (75:12:4), элюент В – метанол – этилацетат (68:32). Высушенные экстракты пигментов растворяли в 200 мкл элюента А, центрифугировали в течение 5 мин при 6700 g, 50 мкл супернатанта отбирали и хроматографировали на колонке с обращенной фазой Inertsil ODS-3 (3 мкм, 4,6×100 мм (GL Sciences, Япония)). Соединения хроматографировали при градиентном режиме со следующей последовательностью элюентов: 0 мин А – 100%; 0–15 мин А – 0% и В – 100%; 15–40 мин В – 100%. Скорость потока элюента составляла 0,5 мл/мин. Детектирование каротиноидов проводили с помощью диодно-матричного детектора (DAD-62 («Лабконцепт», Россия) при 440 нм. Управление работой хроматографа, прием и обработку полученных данных проводили с помощью специализированной компьютерной программы LicArt WSV.

Идентификацию каротиноидов в экстрактах талломов лишайника осуществляли по электронным спектрам в области 300–700 нм, а также путем сопоставления с временами выхода стандартов каротиноидов – β-каротина, лютеина и кантаксантина (Sigma-Aldrich, США, степень чистоты не менее 95%), хроматографируемых при аналогичных условиях.

Статистический анализ. Опыты проводили в 3–5 биологических и 3–10 аналитических повторностях. Полученные данные были представлены в виде средних арифметических значений со стандартными ошибками.

Все экспериментальные данные по количественному определению липидов и каротиноидов имеют нормальное распределение признака. Для сравнения их средних арифметических значений использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с оценкой попарных различий с помощью критериев Тьюки и Бонферрони.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В естественной среде обитания лишайники часто испытывают перепады температур, характерные для каждой определенной местности. Большинство лишайников в сухом виде способны переносить изменения температур в широком диапазоне [1]. В отличие от сухих талломов гидратированные лишайники обладают гораздо большей чувствительностью к воздействию неблагоприятных температур [2]. Исследования реакций фотосинтетического аппарата лишайника *Parmelia tiliacea* на действие высоких температур в сухом и влажном состоянии показали, что выдерживание сухого лишайника (при 50 °С) в течение 24 ч не вызывало заметной стрессовой реакции в отличие от стрессового ответа влажных талломов, термическая обработка которых (45 °С) приводила к инактивации большинства реакционных центров фотосистемы II [13, 14]. Как отмечалось выше, пельтигеровые лишайники характеризуются высокими темпами роста и активным редокс-метаболизмом [3]. Кроме того, они произрастают в средних широтах и, возможно, не обладают повышенной температурной устойчивостью, что позволяет ожидать от них более яркой стрессовой реакции на температурное воздействие.

Настоящая работа была посвящена исследованию действия повышенной температуры (40 °С) на гидратированные талломы лишайника *P. canina*, в частности на изменение липидного профиля лишайника в условиях температурного стресса. Количественный анализ липидных веществ в лишайнике показал, что в опытных образцах, подвергнутых высокотемпературному воздействию в течение 3 ч, их содержание уменьшилось с 3,8±0,4 до 2,6±0,2% от сухой массы.

Известно, что липидный профиль лишайников включает в себя широкий спектр соединений, представленных мембранными липидами (фосфолипиды, гликолипиды, стерины), запасными липидами (ацилглицериды), а также различными вторичными метаболитами, например каротиноидами [15]. Ранее нами было установлено, что липидные экстракты лишайника *P. canina* содержат различные нейтральные и полярные липиды. При воздействии на лишайник повышенной температуры качественный состав липидов не изме-

Таблица 1. Калибровочные уравнения для количественного определения индивидуальных веществ

Table 1. Calibration equations for quantification of individual substances

Вещества-стандарты	Количество, мкг	Полученное калибровочное уравнение (по площади пиков)	Коэффициент корреляции
α-Токоферол	2; 4; 6	$y = 2174 + 882x$	0,99
Олеиновая кислота	2; 4; 6	$y = 2583 + 741x$	0,98
Кофермент Q	1; 2; 3	$y = 1677 + 1865x$	0,99

нялся, но заметно изменялось содержание отдельных липидов – тритерпенов, жирных кислот и углеводов [16]. Полученные данные свидетельствуют о существенном влиянии повышенной температуры на липидный профиль лишайника *P. canina* и вовлечении липидных соединений в стрессовый ответ лишайника на температурное воздействие.

Важной составляющей ответа живого организма на воздействие абиотических стрессовых факторов является увеличение образования АФК [4] и развитие окислительного стресса, который запускает каскад биохимических реакций, направленных на формирование адаптации к стрессовому фактору. В связи с этим нами была проведена оценка редокс-статуса талломов лишайника после воздействия на него повышенной температуры. Проведенные эксперименты показали, что в условиях высокотемпературного нагрева уже через 30 мин уровень перекиси водорода в клетках заметно увеличивался (рис. 1), однако в последующие 30 мин наблюдалось возвращение содержания перекиси водорода к контрольному уровню. Дальнейшее воздействие повышенной температуры не вызвало сильного роста уровня перекиси водорода в клетках лишайника, после 3 ч обработки он был выше контроля всего в 1,2 раза.

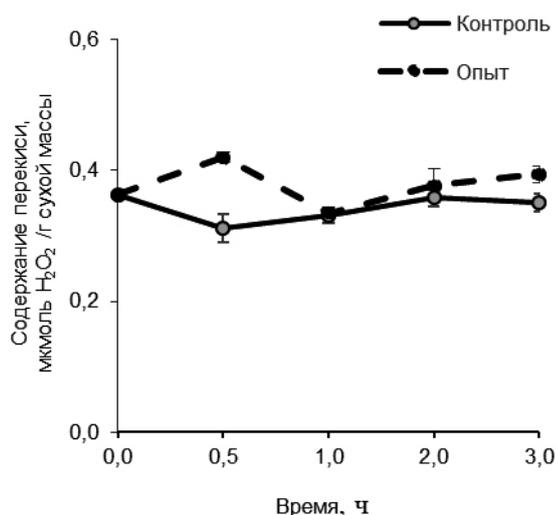
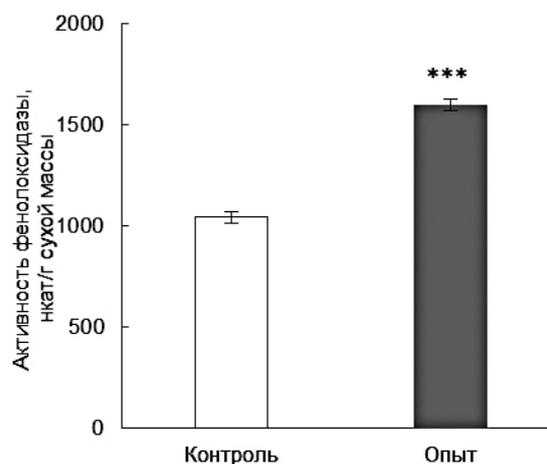


Рис. 1. Динамика изменения содержания перекиси водорода в талломах лишайника *Peltigera canina* при действии повышенной температуры (3 ч, 40 °С). На рисунке представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки при $n = 5$. Достоверность различий определяли с помощью двухвыборочного критерия Колмогорова – Смирнова при $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

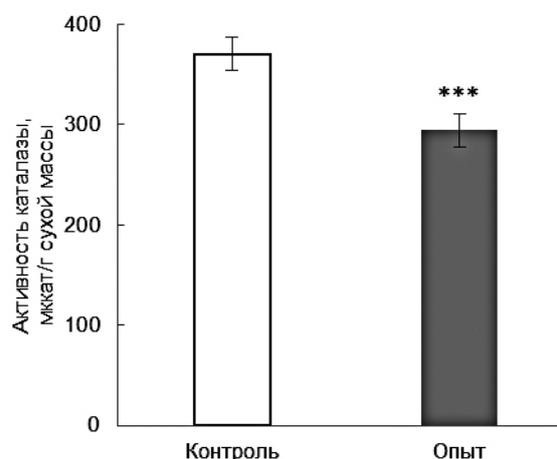
Fig. 1. Dynamics of changes in the H_2O_2 content in the thalli of the lichen *Peltigera canina* under the influence of elevated temperature (3 h, 40 °C). The figure shows arithmetic means and standard errors for $n = 5$. Significance of differences was determined using the two-sample Kolmogorov – Smirnov Test at $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)

Измерение активности редокс-ферментов показало увеличение фенол-ксидазной активности (рис. 2, а) и снижение активности каталазы (рис. 2, б) при действии повышенной температуры (40 °С). Аналогичные законо-

мерности часто наблюдаются у лишайников в условиях окислительного стресса. По данным С. Кузель [17], активность каталазы лишайников (*Cladonia rangiferina*, *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*) резко снижается в условиях окисления, вызванного инкубацией талломов в атмосфере с повышенным содержанием диоксида серы.



а



б

Рис. 2. Изменение активности фенолоксидазы (а) и каталазы (б) в талломах *Peltigera canina* при действии повышенной температуры (3 ч, 40 °С). На рисунке представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки при $n = 5$. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа при $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

Fig. 2. Changes in phenol oxidase (а) and catalase (б) activity in *Peltigera canina* thalli under the action of elevated temperature (3 h, 40 °C). The figures show arithmetic means and standard errors for $n = 5$. Significance of differences was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) at $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

Обработка повышенной температурой приводила к снижению образования гидроксильного радикала в экстраклеточном растворе (рис. 3) и усилению перекисного окисления липидов в талломах лишайника (рис. 4).

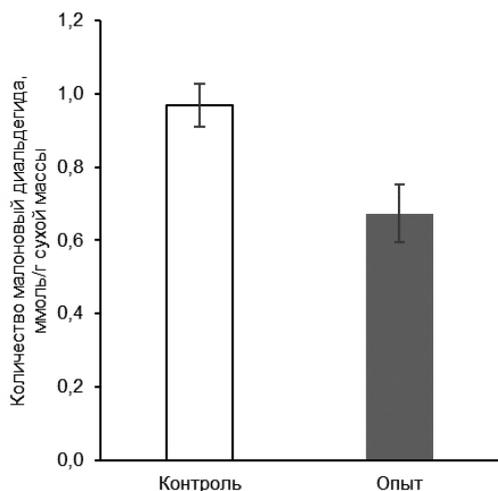


Рис. 3. Изменение содержания гидроксильного радикала в талломах *Peltigera canina* при действии повышенной температуры (3 ч, 40 °С). На рисунке представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки при $n = 5$. Достоверность различий определяли с помощью двухвыборочного критерия Колмогорова – Смирнова при $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

Fig. 3. Changes in the content of hydroxyl radical in *Peltigera canina* thalli under the action of elevated temperature (3 h, 40 °C). The figure shows the arithmetic means and standard errors for $n = 5$. Significance of differences was determined using the two-sample Kolmogorov – Smirnov Test at $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

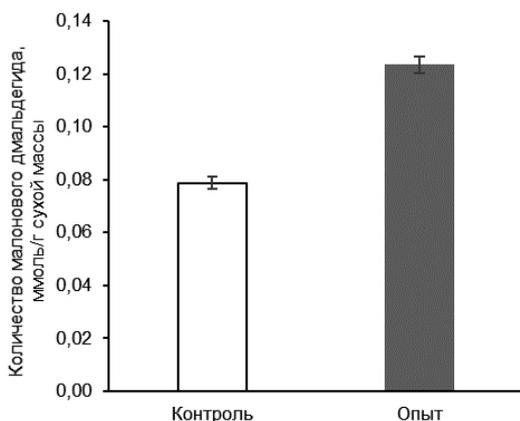


Рис. 4. Изменение уровня перекисного окисления липидов лишайника в талломах *Peltigera canina* при действии повышенной температуры (3 ч, 40 °С). На рисунке представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки при $n = 5$. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа при $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

Fig. 4. Changes in the level of lipid peroxidation in lichen thalli of *Peltigera canina* under the influence of elevated temperature (3 h, 40 °C). The figure shows the arithmetic means and standard errors for $n = 5$. Significance of differences was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) at $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

В работе К.Э. Мой с соавторами [18] показано, что, несмотря на то, что род *Peltigera* характеризуется высокой активностью редокс-ферментов, этот широко распространенный род лишайников обладает слабой способностью превращать добавленный хинон в гидрохиноны. Это привело авторов [18] к предположению о том, что скорость образования гидроксильного радикала определяется активностью хинонредуктазы. Вероятно, снижение содержания гидроксильного радикала при высокотемпературной обработке лишайника *P. canina* обусловлено ингибированием активности экстраклеточных хинонредуктаз, ответственных за производство гидроксильного радикала.

Все наблюдаемые изменения редокс-параметров свидетельствуют о развитии окислительного стресса в лишайнике *P. canina* в ответ на высокотемпературную обработку талломов. В связи с этим возникло предположение о возможном включении антиоксидантных систем лишайника в ответ на действие повышенной температуры. Е.Р. Котловой² был проведен детальный анализ антиоксидантных систем лишайников, в том числе и лишайника *P. canina*. Несмотря на давность, данное исследование не утратило своей актуальности и ценности. Автором отмечено, что у живых организмов имеются две принципиальные стратегии (действующие независимо или в комбинации), которые обеспечивают защиту от окислительного повреждения [19]. Первая включает изменение молекулярного состава мембран, что влечет за собой изменение проницаемости и, соответственно, доступности клеточных компонентов для токсичных продуктов. Вторая основана на активации систем, обеспечивающих химическую детоксикацию АФК и свободных органических радикалов. Существует неферментативная система антиоксидантной защиты, в которой участвуют низкомолекулярные соединения – «перехватчики» АФК и органических радикалов, а также вещества, которые регенерируют антиоксиданты (синергисты), и ферментативная система антиокислительной защиты, к которой относятся такие ферменты, как супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза [19–22].

В связи с вышесказанным, в лишайнике *P. canina* нами были исследованы стресс-индуцированные изменения общего липидного профиля с фокусировкой на вещества, обладающие выраженным антиоксидантным действием. К таким соединениям относятся α -токоферол, кофермент Q и каротиноиды.

Было показано, что при действии повышенной температуры происходит резкое падение уровня жирных кислот (табл. 2), что может быть вызвано их окислением, и это согласуется с нашими данными о повышении уровня перекисного окисления липидов в лишайнике на фоне действия высокой температуры (см. рис. 4).

Основная функция токоферолов связана с торможением перекисного окисления липидов в липидной фазе [23]. Они вызывают обрыв цепей свободнорадикального окисления путем взаимодействия с пероксильными и алкоксильными радикалами [24]. Кроме участия в реакциях обрыва цепей окисления молекулы токоферола, аналогично стеринам, снижают проницаемость мембран, а также связывают свободные жирные кислоты, избыток которых дестабилизирует мембранную структуру [25]. Из

²Котлова Е.Р. Антиокислительные системы лишайников: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.12, 03.00.24. СПб., 2000. 199 с.

Таблица 2. Количество индивидуальных липидов в талломах лишайника *Peltigera canina* при действии повышенной температуры (3 ч, 40 °C) (n = 3)

Table 2. Individual lipids amount in the thalli of the lichen *Peltigera canina* under the action of elevated temperature (3 h, 40 °C) (n = 3)

Индивидуальные липиды	Количество, мкг/г сухой массы	
	Контроль	Опыт
Жирные кислоты	1296±74	224±30***
α-Токоферол	28±3	620±41***
Кофермент Q	52±7	Н.д.

Примечание. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа при $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***). Н.д. – не детектируется.

всех известных форм токоферолов в лишайниках был обнаружен только α-токоферол [26, 27]. В наших экспериментах при действии повышенной температуры в лишайнике наблюдалось значительное увеличение содержания α-токоферола (см. табл. 2), которое сопровождалось заметным снижением уровня кофермента Q. Кофермент Q является жирорастворимым антиоксидантом, способным постоянно регенерировать из окисленной формы с помощью ферментных систем. Непосредственное (прямое) антиоксидантное действие кофермента Q заключается в улавливании свободных радикалов. Опосредованное антиоксидантное действие кофермента Q состоит в предупреждении образования феноксил-радикалов α-токоферола и его возможного прооксидантного действия. Как известно, высокая антиокислительная активность α-токоферола проявляется только в условиях непрерывного функционирования редокс-цикла².

Еще одним важным участником неферментативной антиоксидантной системы являются каротиноиды, которые, как известно, способны утилизировать свободные радикалы [28]. Каротиноиды принимают участие в защите клеточных структур от фотодеструкции, а также могут взаимодействовать с органическими радикалами жирных кислот, действуя как «ловушки» радикалов² [21, 29]. С одной стороны, есть мнение, что каротиноиды и токоферолы проявляют синергизм в защите липидов от повреждающего действия свободных радикалов [30, 31].

С другой стороны, показано, что токоферол защищает каротиноиды от окисления, взаимодействуя с их радикалами [32]. У цианолишайников (*Collema*, *Leptogium*, *Peltigera*, *Pseudocyphellaria*, *Stictia*) преобладают типичные для цианобактерий кето-каротиноиды – эхиненон и кантаксантин. Нужно отметить, что антиокислительная активность кето-каротиноидов значительно выше, чем гидроксисоединений. В ряду кето-каротиноидов наибольшей антиокислительной активностью обладают соединения, имеющие в своем составе максимальное количество кето-групп. Например, было показано, что кантаксантин и астаксантин, имеющие две кето-группы, более эффективны в детоксикации радикалов, чем эхиненон, химическая структура которого содержит только одну кето-группу [33, 34]. В ходе наших экспериментов было обнаружено, что при действии повышенной температуры наблюдается увеличение суммарного количества каротиноидов в талломах лишайника почти в 2 раза (табл. 3).

В составе обнаруженных каротиноидов удалось идентифицировать β-каротин, лютеин и кето-каротиноид кантаксантин. Надо отметить, что β-каротин является основным преобладающим каротиноидом в лишайнике *P. canina*. Как видно из табл. 3, в условиях температурного стресса в сумме каротиноидов увеличивается доля β-каротина, тогда как относительное содержание лютеина и кантаксантина уменьшается.

Таблица 3. Изменение относительного содержания каротиноидов в талломах лишайника *Peltigera canina* при действии повышенной температуры (3 ч, 40 °C) (n = 3)

Table 3. Changes in the relative content of carotenoids in the thalli of the lichen *Peltigera canina* under the influence of elevated temperature (3 h, 40 °C) (n = 3)

Каротиноиды	Площадь пика, мAU×мин	Относительное содержание, %	Площадь пика, мAU×мин	Относительное содержание, %
	Контроль		Опыт	
β-Каротин	2673±26	54,8±0,1	6345±368***	60,7±0,2***
Лютеин	645±12	13,2±0,2	1116±11***	10,8±0,6*
Кантаксантин	274±7	5,6±0,1	319±17	3,1±0,1***
Н.и.	316±2	6,5±0,1	656±64***	6,3±0,3
Н.и.	378±12	7,8±0,3	652±38**	6,2±0,1**
Н.и.	389±5	8,0±0,1	872±75**	8,3±0,3
Н.и.	199±4	4,1±0,1	485±33***	4,6±0,1**
Всего	4874±39	100,0	10445±593***	100,0

Примечание. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа при $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***). Н.и. – неидентифицированный каротиноид.

Полученные данные отличаются от данных, описанных в вышеупомянутой работе Е.Р. Котловой², где в условиях окислительного стресса, вызываемого действием окислителя Fe²⁺-аскорбата, наблюдалось резкое уменьшение β-каротина и увеличение содержания кантаксантина. Однако и в нашей работе также была обнаружена обратная корреляция между содержанием кантаксантина и β-каротина, что, возможно, обусловлено различными функциональными особенностями этих каротиноидов при осуществлении антиоксидантной защиты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что при действии повышенной температуры на талломы лишайника *P. canina* наблюдается изменение редокс-статуса клеток талломов и развитие окислительного стресса, который приводит к активизации неферментативной антиоксидантной системы лишайника, в частности происходит увеличение содержания низкомолекулярных антиоксидантов липофильной природы, что является липид-опосредованным стрессовым ответом лишайника на действие повышенной температуры.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Beckett R.P., Kranner I., Minibayeva F.V. Stress physiology and the symbiosis // *Lichen biology* / ed. T.H. Nash III. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. P. 134–151.
2. Chen K., Wei J.-C. Heat tolerance of the mycobionts and phycobionts from three desert lichens // *Mycosystema*. 2015. Vol. 34, no. 5. P. 1007–1014. DOI: 10.13346/j.mycosystema.140074.
3. Beckett R.P., Minibayeva F.V., Vylegzhanina N.N., Tolpysheva T. High rates of extracellular superoxide production by lichens in the suborder Peltigerineae correlate with indices of high metabolic activity // *Plant, Cell and Environment*. 2003. Vol. 26, no. 11. P. 1827–1837. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2003.01099.x.
4. Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., et al. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system // *Journal of Experimental Botany*. 2002. Vol. 53, no. 372. P. 1367–1376. DOI: 10.1093/jexbot/53.372.1367.
5. Веселова С.В., Нужная Т.В., Бурханова Г.Ф., Румянцев С.Д., Максимов И.В. Влияние этилена на содержание активных форм цитокининов в листьях пшеницы, инфицированных различными по вирулентности штаммами гриба *Stagonospora nodorum* Berk. // *Экобиотех*. 2020. Т. 3. N 1. С. 91–101. DOI: 10.31163/2618-964X-2020-3-1-91-101. EDN: NFQZQP.
6. Bindschedler L.V., Minibaeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P. Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca²⁺ // *New Phytologist*. 2001. Vol. 151, no. 1. P. 185–194. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x.
7. Gomez-Toribio V., Garcia-Martin A.B., Martinez M.J., Martinez A.T., Guillen F. Enhancing the production of hydroxyl radicals by *Pleurotus eryngii* via quinone redox cycling for pollutant removal // *Applied and Environmental Microbiology*. 2009. Vol. 75, no. 12. P. 3954–3962. DOI: 10.1128/AEM.02138-08.
8. Kumar G.N.M., Knowles N.R. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers // *Plant Physiology*. 1993. Vol. 102, no. 1. P. 115–124. DOI: 10.1104/pp.102.1.115.
9. Часов А.В., Минибаева Ф.В. Методические подходы к исследованию редокс-активности апопласта. 2. Регуляция активности пероксидаз // *Физиология растений*. 2014. Т. 61. N 5. С. 668–675. DOI: 10.7868/S0015330314050042. EDN: SHLPKN.
10. Hildebrandt A.G., Roots I. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent formation and breakdown of hydrogen peroxide during mixed function oxidation reaction in liver microsomes // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1975. Vol. 171, no. 2. P. 385–397. DOI: 10.1016/0003-9861(75)90047-8.
11. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1959. Vol. 37, no. 8. P. 911–917. DOI: 10.1139/o59-099.
12. Дымова О.В., Кузиванова О.А. Оптимизация способа экстракции фотосинтетических пигментов и их содержание в талломах лишайников // *Химия растительного сырья*. 2018. N 2. С. 137–144. DOI: 10.14258/jcprm.2018023013. EDN: XQIGXB.
13. Oukarroum A., Schansker G., Strasser R.J. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl a fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance // *Physiologia Plantarum*. 2009. Vol. 137, no. 2. P. 188–199. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01273.x.
14. Lange O.L., Green T.G.A., Heber U. Hydration-dependent photosynthetic production of lichens: what do laboratory studies tell us about field performance? // *Journal of Experimental Botany*. 2001. Vol. 52, no. 363. P. 2033–2042. DOI: 10.1093/jexbot/52.363.2033.
15. Дембицкий В.М., Толстикова Г.А. Органические метаболиты лишайников: монография. Новосибирск: Гео, 2005. 134 с.
16. Валитова Ю.Н., Хабибрахманова В.Р., Уваева В.А., Рахматуллина Д.Ф., Галеева Е.И., Трифонова Т.В. [и др.]. Изменение липидного состава лишайника *Peltigera canina* при действии неблагоприятных температур // *Устойчивость растений и микроорганизмов к неблагоприятным факторам среды: труды VI Всерос. науч. конф. с междунар. уч. (пос. Большое Голоустное, 3–7 июля 2023 г.)*. Иркутск, 2023. С. 25. EDN: ALUYDK.
17. Kuziel S. Influence of sulphur dioxide on chlorophyll content and catalase activity in some chosen lichen species // *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 1974. Vol. 43, no. 4. P. 453–457. DOI: 10.5586/asbp.1974.041.
18. Moyo C.E., Beckett R.P., Trifonova T.V., Minibayeva F.V. Extracellular redox cycling and hydroxyl radical production occurs widely in lichenized Ascomycetes // *Fungal Biology*. 2017. Vol. 121, no. 6-7. P. 582–588. DOI: 10.1016/j.funbio.2017.03.005.
19. Gunning J.R., Taylor G.J. Mechanisms of metal tolerance in plants: physiological adaptations for exclusion of metal ions from the cytoplasm // *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms* / eds R.G. Alcher, J.R. Gunning. New York: Wiley-Liss, 1990. P. 329–356.

20. Мерзляк М.Н. Физиология растений. Т. 6. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки. М.: Изд-во ВИНТИ АН СССР, 1989. 166 с.
21. Yu B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*. 1994. Vol. 74, no. 1. P. 139–162. DOI: 10.1152/physrev.1994.74.1.139.
22. Hell A.F., Gasulla F., Gonzalez-Hourcade M., del Campo E.M., Centeno D.C., Casano L.M. Tolerance to cyclic desiccation in lichen microalgae is related to habitat preference and involves specific priming of the antioxidant system // *Plant and Cell Physiology*. 2019. Vol. 60, no. 8. P. 1880–1891. DOI: 10.1093/pcp/pcz103.
23. Mesa T., Munné-Bosch S. α -Tocopherol in chloroplasts: nothing more than an antioxidant? // *Current Opinion in Plant Biology*. 2023. Vol. 74. P. 102400. DOI: 10.1016/j.pbi.2023.102400.
24. Fukuzawa K., Fujii T. Peroxide dependent and independent lipid peroxidation: site-specific mechanisms of initiation by chelated iron and inhibition by α -tocopherol // *Lipids*. 1992. Vol. 27, no. 3. P. 227–233. DOI: 10.1007/BF02536183.
25. Wang X., Quinn P.J. Vitamin E and its function in membranes // *Progress in Lipid Research*. 1999. Vol. 38, no. 4. P. 309–336. DOI: 10.1016/S0163-7827(99)00008-9.
26. DaSilva E.J., Englund B. Occurrence of tocopherol and ergosterol in Swedish lichens // *Lichenologist*. 1974. Vol. 6, no. 1. P. 96–99. DOI: 10.1017/S0024282974000053.
27. Dasilva E.J., Jensen A. Choline, ergosterol and tocopherol content of some Norwegian lichens // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1971. Vol. 22, no. 6. P. 308–311. DOI: 10.1002/jsfa.2740220611.
28. Britton G. Carotenoid research: history and new perspectives for chemistry in biological systems // *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2020. Vol. 1865, no. 11. P. 158699. DOI: 10.1016/j.bbalip.2020.158699.
29. Palozza P., Krinsky N.I. Antioxidant effect of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: an overview // *Methods in enzymology*. Vol. 213. Carotenoids (Part A. Chemistry, separation, quantitation, and antioxidation) / ed. L. Packer. San Diego: Academic Press, 1992. P. 403–420.
30. Kennedy T.A., Leibler D.C. Peroxyl radical scavenging by β -carotene in lipid bilayers: effect of oxygen partial pressure // *Journal of Biological Chemistry*. 1992. Vol. 267, no. 7. P. 4658–4663.
31. Böhm F., Edge R., McGarvey D.J., Truscott T.G. β -Carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against NO_x // *FEBS Letters*. 1998. Vol. 436, no. 3. P. 387–389. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)01173-9.
32. Гомбоева С.Б., Гесслер Н.Н., Шумаев К.Б., Хомич Т.И., Мойсеенок А.Г., Быховский В.Я. Некоторые природные и синтетические антиоксиданты как стабилизаторы превращения β -каротина в витамин А // *Биохимия*. 1998. Т. 63. N 2. С. 224–229.
33. Muzzopappa F., Kirilovsky D. Changing color for photoprotection: the orange carotenoid protein // *Trends in Plant Science*. 2020. Vol. 25, no 1. P. 92–104 DOI: 10.1016/j.tplants.2019.09.013.
34. Kobayashi M., Kakizono T., Nishio N., Nagai S., Kurimura Y., Tsuji Y. Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997. Vol. 48. P. 351–356. DOI: 10.1007/s002530051061.

REFERENCES

1. Beckett R.P., Kranner I., Minibayeva F.V. Stress physiology and the symbiosis. In: Nash III T.H. (ed.). *Lichen biology*. Cambridge: Cambridge University Press; 2008, p. 134–151.
2. Chen K., Wei J.-C. Heat tolerance of the mycobionts and phycobionts from three desert lichens. *Mycosystema*. 2015;34(5):1007–1014. DOI: 10.13346/j.mycosystema.140074.
3. Beckett R.P., Minibayeva F.V., Vylegzhanina N.N., Tolpysheva T. High rates of extracellular superoxide production by lichens in the suborder Peltigerineae correlate with indices of high metabolic activity. *Plant, Cell and Environment*. 2003;26(11):1827–1837. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2003.01099.x.
4. Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., et al. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany*. 2002;53(372):1367–1376. DOI: 10.1093/jexbot/53.372.1367.
5. Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Burkhanova G.F., Rumyantsev S.D., Maksimov I.V. Effect of ethylene on the content of active forms of cytokinins in wheat leaves infected with the fungus *Stagonospora nodorum* Berk. strains with different virulence. *Ekobiotech = Ecobiotech*. 2020;3(1):91–101. (In Russian). DOI: 10.31163/2618-964X-2020-3-1-91-101. EDN: NFQZQP.
6. Bindschedler L.V., Minibaeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P. Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca^{2+} . *New Phytologist*. 2001;151(1):185–194. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x.
7. Gomez-Toribio V., Garcia-Martin A.B., Martinez M.J., Martinez A.T., Guillen F. Enhancing the production of hydroxyl radicals by *Pleurotus eryngii* via quinone redox cycling for pollutant removal. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(12):3954–3962. DOI: 10.1128/AEM.02138-08.
8. Kumar G.N.M., Knowles N.R. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. *Plant Physiology*. 1993;102(1):115–124. DOI: 10.1104/pp.102.1.115.
9. Chasov A.V., Minibayeva F.V. Methodological approaches for studying apoplastic redox activity: 2. Regulation of peroxidase activity. *Fiziologiya rastenii*. 2014;61(5):668–675. (In Russian). DOI: 10.7868/S0015330314050042. EDN: SHLPKN.
10. Hildebrandt A.G., Roots I. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent formation and breakdown of hydrogen peroxide during mixed function oxidation reaction in liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1975;171(2):385–397. DOI: 10.1016/0003-9861(75)90047-8.
11. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1959;37(8):911–917. DOI: 10.1139/o59-099.
12. Dymova O.V., Kuzivanova O.A. The optimization of extraction routine of photosynthetic pigments and

its content in lichens thalli. *Khimija rastitel'nogo syr'ja = Chemistry of Plant Raw Material*. 2018;2:137-144. (In Russian). DOI: 10.14258/jcprm.2018023013. EDN: XQIGXB.

13. Oukarroum A., Schansker G., Strasser R.J. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl a fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Physiologia Plantarum*. 2009;137(2):188-199. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01273.x.

14. Lange O.L., Green T.G.A., Heber U. Hydration-dependent photosynthetic production of lichens: what do laboratory studies tell us about field performance? *Journal of Experimental Botany*. 2001;52(363):2033-2042. DOI: 10.1093/jexbot/52.363.2033.

15. Dembitskii V.M. Tolstikov G.A. *Organic metabolites of lichens*. Novosibirsk: Geo; 2005, 134 p. (In Russian).

16. Valitova Yu.N., Khabibrakhmanova V.R., Uvaeva V.L., Rakhmatullina D.F., Ga-leeva E.I., Trifonova T.V., et al. Changes in the lipid composition of the lichen *Peltigera canina* under the influence of unfavorable temperatures. In: *Ustoichivost' rastenii i mikroorganizmov k neblagopriyatnym faktoram sredy: trudy VI Vseros. nauch. konf. s mezhdunar. uch. = Resistance of plants and microorganisms to unfavorable environmental factors: Proceedings of the 6th All-Russian Scientific Conference with International Participation*. 3–7 July 2023, Bolshoe Goloustnoe. Irkutsk; 2023, p. 25. (In Russian). EDN: ALUYDK.

17. Kuziel S. Influence of sulphur dioxide on chlorophyll content and catalase activity in some chosen lichen species. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 1974;43(4):453-457. DOI: 10.5586/asbp.1974.041.

18. Moyo C.E., Beckett R.P., Trifonova T.V., Minibayeva F.V. Extracellular redox cycling and hydroxyl radical production occurs widely in lichenized Ascomycetes. *Fungal Biology*. 2017;121(6-7):582-588. DOI: 10.1016/j.funbio.2017.03.005.

19. Gumming J.R., Taylor G.J. Mechanisms of metal tolerance in plants: physiological adaptations for exclusion of metal ions from the cytoplasm. In: Alcher R.G., Gumming J.R. (eds). *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms*. New York: Wiley-Liss; 1990, p. 329-356.

20. Merzlyak M.N. *Plant physiology. Vol. 6. Activated oxygen and oxidative processes in plant cell membranes*. Moscow: All-Union Institute for Scientific and Technical Information of the USSR Academy of Sciences; 1989, 166 p. (In Russian).

21. Yu B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*. 1994;74(1):139-162. DOI: 10.1152/physrev.1994.74.1.139.

22. Hell A.F., Gasulla F., Gonzalez-Hourcade M., del Campo E.M., Centeno D.C., Casano L.M. Tolerance to cyclic desiccation in lichen microalgae is related to habitat

preference and involves specific priming of the antioxidant system. *Plant and Cell Physiology*. 2019;60(8):1880-1891. DOI: 10.1093/pcp/pcz103.

23. Mesa T., Munné-Bosch S. α -Tocopherol in chloroplasts: nothing more than an antioxidant? *Current Opinion in Plant Biology*. 2023;74:102400. DOI: 10.1016/j.pbi.2023.102400.

24. Fukuzawa K., Fujii T. Peroxide dependent and independent lipid peroxidation: site-specific mechanisms of initiation by chelated iron and inhibition by α -tocopherol. *Lipids*. 1992;27(3):227-233. DOI: 10.1007/BF02536183.

25. Wang X., Quinn P.J. Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research*. 1999;38(4):309-336. DOI: 10.1016/S0163-7827(99)00008-9.

26. DaSilva E.J., Englund B. Occurrence of tocopherol and ergosterol in Swedish lichens. *Lichenologist*. 1974;6(1):96-99. DOI: 10.1017/S0024282974000053.

27. Dasilva E.J., Jensen A. Choline, ergosterol and tocopherol content of some Norwegian lichens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1971;22(6):308-311. DOI: 10.1002/jsfa.2740220611.

28. Britton G. Carotenoid research: history and new perspectives for chemistry in biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2020;1865(11):158699. DOI: 10.1016/j.bbalip.2020.158699.

29. Palozza P., Krinsky N.I. Antioxidant effect of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: an overview. In: Packer L. (ed.). *Methods in enzymology. Vol. 213. Carotenoids (Part A. Chemistry, separation, quantitation, and antioxidation)*. San Diego: Academic Press; 1992. p. 403-420.

30. Kennedy T.A., Leibler D.C. Peroxyl radical scavenging by β -carotene in lipid bilayers: effect of oxygen partial pressure. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(7):4658-4663.

31. Böhm F., Edge R., McGarvey D.J., Truscott T.G. β -Carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against NO₂. *FEBS Letters*. 1998;436(3):387-389. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)01173-9.

32. Gomboeva S.B., Gessler N.N., Shumaev K.B., Khomich T.I., Moiseynok A.G., By-khovskiy V.Ya. Some natural and synthetic antioxidants as stabilizers of β -carotene conversion to vitamin A. *Biokhimiya*. 1998;63(2):224-229. (In Russian).

33. Muzzopappa F., Kirilovsky D. Changing color for photoprotection: the orange carotenoid protein. *Trends in Plant Science*. 2020;25(1):92-104 DOI: 10.1016/j.tplants.2019.09.013.

34. Kobayashi M., Kakizono T., Nishio N., Nagai S., Kurimura Y., Tsuji Y. Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997;48:351-356. DOI: 10.1007/s002530051061.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Валитова Юлия Наилевна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Казанский институт биохимии и биофизики –
обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра
«Казанский научный центр Российской
академии наук»,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31,
Российская Федерация,
✉yulavalitova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3486-9989>

Хабибрахманова Венера Равилевна,
к.х.н.,
старший научный сотрудник,
Казанский институт биохимии и биофизики –
обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра
«Казанский научный центр Российской
академии наук»,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31,
Российская Федерация,
доцент,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
venerakhabirakhmanova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0969-7591>

Гурьянов Олег Петрович,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Казанский институт биохимии и биофизики –
обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра
«Казанский научный центр Российской
академии наук»,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31,
Российская Федерация,
gurjanov58@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0002-9946-9150>

Уваева Вероника Леонидовна,
лаборант-исследователь,
Казанский институт биохимии и биофизики –
обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра
«Казанский научный центр Российской
академии наук»,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31,
Российская Федерация,
vernicapux99@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0007-6303-4805>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Juliya N. Valitova,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Kazan Science Centre RAS,
2/31, Lobachevsky St., Kazan, 420111,
Russian Federation,
✉yulavalitova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3486-9989>

Venera R. Khabibrakhmanova,
Cand. Sci. (Chemistry),
Senior Researcher,
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Kazan Science Centre RAS,
2/31, Lobachevsky St., Kazan, 420111,
Russian Federation;
Associate Professor,
Kazan National Research
Technological University,
68, Karl Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
venerakhabirakhmanova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0969-7591>

Oleg P. Gurianov,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Kazan Science Centre RAS,
2/31, Lobachevsky St., Kazan, 420111,
Russian Federation,
gurjanov58@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0002-9946-9150>

Veronika L. Uvaeva,
Laboratory Assistant Researcher,
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Kazan Science Centre RAS,
2/31, Lobachevsky St., Kazan, 420111,
Russian Federation,
vernicapux99@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0007-6303-4805>

Хайруллина Айсылу Фаридовна,

лаборант-исследователь,
Казанский институт биохимии и биофизики –
обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра
«Казанский научный центр Российской
академии наук»,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31,
Российская Федерация,
a16280110@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0009-5349-604X>

Рахматуллина Дания Фаритовна,

к.б.н., научный сотрудник,
Казанский институт биохимии и биофизики –
обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра
«Казанский научный центр Российской
академии наук»,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31,
Российская Федерация,
rdf137@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8237-2929>

Галеева Екатерина Инсафовна,

к.б.н., научный сотрудник,
Казанский институт биохимии и биофизики –
обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра
«Казанский научный центр Российской
академии наук»,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31,
Российская Федерация,
kgu@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5827-6339>

Трифорова Татьяна Владимировна,

к.б.н., научный сотрудник,
Казанский институт биохимии и биофизики –
обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра
«Казанский научный центр Российской
академии наук»,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31,
Российская Федерация,
TrifonovaTatyana@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5845-1160>

Викторова Лариса Викторовна,

к.б.н., научный сотрудник,
Казанский институт биохимии и биофизики –
обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра
«Казанский научный центр Российской
академии наук»,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31,
Российская Федерация,
lar-viktorova@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0009-9265-4127>

Aisylu F. Khairullina,

Laboratory Assistant Researcher,
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Kazan Science Centre RAS,
2/31, Lobachevsky St., Kazan, 420111,
Russian Federation,
a16280110@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0009-5349-604X>

Daniya F. Rakhmatullina,

Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Kazan Science Centre RAS,
2/31, Lobachevsky St., Kazan, 420111,
Russian Federation,
rdf137@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8237-2929>

Ekaterina I. Galeeva,

Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Kazan Science Centre RAS,
2/31, Lobachevsky St., Kazan, 420111,
Russian Federation,
kgu@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5827-6339>

Tatyana V. Trifonova,

Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Kazan Science Centre RAS,
2/31, Lobachevsky St., Kazan, 420111,
Russian Federation,
TrifonovaTatyana@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5845-1160>

Larisa V. Viktorova,

Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Kazan Science Centre RAS,
2/31, Lobachevsky St., Kazan, 420111,
Russian Federation,
lar-viktorova@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0009-9265-4127>

Минибаяева Фариды Вилевны,

д.б.н., главный научный сотрудник,
Казанский институт биохимии и биофизики –
обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра
«Казанский научный центр Российской
академии наук»,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31,
Российская Федерация,
fminibayeva@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-0827-181X>

Farida V. Minibayeva,

Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher,
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Kazan Science Centre RAS,
2/31, Lobachevsky St., Kazan, 420111,
Russian Federation,
fminibayeva@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-0827-181X>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 02.08.2023.
Одобрена после рецензирования 24.08.2023.
Принята к публикации 31.10.2023.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

Information about the article

The article was submitted 02.08.2023.
Approved after reviewing 24.08.2023.
Accepted for publication 31.10.2023.

Научная статья

УДК 579.262

EDN: EMVBJK

DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-545-551



Микроорганизмы, населяющие эндо- и ризосферу эндемичного растения Прибайкалья *Hedysarum zundukii* (Fabaceae)

И.А. Васильев*, Д.А. Кривенко*, И.С. Петрушин*,

И.Г. Кондратов**, О.Б. Огарков**, Ю.А. Маркова*✉

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Российская Федерация

**Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Российская Федерация

Аннотация. Бактерии обеспечивают дополнительную устойчивость растений к неблагоприятным факторам окружающей среды, таким как недостаток питательных веществ в почве, наличие антропогенного загрязнения, присутствие фитопатогенов и т.д. Поиск ценных биотехнологических штаммов целесообразно проводить среди микроорганизмов, ассоциированных с растениями, произрастающими в неблагоприятных условиях среды обитания. Целью данной работы было выделение и описание микроорганизмов, населяющих эндо- и ризосферу узлокального эндемика Приольхонья (Ольхонский район Иркутской области) *Hedysarum zundukii*. В результате проделанной работы было выделено 88 штаммов микроорганизмов, причем грамположительные микроорганизмы преобладали как в ризо-, так и в эндосфере. В ризосфере подавляющее большинство штаммов относилось к актиномицетам. Из 25 идентифицированных изолятов 4 относятся к семейству Rhizobiaceae. Ризобактерия *Phyllobacterium zundukense* ранее была описана в составе микробиома корневых клубеньков бобового растения *Oxytropis triphylla*, также произрастающего в этом регионе. Обнаружение ее в ризосферной почве *H. zundukii* позволяет сделать предположение о том, что данный микроорганизм не связан с одним хозяином, а ассоциирован с разными видами бобовых. Особый интерес представляют штаммы Actinomycetia, а также *Lysobacter* sp. и *Variovorax paradoxus*, которые перспективны для дальнейшего изучения в качестве продуцентов биологически активных соединений, стимуляторов роста и развития растений или деструкторов поллютантов. Таким образом, изоляты, выделенные из ризо- и эндосферы *H. Zundukii*, могут обладать признаками, полезными для использования в биотехнологии, и требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: *Hedysarum zundukii*, бобовые, ризосферные и эндофитные микроорганизмы

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-26-00204.

Для цитирования: Васильев И.А., Кривенко Д.А., Петрушин И.С., Кондратов И.Г., Огарков О.Б., Маркова Ю.А. Микроорганизмы, населяющие эндо- и ризосферу эндемичного растения Прибайкалья *Hedysarum zundukii* (Fabaceae) // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 545–551. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-545-551. EDN: EMVBJK.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Microorganisms inhabiting the endo- and rhizosphere of *Hedysarum zundukii* (Fabaceae) endemic to the Baikal region

Ilya A. Vasilev*, Denis A. Krivenko*, Ivan S. Petrushin*,

Ilya G. Kondratov**, Oleg B. Ogarkov**, Yuliya A. Markova*✉

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Irkutsk, Russian Federation

**Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. Bacteria provide plants with additional resistance to adverse environmental factors, such as the lack of soil nutrients, anthropogenic pollution, the presence of phytopathogens, etc. The search for valuable biotechnological strains should be conducted among microorganisms associated with plants growing under unfavorable conditions. The present study aims

© Васильев И.А., Кривенко Д.А., Петрушин И.С., Кондратов И.Г., Огарков О.Б., Маркова Ю.А., 2023

to isolate and characterize microorganisms inhabiting the endo- and rhizosphere of *Hedysarum zundukii*, a local endemic of the Olkhon region (Olkhonsky District, Irkutsk Oblast). A total of 88 microbial strains were isolated, with Gram-positive microorganisms predominating in both the rhizo- and endosphere. In the rhizosphere, the vast majority of strains were found to belong to actinomycetes. Of the 25 identified isolates, four belong to the Rhizobiaceae family. The *Phyllobacterium zundukense* rhizobacterium was previously described as part of the microbiome of root nodules in *Oxytropis triphylla* also growing in this region. Its detection in the rhizosphere soil of *H. zundukii* suggests that this microorganism is associated with different legume species rather than with a single host. Of particular interest are the strains of Actinomycetia, as well as *Lysobacter* sp. and *Variovorax paradoxus*, which are promising for further study as producers of biologically active compounds, stimulators of plant growth and development, or pollutant degraders. Thus, isolates from both the rhizosphere and endosphere of *H. Zundukii* may possess traits useful for biotechnology and require further study.

Keywords: *Hedysarum zundukii*, Fabaceae, rhizosphere microorganisms, endophytic microorganisms

Funding. The Russian Science Foundation (project no. 23-26-00204) financially supported the work.

For citation: Vasilev I.A., Krivenko D.A., Petrushin I.S., Kondratov I.G., Ogarkov O.B., Markova Yu.A. Microorganisms inhabiting the endo- and rhizosphere of *Hedysarum zundukii* (Fabaceae) endemic to the Baikal region. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):545-551. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-545-551. EDN: EMVBJK.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день имеется достаточно сведений о взаимосвязи между растениями и микроорганизмами [1, 2]. Известно, что бактерии обеспечивают дополнительную устойчивость растений к неблагоприятным факторам окружающей среды, таким как недостаток питательных веществ в почве [3], наличие антропогенного загрязнения [4], присутствие фитопатогенов [1] и т.д. Это достигается с помощью микробного биосинтеза фитогормонов, осмотеректоров и антибиотиков, деструкции загрязнителей, участия в структурировании почвы [5–8].

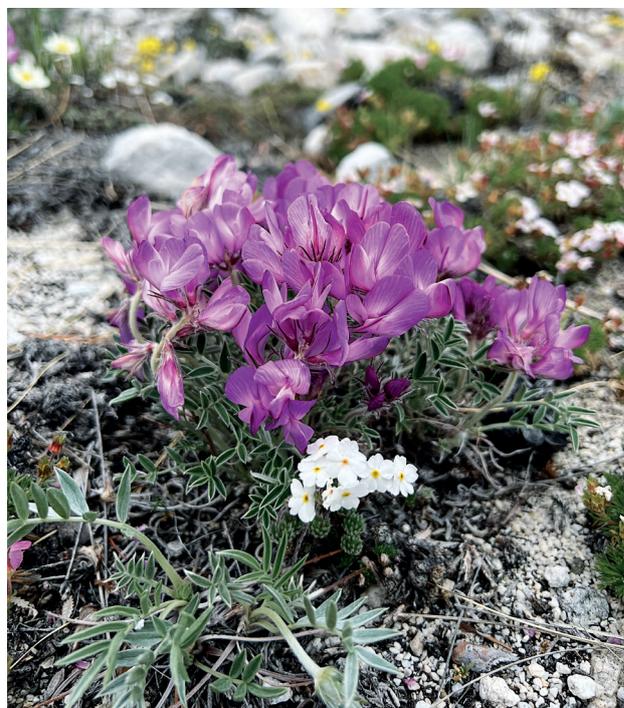
Все вышеизложенное обуславливает использование микроорганизмов в составе различных биопрепаратов, направленных на стимуляцию роста и защиту растений [8, 9]. Несмотря на значительное количество таких препаратов, поиск новых штаммов, обладающих ценными свойствами, по-прежнему актуален. Также актуальным остается и изучение механизмов их взаимодействия с растениями [9].

Для поиска подобных микроорганизмов логично использовать ризо- или эндосферу растений, произрастающих в неблагоприятных условиях среды обитания. Это связано с тем, что растения сами проводят первичную «селекцию» бактерий, отбирая штаммы, которые обладают наиболее ценными признаками, способствующими увеличению их адаптационного потенциала [10].

Приольхонье (Ольхонский район Иркутской области) характеризуется бедными каменистыми почвами с высоким содержанием кальция. Также для данной территории свойственно малое количество осадков, экстремальные перепады температур, высокая инсоляция [11]. Растения, произрастающие на данной территории, большей частью являются ксерофитами и кальцефилами. Мы предположили, что микроорганизмы, обитающие в ризо- или эндосфере этих растений, должны обладать свойствами, перспективными для использования в биотехнологии.

В качестве объекта представленного исследования был выбран *Hedysarum zundukii* Peschkova (копеечник зундукский) – многолетнее стержнекорневое травянистое растение с укороченным стеблем, серовато-белое от густого опушения. Цветоносы его немногочисленные, цветки крупные, розовые, собраны в верхушечное головчатое соцветие, которое слегка возвышается над листьями

(рисунок). Это горностепной вид, петрофит, облигатный кальцефил, произрастающий на щебнистых карбонатных склонах и их шлейфах в составе петрофитных низкотравных степей. Он является узколокальным эндемиком, реликтом миоценовой пустынно-степной флоры [12], ареал данного вида ограничен прерывистым отрезком узкой прибрежной полосы западного побережья оз. Байкал от мыса Ото-Хушун на юге до мыса Зама на севере [13]. *H. zundukii* – редкий вид, находящийся под угрозой исчезновения, он занесен в Красную книгу Российской Федерации [14] и Красную книгу Иркутской области [15]. Целью проведенной работы было выделение и описание микроорганизмов, населяющих эндо- и ризосферу *H. zundukii*.



Общий вид растения *Hedysarum zundukii* (Иркутская область, Ольхонский район, западное побережье оз. Байкал, мыс Харгантуй)

General view of the plant *Hedysarum zundukii* (Irkutsk region, Olkhonsky district, west coast of Lake Baikal, Cape Khargantuy)

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Отбор проб проводили в пределах ареала обитания вида *H. zundukii* на западном побережье оз. Байкал на мысе Харгантуй (53°23'10.9"N, 107°23'27.8"E) в июле 2022 г. Были выбраны взрослые здоровые особи *H. zundukii*, находящиеся в средневозрастном онтогенетическом состоянии. С помощью стерильного инструмента отбирали ризосферную почву, затем корневую систему освобождали от грунта и отрезали участки корней длиной 7–8 см. Образцы помещали в 50 мл пробирки и хранили в стерильном 20%-м растворе глицерина при 4 °С.

Для выделения микроорганизмов 1 г ризосферной почвы шестикратно разводили стерильной водопроводной водой. Посев почвенной суспензии проводили из разведений 1:10, 1:100, 1:1000 и т.д. в зависимости от таксономической принадлежности учитываемых микроорганизмов. Корни стерилизовали в 10%-м растворе перекиси водорода в течение 30 мин, затем отмывали стерильной водопроводной водой и гомогенизировали. Полученный гомогенат высевали на плотные питательные среды: Эшби, Чапека, крахмало-аммиачный агар и сухой агар на основе гидролизата говяжьего мяса ферментативного (Научно-исследовательский центр фармакотерапии, г. Санкт-Петербург).

Для идентификации микроорганизмов бактериальные клетки суспендировали в 50 мкл буфера TE (10 mM трис-HCl, 1 mM этилендиаминтетрауксусная кислота) с 10 мкг/мл лизоцима и инкубировали при комнатной температуре 10 мин. Тотальную ДНК из клеток выделяли с использованием набора «РибоПреп» («АмплиСенс», Россия) по протоколу фирмы-производителя с дополнительной экстракцией водной фазы нейтральным фенолом. Амплификацию 16S–23S региона рРНК осуществляли с использованием олигонуклеотидных праймеров 27F AGAGTTTGACTMTGGCTCAG и 2490R CACATGGAGGTGCCAAAC в 20 мкл реакционной смеси с использованием высокоточной полимеразы Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. Анализ ампликонов проводили в стандартной трис-ацетатной системе в 0,8%-м агарозном геле. Очистку ампликонов для проведения секвенирующей реакции проводили с использованием набора ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. Секвенирование ампликонов проводили с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США) также по протоколу фирмы-производителя. Анализ секвенирующих реакций проводили на генетическом анализаторе НАНОФОР 05 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) на базе Центра коллективного пользования «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека. Полученные последовательности сравнивали с базой данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) с использованием программы BLAST¹.

Для оценки способности выделенных штаммов растворять ортофосфат кальция использовали среду Муромцева следующего состава: глюкоза – 10,00 г/л, аспарагин – 1 г/л, K₂SO₄ – 0,20 г/л, MgSO₄·7H₂O – 0,20 г/л, дрожжевой экстракт – 0,02 г/л, Ca₃(PO₄)₂ – 10,00 г/л, агар – 14,00 г/л, pH = 7. Результат определяли через 7 суток по появлению зоны просветления вокруг колонии микроорганизмов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проделанной работы было выделено 88 штаммов микроорганизмов: 31 – из эндосферы и 57 – из ризосферы (табл. 1). Как в ризо-, так и в эндосфере преобладали грамположительные микроорганизмы (60 и 61% соответственно). Грамположительные бактерии в ризосфере представлены преимущественно актиномицетами (47%), в эндосфере – бациллами (37%).

Таблица 1. Разнообразие штаммов микроорганизмов, выделенных из ризо- и эндосферы *Hedysarum zundukii*

Table 1. Diversity of microorganism strains isolated from the rhizo- and endosphere of *Hedysarum zundukii*

Микроорганизмы	Ризосфера	Эндосфера
Грамотрицательные бактерии	19	10
Грамположительные бактерии	34	19
из них <i>Bacillus</i>	6	7
из них <i>Actinomyces</i>	16	2
Микромицеты	4	0
Всего	57	31

С помощью молекулярно-генетических методов было идентифицировано 28 штаммов бактерий (табл. 2). Три идентифицированных из ризосферы изолята относятся к семейству *Rhizobiaceae*: это *Phyllobacterium zundukense* и два штамма *Sinorhizobium* sp. Особого внимания заслуживает *Phyllobacterium zundukense*. Ранее этот вид ризобий был выявлен в корневых клубеньках бобового растения *Oxytropis triphylla* (Pall.) DC., также произрастающего на западном побережье оз. Байкал [16]. Его обнаружение в ризосфере *H. zundukii* позволяет предположить, что данный микроорганизм является обычным обитателем почв исследуемого региона.

Из грамотрицательных изолятов следует обратить внимание на *Lysobacter* sp. и *Variovorax paradoxus*. Представители рода *Lysobacter* характеризуются способностью синтезировать антибиотики и белки с антимикробным действием [17]. *Variovorax paradoxus* используют для повышения урожайности и защиты растений, а также в качестве деструктора различных полиантонов [18].

Класс Actinomycetia представлен 10 штаммами микроорганизмов, относящихся к трем порядкам: Mycobacteriales (*Mycolicibacterium* sp., *Rhodococcus* sp.); Micrococcales (*Curtobacterium*, *Agromyces* и *Microbacterium*); Streptomycetales (шесть штаммов рода *Streptomyces*).

¹BLAST // National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. Режим доступа: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения: 25.07.2023).

Таблица 2. Идентифицированные штаммы бактерий, выделенных из *Hedysarum zundukii*

Table 2. Identified strains of bacteria isolated from *Hedysarum zundukii*

Биом	Количество штаммов	Идентифицированные изоляты	Индексы GenBank
Эндосфера	3	<i>Moraxella</i> sp. strain Hz 62-2	OR699078
		<i>Peribacillus</i> sp. strain Hz 6	OR699060
		<i>Xanthomonas</i> sp. strain Hz 66	OR699079
Ризосфера	25	<i>Curtobacterium</i> sp. strain Hz 35-3	OR699074
		<i>Lysobacter</i> sp. strain Hz 25	OR699069
		<i>Microbacterium</i> sp. strain Hz 12	OR699064
		<i>Mycolicibacterium</i> sp. strain Hz 35-2	OR699073
		<i>Paenibacillus</i> sp. strain Hz 54-2	OR699077
		<i>Pantoea</i> sp. strain Hz 68	OR699080
		<i>Phyllobacterium</i> sp. strain Hz 48	OR699076
		<i>Pseudomonas</i> sp. strain Hz 19	OR699067
		<i>Rhodococcus</i> sp. Hz 102	OR673959
		<i>Sinorhizobium</i> sp. strain Hz 92	OR699083
		<i>Sinorhizobium</i> sp. strain Hz 95	OR699084
		<i>Stenotrophomonas</i> sp. strain Hz 103	OR699081
		<i>Streptomyces</i> sp. strain Hz110	OR699082
		<i>Streptomyces</i> sp. strain Hz 9	OR699062
		<i>Variovorax</i> sp. strain Hz 5	OR699059
		<i>Agromyces</i> sp. strain Hz 13	OR699065
		<i>Actinoplanes</i> sp. strain Hz 27	OR699070
		<i>Pantoea</i> sp. strain Hz 18	OR699066
		<i>Bacillus mycoides</i> strain Hz 7	OR699061
		<i>Peribacillus</i> sp. strain Hz 4	OR699058
<i>Streptomyces</i> sp. strain Hz 32	OR699072		
<i>Streptomyces</i> sp. strain Hz 10	OR699063		
<i>Streptomyces</i> sp. strain Hz 21	OR699068		
<i>Bacillus</i> sp. (in: firmicutes) strain Hz 29	OR699071		
<i>Streptomyces</i> sp. strain Hz40	OR699075		

Преобладание актиномицет можно рассматривать как адаптационный признак, учитывая, что их количество возрастает в условиях засухи [19].

Известно, что одним из перспективных направлений улучшения фосфорного питания сельскохозяйственных культур является биологическая фосфатмобилизация [20]. Из ризосферных штаммов только 12 были способны растворять ортофосфат кальция, в том числе *Bacillus mycoides* strain Hz 7, *Pantoea* sp. strain Hz 18, *Phyllobacterium* sp. strain Hz 48 и *Pseudomonas* sp. strain Hz 19. При этом ни один из штаммов, выделенных из эндосферы, способностью растворять ортофосфат кальция не обладал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени из эндо- и ризосферы редкого эндемичного вида западного побережья оз. Байкал *H. zundukii* нами выделено 88 штаммов микроорганизмов (31 – из эндосферы и 57 – из ризосферы). В ризосфере подавляющее большинство штаммов относится к актиномицетам, а в эндосфере – к бациллам. Штаммы, относящиеся к классу Actinomycetia, представляют интерес в качестве продуцентов биологически активных соединений, в том числе антибиотиков. Грамотрицательные бактерии *Lysobacter* sp. и *Variovorax paradoxus* перспективны для дальнейшего изучения в области стимуляции роста и развития растений, а также деструкции поллютантов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Gamalero E., Bona E., Glick B.R. Current techniques to study beneficial plant-microbe interactions // *Microorganisms*. 2022. Vol. 10, no. 7. P. 1380. DOI: 10.3390/microorganisms10071380.
2. Zolla G., Badri D.V., Bakker M.G., Manter D.K., Vivanco J.M. Soil microbiomes vary in their ability to confer drought tolerance to *Arabidopsis* // *Applied Soil Ecology*. 2013. Vol. 68. P. 1–9. DOI: 10.1016/j.apsoil.2013.03.007.
3. Kour D., Rana K.L., Kaur T., Sheikh I., Yadav A.N., Kumar V., et al. Microbe-mediated alleviation of drought stress and acquisition of phosphorus in great millet (*Sorghum bicolor* L.) by drought-adaptive and phosphorus-solubilizing microbes // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020. Vol. 23. P. 101501. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101501.
4. Rane N.R., Tapase S., Kanojia A., Watharkar A., Salama E.-S., Jang M., et al. Molecular insights into plant-microbe interactions for sustainable remediation of contaminated environment // *Bioresource Technology*. 2022. Vol. 344. P. 126246. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.126246.
5. Costa O.Y.A., Raaijmakers J.M., Kuramae E.E. Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation // *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9. P. 1636. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01636.
6. Gorgi O.E., Fallah H., Niknejad Y., Tari D.B. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and mycorrhizal fungi inoculations on essential oil in *Melissa officinalis* L. under drought stress // *Biologia*. 2022. Vol. 77. P. 11–20. DOI: 10.1007/s11756-021-00919-2.
7. Xu L., Pierroz G., Wipf H.M.-L., Gao C., Taylor J.W., Lemaux P.G., et al. Holo-omics for deciphering plant-microbiome interactions // *Microbiome*. 2021. Vol. 9. P. 69. DOI: 10.1186/s40168-021-01014-z.
8. Petrushin I.S., Vasilev I.A., Markova Yu.A. Drought tolerance of legumes: physiology and the role of the microbiome // *Current Issues in Molecular Biology*. 2023. Vol. 45, no. 8. P. 6311–6324. DOI: 10.3390/cimb45080398.
9. Ali S., Tyagi A., Park S., Mir R.A., Mushtaq M., Bhat B., et al. Deciphering the plant microbiome to improve drought tolerance: mechanisms and perspectives // *Environmental and Experimental Botany*. 2022. Vol. 201. P. 104933. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2022.104933.
10. Rolli E., Vergani L., Ghitti E., Patania G., Mapelli F., Borin S. ‘Cry-for-help’ in contaminated soil: a dialogue among plants and soil microbiome to survive in hostile conditions // *Environmental Microbiology*. 2021. Vol. 23, no. 10. P. 5690–5703. DOI: 10.1111/1462-2920.15647.
11. Белозерцева И.А., Лопатина Д.Н., Зверева Н.А. Почвы восточного Приольхонья на побережье озера Байкал: современное состояние и использование // Бюллетень Почвенного института имени В.В. Докучаева. 2019. N 97. С. 21–51. DOI: 10.19047/0136-1694-2019-97-21-51. EDN: UAIHJB.
12. Пешкова Г.А. Флорогенетический анализ степной флоры гор Южной Сибири. Новосибирск: Наука, 2001. 192 с.
13. Карнаухова Н.А., Селютина И.Ю., Казановский С.Г., Черкасова Е.С. Онтогенез и структура ценопопуляций *Hedysarum zundukii* (Fabaceae) – эндемика западного побережья озера Байкал // *Ботанический журнал*. 2008. Т. 93. N 5. С. 744–755. EDN: JTCQJT.
14. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / ред. Ю.П. Трутнев, Р.Р. Гизатулин, О.Л. Митволь, А.М. Амирханов, Р.В. Камелин, В.А. Орлов [и др.]. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. 885 с. EDN: TCNFXR.
15. Красная книга Иркутской области / ред. С.М. Трофимова; отв. ред. В.В. Попов; сост. М.Г. Азовский, С.С. Алексеев, В.А. Барицкая, А.Д. Ботвинкин, Н.А. Букушук, А.В. Верховина. Улан-Удэ: Республиканская типография, 2020. 552 с. EDN: LWLAJL.
16. Safronova V.I., Sazanova A.L., Kuznetsova I.G., Belimov A.A., Andronov E.E., Chirak E.R., et al. *Phyllobacterium zundukense* sp. nov., a novel species of rhizobia isolated from root nodules of the legume species *Oxytropis triphylla* (Pall.) Pers. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018. Vol. 68, no. 5. P. 1644–1651. DOI: 10.1099/ijsem.0.002722.
17. Panthee S., Hamamoto H., Paudel A., Sekimizu K. *Lysobacter* species: a potential source of novel antibiotics // *Archives of Microbiology*. 2016. Vol. 198. P. 839–845. DOI: 10.1007/s00203-016-1278-5.
18. Han J.-I., Spain J.C., Leadbetter J.R., Ovchinnikova G., Goodwin L.A., Han C.S., et al. Genome of the root-associated plant growth-promoting bacterium *Variovorax paradoxus* strain EPS // *Genome Announcements*. 2013. Vol. 1, no. 5. P. e00843-13. DOI: 10.1128/genomea.00843-13.
19. Naylor D., DeGraaf S., Purdom E., Coleman-Derr D. Drought and host selection influence bacterial community dynamics in the grass root microbiome // *The ISME Journal*. 2017. Vol. 11. P. 2691–2704. DOI: 10.1038/ismej.2017.118.
20. Чайковская Л.А., Овсиенко О.Л. Фосфатмобилизующие микроорганизмы: 1. Биоразнообразие, влияние на минеральное питание растений и их продуктивность // *Таврический вестник аграрной науки*. 2021. N 4. С. 159–182. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-4-28-159-182. EDN: NBZFFEN.

REFERENCES

1. Gamalero E., Bona E., Glick B.R. Current techniques to study beneficial plant-microbe interactions. *Microorganisms*. 2022;10(7):1380. DOI: 10.3390/microorganisms10071380.
2. Zolla G., Badri D.V., Bakker M.G., Manter D.K., Vivanco J.M. Soil microbiomes vary in their ability to confer drought tolerance to *Arabidopsis*. *Applied Soil Ecology*. 2013;68:1-9. DOI: 10.1016/j.apsoil.2013.03.007.
3. Kour D., Rana K.L., Kaur T., Sheikh I., Yadav A.N., Kumar V., et al. Microbe-mediated alleviation of drought stress and acquisition of phosphorus in great millet (*Sorghum bicolor* L.) by drought-adaptive and phosphorus-solubilizing microbes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020;23:101501. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101501.
4. Rane N.R., Tapase S., Kanojia A., Watharkar A., Salama E.-S., Jang M., et al. Molecular insights into plant-microbe interactions for sustainable remediation of contaminated environment. *Bioresource Technology*. 2022;344:126246. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.126246.
5. Costa O.Y.A., Raaijmakers J.M., Kuramae E.E. Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:1636. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01636.

6. Gorgi O.E., Fallah H., Niknejad Y., Tari D.B. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and mycorrhizal fungi inoculations on essential oil in *Melissa officinalis* L. under drought stress. *Biologia*. 2022;77:11-20. DOI: 10.1007/s11756-021-00919-2.
7. Xu L., Pierroz G., Wipf H.M.-L., Gao C., Taylor J.W., Lemaux P.G., et al. Holo-omics for deciphering plant-microbiome interactions. *Microbiome*. 2021;9:69. DOI: 10.1186/s40168-021-01014-z.
8. Petrushin I.S., Vasilev I.A., Markova Yu.A. Drought tolerance of legumes: physiology and the role of the microbiome. *Current Issues in Molecular Biology*. 2023;45(8):6311-6324. DOI: 10.3390/cimb45080398.
9. Ali S., Tyagi A., Park S., Mir R.A., Mushtaq M., Bhat B., et al. Deciphering the plant microbiome to improve drought tolerance: mechanisms and perspectives. *Environmental and Experimental Botany*. 2022;201:104933. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2022.104933.
10. Rolli E., Vergani L., Ghitti E., Patania G., Mapelli F., Borin S. 'Cry-for-help' in contaminated soil: a dialogue among plants and soil microbiome to survive in hostile conditions. *Environmental Microbiology*. 2021;23(10):5690-5703. DOI: 10.1111/1462-2920.15647.
11. Belozertseva I.A., Lopatina D.N., Zvereva N.A. Soils of the eastern Priol'khonye on the coast of the Lake Baikal: current state and use. *Byulleten' Pochvennogo instituta imeni V.V. Dokuchaeva = Dokuchaev Soil Bulletin*. 2019;(97):21-51. (In Russian) DOI: 10.19047/0136-1694-2019-97-21-51. EDN: UAIHJB.
12. Peshkova G.A. *Florogenetic analysis of the steppe flora of Southern Siberia mountains*. Novosibirsk. Nauka; 2001, 192 p. (In Russian).
13. Karnaukhova N.A., Seluytina I.Yu., Kazanovsky S.G., Cherkasova E.S. Ontogenesis and age structure of *Hedysarum zundukii* (Fabaceae), an endemic species of the western coast of Baikal Lake. *Botanicheskii zhurnal*. 2008;93(5):744-755. (In Russian). EDN: JTCQJT.
14. Trutnev Yu.P., Gizatuln P.P., Mitvol' O.L., Amirhanov A.M., Kamelin R.V., Orlov V.A., et al. *Red Book of the Russian Federation (plants and fungi)*. Moscow: Tovarischestvo nauchnykh izdaniy KMK; 2008, 885 p. (In Russian). EDN: TCNFXR.
15. Azovskii M.G., Alekseev S.S., Baritskaya V.A., Botvinkin A.D., Bukshuk N.A., Verkhovina A.V., et al. *Red Book of the Irkutsk Region*. Ulan-Ude: Respublikanskaya tipografiya; 2020, 552 p. (In Russian). EDN: LWLAJL.
16. Safronova V.I., Sazanova A.L., Kuznetsova I.G., Belimov A.A., Andronov E.E., Chirak E.R., et al. *Phyllobacterium zundukense* sp. nov., a novel species of rhizobia isolated from root nodules of the legume species *Oxytropis triphylla* (Pall.) Pers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018;68(5):1644-1651. DOI: 10.1099/ijsem.0.002722.
17. Panthee S., Hamamoto H., Paudel A., Sekimizu K. *Lysobacter* species: a potential source of novel antibiotics. *Archives of Microbiology*. 2016;198:839-845. DOI: 10.1007/s00203-016-1278-5.
18. Han J.-I., Spain J.C., Leadbetter J.R., Ovchinnikova G., Goodwin L.A., Han C.S., et al. Genome of the root-associated plant growth-promoting bacterium *Variovorax paradoxus* strain EPS. *Genome Announcements*. 2013;1(5):e00843-13. DOI: 10.1128/genomea.00843-13.
19. Naylor D., DeGraaf S., Purdom E., Coleman-Derr D. Drought and host selection influence bacterial community dynamics in the grass root microbiome. *The ISME Journal*. 2017;11:2691-2704. DOI: 10.1038/ismej.2017.118.
20. Chaikovskaya L.A., Ovsienko O.L. Phosphate-mobilizing microorganisms: 1. Biodiversity, influence on plants mineral nutrition and productivity. *Tavrisheskii vestnik agrarnoi nauki = Taurida Herald of the Agrarian Sciences*. 2021;4:159-182. (In Russian). DOI: 10.33952/2542-0720-2021-4-28-159-182 EDN: NBZFEN.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Васильев Илья Александрович,

аспирант, ведущий инженер,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
ilvasil85@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0005-3793-4493>

Кривенко Денис Александрович,

к.б.н., ведущий научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
krivenko.irk@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2658-1723>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ilya A. Vasilev,

Postgraduate Student, Leading Engineer,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
ilvasil85@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0005-3793-4493>

Denis A. Krivenko,

Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
krivenko.irk@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2658-1723>

Петрушин Иван Сергеевич,

к.т.н., научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
ivan.kiel@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-8788-5352>

Кондратов Илья Геннадьевич,

к.б.н., научный сотрудник,
Научный центр проблем здоровья семьи
и репродукции человека,
664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16,
Российская Федерация,
kondratovig@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>

Огарков Олег Борисович,

д.м.н., руководитель отдела
эпидемиологии и микробиологии,
Научный центр проблем здоровья семьи
и репродукции человека,
664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16,
Российская Федерация,
obogarkov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3168-1983>

Маркова Юлия Александровна,

д.б.н., главный научный сотрудник,
заведующий лабораторией,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
✉juliam06@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7767-4204>

Ivan S. Petrushin,

Cand. Sci. (Engineering), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
ivan.kiel@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-8788-5352>

Ilya G. Kondratov,

Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Scientific Centre for Family Health
and Human Reproduction Problems,
16, Timiryazev St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
kondratovig@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>

Oleg B. Ogarkov,

Dr. Sci. (Medicine), Head of Department
of Epidemiology and Microbiology,
Scientific Centre for Family Health
and Human Reproduction Problems,
16, Timiryazev St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
obogarkov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3168-1983>

Yuliya A. Markova,

Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher,
Head of the Laboratory,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉juliam06@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7767-4204>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 03.08.2023.
Одобрена после рецензирования 30.10.2023.
Принята к публикации 31.10.2023.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

Information about the article

The article was submitted 03.08.2023.
Approved after reviewing 30.10.2023.
Accepted for publication 31.10.2023.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 58.085+581.142:582.89
EDN: GWEXFT
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-552-560



Особенности прорастания семян и введение в культуру *in vitro* *Saposhnikovia divaricata* (Turcz. ex Ledeb.) Schischk.

Т.В. Елисафенко*✉, Т.В. Железниченко*, П.Н. Югрина*,
Б.М. Жигмитцыренова*,**, М.В. Казаков*,**, В.В. Тараскин**

*Центральный Сибирский Ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация

**Байкальский институт природопользования СО РАН, г. Улан-Удэ, Российская Федерация

Аннотация. Изучено влияние условий хранения, обработки мерикарпиев, режима проращивания семян эндемика *Saposhnikovia divaricata* (Turcz. ex Ledeb.) Schischk. на прорастание. Отработана технология получения асептической культуры *in vitro*. Исследовали мерикарпии, собранные с интродуцентов в 2022 г. Стерилизацию эксплантов проводили однократно или дважды 0,1%-м AgNO_3 либо 0,1%-м AgNO_3 , а затем 10%-й H_2O_2 . Со стерилизованных мерикарпиев удаляли околоплодник и проращивали семена на твердой среде 1/2 Мурасиге – Скуга. Каллусогенез стимулировали, культивируя настоящие листья проростков на среде Мурасиге – Скуга с 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (10 мкМ) и 6-бензиламинопурином (0–5 мкМ) в темноте. Семена *S. divaricata* имеют неглубокий покой, а наиболее благоприятными условиями для их прорастания являются стратификация в течение 30 дней при 4 °С или скарификация мерикарпиев, проращивание в климатокамере (фотопериод 16,5 ч и дневная температура 27 °С с незначительным ее понижением ночью). Лабораторная всхожесть достигает 94%. Отсутствие целых семян в конце опыта предполагает низкий банк семян в почве, что обуславливает уязвимость природных популяций наряду с монокарпичностью. Получена культура *in vitro* *S. divaricata*. Удаление околоплодника с мерикарпиев ускоряет прорастание, увеличивает всхожесть и значительно снижает контаминацию. На среде только с ауксином каллус формировался у 66% эксплантов на черешках листа, а на среде с ауксином и цитокинином – у 72% эксплантов по всей поверхности листовой пластинки. Дальнейшее развитие каллуса происходило только на среде с ауксинами.

Ключевые слова: каллусогенез, мерикарпии, семена, сапожниковия растопыренная, экспланты

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-24-00445).

Для цитирования: Елисафенко Т.В., Железниченко Т.В., Югрина П.Н., Жигмитцыренова Б.М., Казаков М.В., Тараскин В.В. Особенности прорастания семян и введение в культуру *in vitro* *Saposhnikovia divaricata* (Turcz. ex Ledeb.) Schischk. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 552–560. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-552-560. EDN: GWEXFT.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Germination specifics and introduction into *in vitro* culture of *Saposhnikovia divaricata* (Turcz. ex Ledeb.) Schischk.

Tatyana V. Elisafenko*✉, Tatiana V. Zheleznichenko*, Polina N. Yugrina*,
Bayarma M. Zhigmittsyrenova*,**, Maksim V. Kazakov*,**, Vasilii V. Taraskin**

*Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

**Baikal Institute of Nature Management SB RAS, Ulan-Ude Buryatia, Russian Federation

Abstract. The article examines the effect of storage conditions, mericarp processing, and germination conditions of the endemic *Saposhnikovia divaricata* (Turcz. ex Ledeb.) Schischk. on germination. The technological process of obtaining aseptic *in vitro* culture was perfected. Mericarps collected from introduced species in 2022 were

© Елисафенко Т.В., Железниченко Т.В., Югрина П.Н., Жигмитцыренова Б.М., Казаков М.В., Тараскин В.В., 2023

examined. Explants were sterilized once or twice with 0.1% AgNO₃ or 0.1% AgNO₃, followed by the use of 10% H₂O₂. The pericarp was removed from the sterilized mericarps, and seeds were germinated on a solid 1/2 Murashige and Skoog medium. Callus genesis was induced by culturing the true leaves of seedlings on a Murashige and Skoog medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (10 μM) and 6-benzylaminopurine (0–5 μM) in the dark. The seeds of *S. divaricata* exhibit shallow dormancy, and the most favorable conditions for their germination are stratification for 30 days at 4 °C or the scarification of mericarps and germination in an environmental chamber (photoperiod of 16.5 h and a daytime temperature of 27 °C with its slight decrease at night). Laboratory germination capacity reaches 94%. The absence of whole seeds at the end of the experiment suggests a small soil seed bank, which accounts for the vulnerability of natural populations along with monocarpy. The *in vitro* culture of *S. divaricata* was obtained. Pericarp removal from mericarps was shown to accelerate germination and improve germination capacity while significantly reducing contamination. A callus was formed on leaf petioles in 66% of explants on an auxin medium, while on a medium with auxin and cytokinin, it was formed across the entire surface of the leaf blade in 72% of explants. Further callus development occurred only on the auxin medium.

Keywords: callus genesis, mericarps, seeds, *Saposhnikovia divaricata*, explants

Funding. The Russian Science Foundation (grant no. 23-24-00445) funded this research.

For citation: Elisafenko T.V., Zheleznichenko T.V., Yugrina P.N., Zhigmittsyrenova B.M., Kazakov M.V., Taraskin V.V. Germination specifics and introduction into *in vitro* culture of *Saposhnikovia divaricata* (Turcz. ex Ledeb.) Schischk. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):552-560. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-552-560. EDN: GWEXFT.

ВВЕДЕНИЕ

Общеизвестно, что широкое использование лекарственных растений из природных популяций представляет угрозу их существованию. *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. (сапожниковия растопыренная) относится к видам растений с высоким фармакологическим потенциалом, и спрос на ее сырье, а именно корни, в мире, особенно в странах Восточной Азии, очень высок. Установлено, что они обладают анальгезирующими, противовоспалительными свойствами, противораковой, противомикробной, противогрибковой, жаропонижающей, противоаллергической, а также антиоксидантной и антипролиферативной активностью [1–6]. В нашей стране в последние годы ведется интенсивная добыча корней в природных популяциях в регионах Южной Сибири и Дальнего Востока (Республика Бурятия, Забайкальский край, Амурская область) [7]. Ввиду высокого спроса возникла проблема недостатка сырья и угроза сокращения природных популяций *S. divaricata*. В настоящее время предпринимаемые меры, в том числе включение данного вида в списки Красных книг Забайкальского края Российской Федерации и Монгольской Народной Республики [8], а также его интродукция в Китае (выращивается в 10 провинциях) [9], остаются недостаточными, а работы по культивированию *S. divaricata in vitro* в России единичны [10–12]. В связи с этим актуальным является исследование особенностей и разработка способов размножения *S. divaricata ex situ* и *in vitro*. До сих пор не существует протоколов получения растительных регенерантов как по прямому, так и по непрямому пути регенерации, не получены искусственные семена, недостаточно данных о суспензионном культивировании, которые могут оказаться эффективными в плане синтеза вторичных метаболитов. Целью данной работы является определение оптимальных условий хранения и проращивания семян *S. divaricata* и получение асептической хорошо растущей культуры *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

S. divaricata (сапожниковия растопыренная) – травянистый стержнекорневой многолетник семейства

Ариáceе (Зонтичные). Материалом для экспериментов послужили семена интродуцентов второго поколения, выращенные в Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН (г. Новосибирск) (сбор урожая 2022 г.). Изначально вид интродуцирован семенами, собранными в 2016–2017 гг. в окрестностях горы Спящий Лев в Тарбагатайском районе Республики Бурятия.

Плод *S. divaricata* вислоплодник, состоит из двух мерикарпиев. Внутри каждого мерикарпия находится семя с тонкой семенной кожурой, эндоспермом и небольшим зародышем (рис. 1) [13]. Хранение и проращивание семян осуществляется с околоплодником (в виде мерикарпиев).

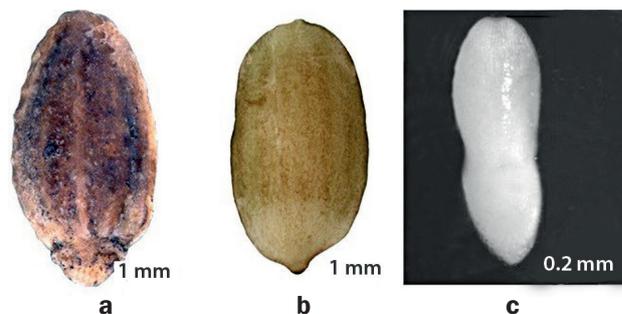


Рис. 1. Мерикарпий (а), семя (б) и зародыш (с) *Saposhnikovia divaricata*

Fig. 1. Mericarpia (a), seeds (b) and embryo (c) of *Saposhnikovia divaricata*

Проращивание семян. Для определения влияния условий хранения, обработки и проращивания семян опыт закладывали в 3–4-кратной повторности в чашках Петри на комбинированном ложе (кварцевый стерильный песок и бумажный фильтр). Продолжительность опыта составляла 40–70 дней в зависимости от режима проращивания семян (табл. 1). Изучали влияние условий хранения сухих семян (мерикарпиев) в течение 6 месяцев: комнатные условия (23 °C), холодильная камера (4 °C), морозильная камера (минус 18 °C). Семена проращивали в лабораторных условиях при 23 °C. Для определения влияния

Таблица 1. Характеристика прорастания мерикарпиев (семян) *Saposhnikovia divaricata*

Table 1. Characteristics of germination of *Saposhnikovia divaricate* mericarpia (seeds)

Условия опыта			Период до прорастания, дни	Период прорастания, дни	Всхожесть, %	Энергия прорастания, %	Интенсивность энергии прорастания, %
хранение семян	проращивание	состояние семян					
4 °С	23 °С	мерикарпии	11,0±0,6 10-12	47,3±1,8 44-50	54,7±2,9 50-60	7,3±0,7 6-8	13,4±0,8 12-15
-18 °С	23 °С		10,3±0,3 10-11	50,0±1,5 48-53	61,3±2,4 58-66	4,0±1,2 2-6	6,6±2,0 3-10
23 °С	23 °С		14,0±3,5 10-21	40,7±4,4 34-49	76,7±3,7 72-84	8,0±4,0 4-16	10,0±4,5 5-19
	климатостат		7,7±0,3 7-10	32,7±5,5 22-44	72,7±4,8 56-82	20,0±4,0 14-28	27,1±3,6 23-34
	климатокамера		10-12 11,0±0,6	14,7±0,7 14-16	68,0±7,2 58-82	55,3±4,8 46-62	81,8±4,5 76-91
	стратификация 1		28,0±0,0/2,0±0,0 28/2*	29,8±1,9 24-32	83,5±1,7 82-88	37,0±3,4 28-44	44,3±4,0 35-54
	стратификация 2		25,5±0,5/7,5±0,5 26-24/8-6*	40,8±4,6 30-51	43,5±3,9 34-50	36±4,9 24-44	81,6±4,1 71-88
	23 °С		скарификация мерикарпиев	5,8±0,4 5-8	32,9±2,0 20-37	67,5±5,7 48-94	29,5±6,9 10-66
23 °С	удаление околоплодника		5,0±0,0 5	19,3±1,6 16-22	40,5±7,1 26-60	22,5±7,9 12-46	51,8±8,5 42-77

Примечание. «Стратификация 1» – 30 дней (4 °С), климатостат; «стратификация 2» – 18 дней (4 °С), климатостат; * – период до прорастания после перемещения в климатостат. Над чертой – среднее арифметическое и его ошибка, под чертой – диапазон показателей.

на семена предварительной обработки в комнатных условиях были заложены неповрежденные мерикарпии, механически скарифицированные мерикарпии и семена без околоплодника.

Для определения оптимального режима проращивания семян после хранения в комнатных условиях чашки с мерикарпиями помещали: на стеллаж в комнатных условиях (23 °С); в климатостат КС-200 СПУ (Смоленское специальное конструкторско-технологическое бюро систем программного управления, Россия) с продолжительностью фотопериода 16,5 ч и температурой дневной 27 °С, ночной 17 °С; в климатокамеру (закрытый стеллаж с лампами ДРАФ и таймером) с продолжительностью фотопериода 16,5 ч и температурой дневной 27 °С, ночной 23 °С. Кроме того, изучали влияние стратификации. Чашки с увлажненными мерикарпиями помещали в холодильную камеру (4 °С). Учет проросших семян проводили ежедневно. Результаты опыта включают следующие данные: длительность периода от начала опыта до прорастания семян, продолжительность периода прорастания (от начала прорастания), всхожесть семян (%), энергию прорастания (%), интенсивность энергии прорастания (%). Энергия прорастания представляет собой процент семян, проросших в первые семь дней от начала прорастания, интенсивность энергии прорастания определяли как отношение энергии прорастания к всхожести [14]. Результаты опыта представляли согласно разработанным ранее рекомендациям [14].

Эксплантами для введения в культуру *in vitro* служили зрелые мерикарпии интродуцентов второго поколения, хранившихся в комнатных условиях, того же происхождения, что и в опытах с прорастанием семян. Мерикарпии предварительно промывали мыльным раствором, затем

проточной водой, опускали в 70%-й спирт на 2 мин и снова промывали водой. После этого в условиях ламинарного бокса проводили стерилизацию полученного материала 0,1%-м раствором AgNO₃ («ЛенРеактив», Россия) в течение 10 мин. Стерилизованный материал промывали трехкратно стерильной водой по 10 мин. Также была проведена ступенчатая стерилизация. Сначала мерикарпии стерилизовали так же, как описано выше, затем их оставляли при комнатной температуре в стерильных чашках Петри на сутки, после чего стерилизовали повторно 0,1%-м AgNO₃ или 10%-й H₂O₂ («Химпэк», Россия) в течение 10 мин. Со стерильных промытых мерикарпиев снимали околоплодник и переносили их на безгормональную питательную среду 1/2 Мурасиге – Скуга (МС) [15], дополненную 0,6% агара (PanReac, Испания) и 3% сахарозы (Шосткинский химический завод, Украина). Методика стерилизации приведена в табл. 2.

Растительный материал инкубировали при 16-часовом фотопериоде под люминесцентными лампами дневного света с интенсивностью освещения 40 мкМ×м⁻²×с⁻¹ при температуре 23±2 °С. На каждую обработку закладывали около 100 эксплантов. Наблюдения проводили в течение 45 суток. Учет прорастания и контаминации проводили ежедневно.

Индукция каллусогенеза. Каллусогенез инициировали, культивируя первые настоящие листья асептических проростков на среде МС с добавлением 10 мкМ 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) (Sigma-Aldrich, США) и/или 10 мкМ 2,4-Д в сочетании с 5 мкМ 6-бензиламинопурина (6-БАП) (Sigma-Aldrich, США) в темноте в термостате ТСО-1/80 СПУ (Смоленское специальное конструкторско-технологическое бюро систем программного управления, Россия) при температуре 24±1 °С. Растительный материал культивировали на

Таблица 2. Методика стерилизации эксплантов *Saposhnikovia divaricata*

Table 2. Method of sterilization of *Saposhnikovia divaricata* explants

Экспланты	Стерилизация растительного материала		
	Однократно стерилизованные 0,1%-м AgNO_3	Дважды стерилизованные 0,1%-м AgNO_3	Стерилизованные сначала 0,1%-м AgNO_3 , затем 10%-й H_2O_2
Опыт (семена с удаленным околоплодником)	O_1	O_2	O_3
Контроль (стерилизованные мерикарпии)	K_1	K_2	K_3

протяжении пяти пассажей, длительность пассажа составляла 30 суток. Для контроля первичные листья культивировали на безгормональной среде МС.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Влияние условий хранения семян. Хранение семян в течение 6 месяцев при пониженных температурах явилось неблагоприятным фактором для их прорастания. Наилучшие результаты были получены при хранении в комнатных условиях (23 °С) (рис. 2, а). Лабораторная всхожесть при этом составила 72–84%. Интенсивность энергии прорастания, характеризующая динамичность прорастания семян, наиболее высокой оказалась также в опыте при 23 °С.

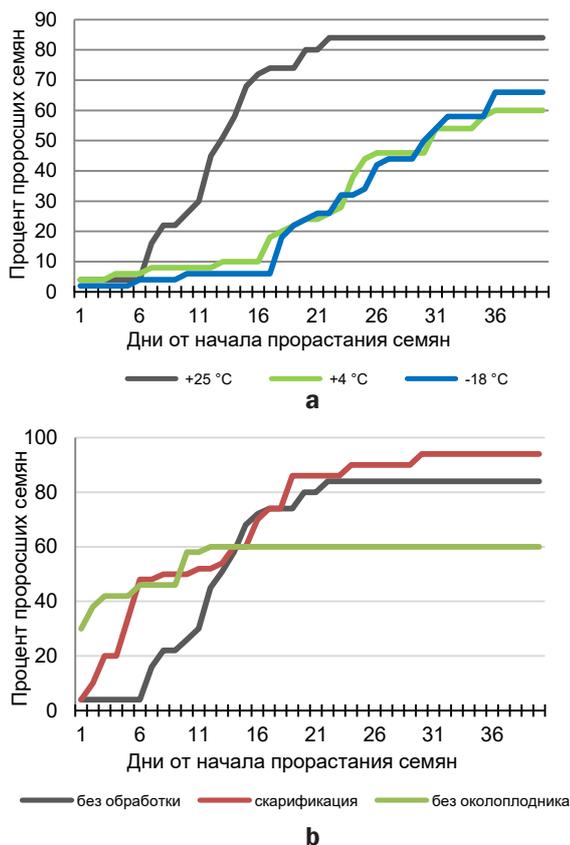


Рис. 2. Динамика прорастания семян (мерикарпиев) *Saposhnikovia divaricata* в зависимости от условий хранения (а) и предварительной обработки (б) мерикарпиев

Fig. 2. Dynamics of seed (mericarpia) germination of *Saposhnikovia divaricata* depending on storage conditions (a) and mericarpia pretreatment (b)

Влияние предварительной обработки семян. Удаление околоплодника значительно сократило период до прорастания семян (в 2 раза). Семена начали прорастать динамично через 5 дней от начала опыта (интенсивность энергии прорастания достигала 77%) (рис. 2, б).

Определение оптимального режима проращивания семян. При проращивании семян, хранившихся в комнатных условиях, только в опыте со стратификацией в течение 18 дней лабораторная всхожесть составила 50% и ниже. При этом после стратификации семена прорастали динамично, интенсивность энергии прорастания составила до 54–88%. Нами установлено, что при стратификации в течение 30 дней семена проросли в холодильной установке при 4 °С, при перемещении в климатостат прорастание продолжилось динамично и всхожесть достигла также, как в климатокамере и в комнатных условиях, 80%. Наиболее благоприятным режимом оказались условия климатокамеры. Однако через срок от 16 до 22 дней непроросшие семена погибли. Наиболее высокие показатели всхожести и динамичности прорастания установлены у скарифицированных семян (рис. 3).

В результате проведенных опытов нами установлено, что семена *S. divaricata* имеют неглубокий покой, а наиболее благоприятными условиями для их прорастания являются: стратификация в течение 30 дней при 4 °С или скарификация мерикарпиев, проращивание семян в климатокамере (с продолжительностью фотопериода 16,5 ч и дневной температурой 27 °С с незначительным ее понижением ночью). В большинстве вариантов опытов лабораторная всхожесть составила более 50% и достигала при благоприятных условиях 94%. Полученные нами результаты расходятся с литературными данными – ряд исследователей отмечает низкую всхожесть семян менее 50% и предлагает различные приемы (скарификация мерикарпиев, тепловая стратификация, холодная стратификация), которые увеличивали всхожесть до 54–75% [16, 17].

Прорастание семян in vitro. При разных способах стерилизации мерикарпиев наблюдали различия по срокам появления всходов, числу проростков и выходу асептического материала. Например, интактные однократно стерилизованные нитратом серебра мерикарпии (K_1) (рис. 4, а) имели низкие показатели всхожести (8,8%) и выход стерильных растений (30%), а появление первых проростков из них зафиксировано только на 29-е сутки культивирования. В то же время у однократно стерилизованных семян со снятым околоплодником (O_1) (рис. 4, б) всхожесть в 7,5 раза (66,7%), а выход асептических проростков (рис. 4, с)

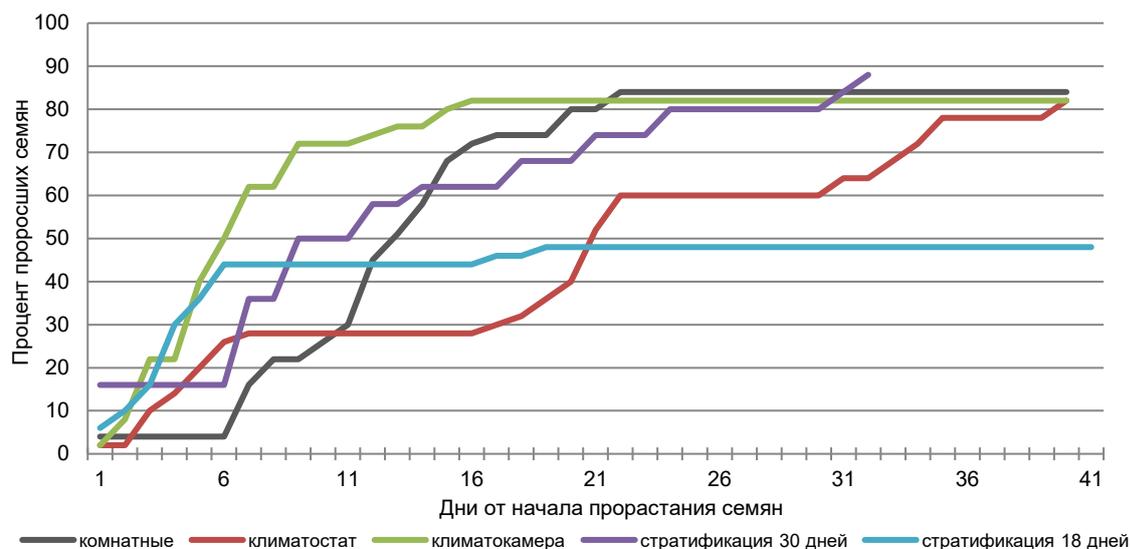


Рис. 3. Динамика прорастания семян (мерикарпиев) *Saposhnikovia divaricata* в зависимости от режима проращивания
Fig. 3. Dynamics of seed (mericarps) germination of *Saposhnikovia divaricata* depending on the germination mode

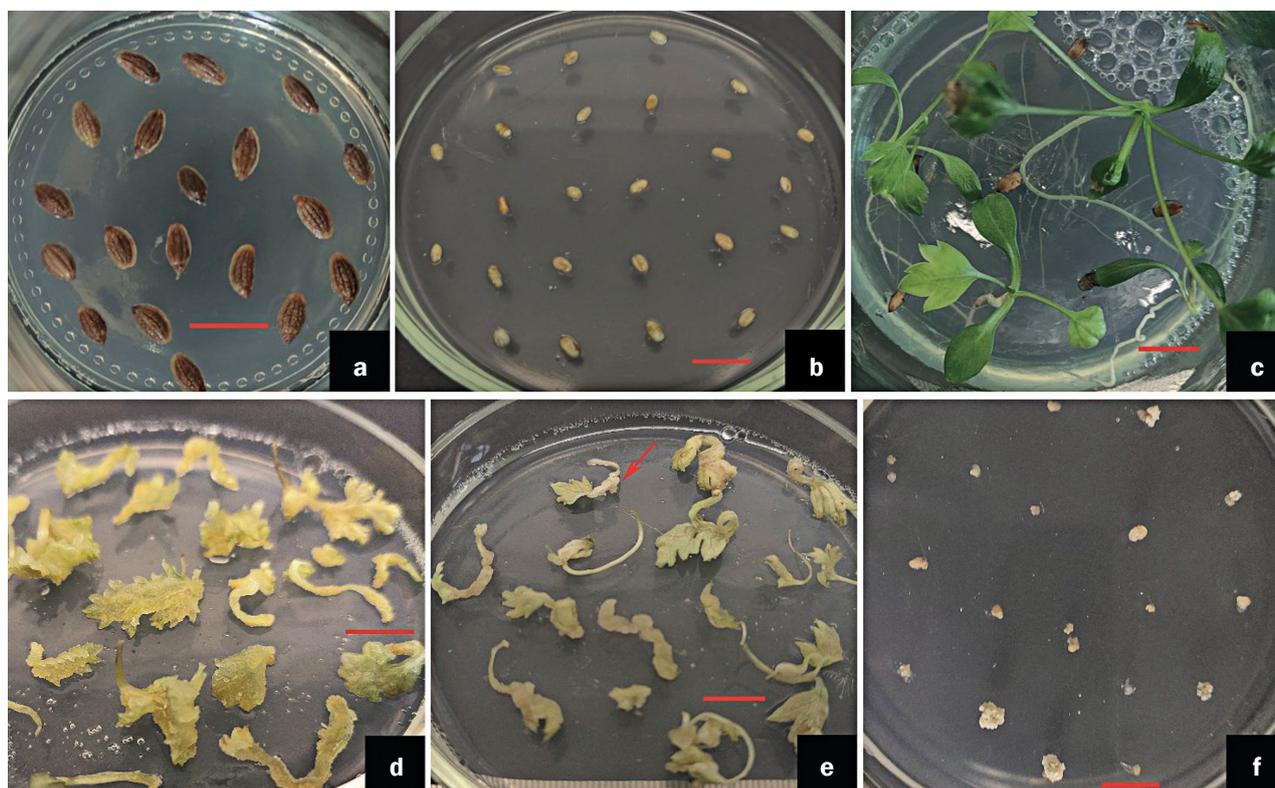


Рис. 4. Развитие проростков *Saposhnikovia divaricata*: а – стерилизованные мерикарпии (контроль), б – семена с удаленным околоплодником (опыт), с – проростки, полученные из семян с удаленным околоплодником после 30 суток культивирования; каллусогенез *Saposhnikovia divaricata*: d – разрастание эксплантов и слабое калусообразование по всей поверхности листовых пластинок после 30 суток культивирования на среде Мурасиге – Скуга с 10 мкМ 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 5 мкМ 6-бензиламинопурина, е – формирование первичного каллуса на черешках листа после 30 суток культивирования на среде Мурасиге – Скуга с 10 мкМ 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, f – каллус на 30-е сутки, культивирующийся в течение пяти пассажей. Масштаб 1 см

Fig. 4. Development of *Saposhnikovia divaricata* seedlings: a – sterilized mericarps (control), b – seeds with the pericarp removed (experiment), c – seedlings obtained from seeds with the pericarp removed after 30 days of cultivation; callusogenesis of *Saposhnikovia divaricata*: d – proliferation of explants and weak callus formation over the entire surface of leaf blades after 30 days of cultivation on Murashige – Skoog medium with 10 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 5 μM 6-benzylaminopurine, e – formation of primary callus on petioles leaf after 30 days of cultivation on Murashige-Skoog medium with 10 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, f – callus on the 30th day, cultivated for five passages. Scale 1 cm

в 2,4 раза (73%) превышали значения контроля. Появление первых проростков отмечено на 14 сутки, что вдвое быстрее по сравнению с контрольными семенами (K_1). При этом проростки имели нормально развитый гипокотиль, две семядоли, корешок. Низкая всхожесть контрольных семян объясняется наличием околоплодника, что подтвердили опыты со скарифицированными мерикарпиями. Удаление околоплодника ликвидировало влияние экзогенных причин покоя, устраняло механические барьеры и обеспечивало полную доступность воды, что ускоряло процесс прорастания.

У дважды стерилизованных $AgNO_3$ мерикарпиев в контроле (K_2) показатели всхожести (23,8%) и выхода асептического материала (86%) превосходили K_1 , тогда как в опыте (O_2) число проростков оказалось в 1,5 раза ниже (47,2%), чем в O_1 , при этом выход стерильных растений по сравнению с O_1 увеличился в 1,3 раза (97,9%). Увеличение числа проростков в K_2 по сравнению с K_1 , вероятно, можно объяснить повреждением экзокарпа при многократных промывках, а снижение всхожести в O_2 по сравнению с O_1 , по-видимому, связано с ингибирующим действием нитрата серебра на прорастание [18]. Двукратная стерилизация мерикарпиев $AgNO_3$ не влияла на период до прорастания, проростки появлялись в K_2 и в O_2 с таким же периодом, как в K_1 и O_1 соответственно. При стерилизации мерикарпиев сначала $AgNO_3$, а затем H_2O_2 всхожесть была примерно одинакова как в контроле (K_3), так и в опыте (O_3) и составляла 50 и 54,7% соответственно. Таким образом, прорастание семян в K_3 в 2,1 раза превышало этот показатель в K_2 и в 5,6 раза в K_1 , тогда как в O_3 всхожесть была всего на 7,5% выше, чем в O_2 и на 12% ниже, чем в O_1 .

Каллусогенез. Формирование первичного каллуса отмечено через 30 суток инкубации на среде как с 2,4-Д (рис 4, е), так и с 2,4-Д в сочетании с 6-БАП (рис. 4, d). При этом на среде, содержащей только ауксин (2,4-Д), у 66% эксплантов формировался белый каллус преимущественно на черешках листа, а на среде, включающей ауксин в сочетании с цитокинином, у 72% эксплантов наблюдали формирование светло-зеленого каллуса по всей поверхности листовой пластинки. Прирост каллуса

в обоих случаях был незначительным. В контрольных образцах формирование каллуса не наблюдали, происходил хлороз, а затем и некроз эксплантов.

При периодическом пассировании дальнейшее развитие каллуса происходило на среде только с 2,4-Д (рис. 4, f), при этом наблюдали незначительный прирост каллуса в течение пяти пассажей (не более 5 мм в диаметре), который имел глобулярную структуру. Для индукции каллусообразования выбрали 2,4-Д, поскольку этот регулятор роста является одним из самых мощных каллусообразователей среди ауксинов [19]. Также каллусную ткань часто получают путем культивирования растительного материала на средах, содержащих ауксины в сочетании с цитокининами. При этом 6-БАП считают более мощным по сравнению с кинетином [19]. Тем не менее успешное образование каллуса из листовых эксплантов *S. divaricata* отмечено на питательной среде МС, содержащей 2,4-Д в сочетании с кинетином [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании вышесказанного можно сделать следующие выводы:

1. Семена *S. divaricata* имеют неглубокий покой. Наиболее благоприятными условиями для их прорастания являются: стратификация в течение 30 дней при 4 °С или скарификация мерикарпиев, проращивание семян в климатоканере (с продолжительностью фотопериода 16,5 ч и дневной температурой 27 °С с незначительным ее понижением ночью). Лабораторная всхожесть при благоприятных условиях была высока и достигала 94%.

2. Отсутствие целых семян в конце опыта предполагает короткий период их жизни в природных условиях и, как следствие, их низкий запас в почве, что обуславливает уязвимость природных популяций наряду с монокарпичностью и отсутствием вегетативного размножения.

3. Получена хорошо растущая асептическая культура *in vitro* *S. divaricata*. Снятие околоплодника с мерикарпиев является эффективным для ускорения прорастания и увеличения всхожести семян *in vitro*, т.к. снимает экзогенный покой и значительно снижает уровень контаминации. Получены данные по морфогенезу *in vitro*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Urbagarova B.M., Shults E.E., Taraskin V.V., Radnaeva L.D., Petrova T.N., Rybalova T.V., et al. Chromones and coumarins from *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. Growing in Buryatia and Mongolia and their cytotoxicity // Journal of Ethnopharmacology. 2020. Vol. 261. P. 112517. DOI: 10.1016/j.jep.2019.112517.
2. Kim M., Seo K.-S., Yun K.W. Antimicrobial and antioxidant activity of *Saposhnikovia divaricata*, *Peucedanum japonicum* and *Glehnia littoralis* // Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2018. Vol. 80, no. 3. P. 560–565. DOI: 10.4172/pharmaceutical-sciences.1000393.
3. Yang J.-M., Jiang H., Dai H.-L., Wang Z.-W., Jia G.-Z., Meng X.-C. Feeble antipyretic, analgesic, and anti-inflammatory activities were found with regular dose 4'-O- β -D-glucosyl-5-O-methylvisamminol, one of the conventional marker compounds for quality evaluation of radix *Saposhnikovia* // Pharmacognosy Magazine. 2017. Vol. 13, no. 49. P. 168–174. DOI: 10.4103/0973-1296.197637.
4. Wang X., Jiang X., Yu X., Liu H., Tao Y., Jiang G., Hong M., Cimifugin suppresses allergic inflammation by reducing epithelial derived initiative key factors via regulating tight junctions // Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2017. Vol. 21, no. 11. P. 2926–2936. DOI: 10.1111/jcmm.13204.
5. Kreiner J., Pang E., Lenon G.B., Yang A.W.H. *Saposhnikovia divaricata*: a phytochemical, pharmacological, and pharmacokinetic review // Chinese Journal of Natural Medicines. 2017. Vol. 15, no. 4. P. 255–264. DOI: 10.3724/SP.J.1009.2017.00255.
6. Банщикова Е.А., Вахнина И.Л., Желибо Т.В. *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischkin в степях Юго-Восточного Забайкалья // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. 2020. Т. 19. N 1. С. 87–92. DOI: 10.14258/pbssm.2020018. EDN: ХАВКОМ.
7. Корсун О.В. Трансграничный спрос создает угрозу растениям даурских степей // Степной бюллетень. 2018–2019. N 51–52. С. 49–51.
8. Mongolian Red Book / eds Ts. Shiirevdamba, Ya. Adyaa. Ulaanbaatar: Admon Print, 2013. 536 p.

9. Xu Y.-H., Huang Z.-J., Liu S.-L., Yang H., Wang C. A new *Saposhnikovia divaricata* cultivar "Guanfangfeng 1" // *Acta Horticulturae Sinica*. 2016. Vol. 43, no. 6. P. 1221–1222. DOI: 10.16420/j.issn.0513-353x.2015-0826.

10. Зубова К.А. Выращивание и использование лекарственных растений Южно-Сибирского ботанического сада // Молодые ученые в решении актуальных проблем науки: материалы X Междунар. науч.-практ. конф. (г. Владикавказ, 23–25 декабря 2020 г.). Владикавказ: Веста, 2020. С. 69–71.

11. Елисафенко Т.В., Королюк Е.А., Югина П.Н., Урбагарова Б.М., Тараскин В.В. Результаты первичной интродукции *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. в Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН // Растительный мир Азиатской России (Вестник Центрального сибирского ботанического сада СО РАН). 2021. Т. 14. N 4. С. 293–302. DOI: 10.15372/RMAR20210404. EDN: JEMIKX.

12. Зубова К.А. Природные ресурсы Южно-Сибирского ботанического сада // Кадастр недвижимости и мониторинг природных ресурсов: сб. науч. тр. 6-й Междунар. науч.-техн. инт.-конф. (г. Тула, 21–28 декабря 2020 г.). Тула: Изд-во ТулГУ, 2021. С. 142–144. EDN: LQACLA.

13. Yugrina P., Urbagarova B., Elisafenko T. Morphological features of fruits and seeds of *Saposhnikovia divaricata* (Apiaceae) // *Northern Asia Plant Diversity: Current Trends in Research and Conservation* 2021. 2021. Vol. 38. P. 00141. DOI: 10.1051/bioconf/20213800141.

14. Елисафенко Т.В. Изучение особенностей латентного периода растений на примере видов секции *Mirabiles* рода *Viola* (Violaceae). I. Семенная продуктивность и биология прорастания семян // Растительный мир Азиатской России (Вестник Центрального сибир-

ского ботанического сада СО РАН). 2012. N 2. С. 66–72. EDN: PJRBHZ.

15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

16. Dou T.-L., Wang Y.-Q., Zhang L.-F., Zuo Q.-H., Zhang X.-Q. Study on promoting germination of *Saposhnikovia Divaricata* Seed // *Seed*. 2010. Vol. 2. P. 66–68. DOI: 10.16590/j.cnki.1001-4705.2010.02.061.

17. Ступина Л.А., Чернецова Н.В. Всхожесть интродуцированных семян лекарственных растений в условиях умеренно засушливой степи Алтайского края // Аграрная наука – сельскому хозяйству: материалы XIII Междунар. науч.-практ. конф. (г. Барнаул, 15–16 февраля 2018 г.). Барнаул: Изд-во АГАУ, 2018. С. 424–425. EDN: YUBTMG.

18. Munkager V., Vestergård M., Priemé A., Altenburger A., de Visser E., Johansen J.L., et al. AgNO₃ sterilizes grains of barley (*Hordeum vulgare*) without inhibiting germination—a necessary tool for plant–microbiome research // *Plants*. 2020. Vol. 9, no. 3. P. 372. DOI: 10.3390/plants9030372.

19. Gopi C., Vatsala T.M. *In vitro* studies on effects of plant growth regulators on callus and suspension culture biomass yield from *Gymnema sylvestre* R.Br // *African Journal of Biotechnology*. 2006. Vol. 5, no. 12. P. 1215–1219.

20. Milentyeva I.S., Le V.M., Kozlova O.V., Velichkovich N.S., Fedorova A.M., Loseva A.I., et al. Secondary metabolites in *in vitro* cultures of Siberian medicinal plants: content, antioxidant properties, and antimicrobial characteristics // *Foods and Raw Materials*. 2021. Vol. 9, no. 1. P. 153–163. DOI: 10.21603/2308-4057-2021-1-153-163.

REFERENCES

1. Urbagarova B.M., Shults E.E., Taraskin V.V., Radnaeva L.D., Petrova T.N., Rybalova T.V., et al. Chromones and coumarins from *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. Growing in Buryatia and Mongolia and their cytotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2020;261:112517. DOI: 10.1016/j.jep.2019.112517.
2. Kim M., Seo K.-S., Yun K.W. Antimicrobial and antioxidant activity of *Saposhnikovia divaricata*, *Peucedanum japonicum* and *Glehnia littoralis*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;80(3):560-565. DOI: 10.4172/pharmaceutical-sciences.1000393.
3. Yang J.-M., Jiang H., Dai H.-L., Wang Z.-W., Jia G.-Z., Meng X.-C. Feeble antipyretic, analgesic, and anti-inflammatory activities were found with regular dose 4'-O-β-D-glucosyl-5-O-methylvisamminol, one of the conventional marker compounds for quality evaluation of radix *Saposhnikovia*. *Pharmacognosy Magazine*. 2017;13(49):168-174. DOI: 10.4103/0973-1296.197637.
4. Wang X., Jiang X., Yu X., Liu H., Tao Y., Jiang G., Hong M.. Cimifugin suppresses allergic inflammation by reducing epithelial derived initiative key factors *via* regulating tight junctions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2017;21(11):2926-2936. DOI: 10.1111/jcmm.13204.
5. Kreiner J., Pang E., Lenon G.B., Yang A.W.H. *Saposhnikovia divaricata*: a phytochemical, pharmacological, and pharmacokinetic review. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2017;15(4):255-264. DOI: 10.3724/SP.J.1009.2017.00255.
6. Bانشchikova E.A., Vakhnina I.L., Zhelibo T.V. *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischkin in the steppes of South-Eastern Transbaikalia. *Problemy botaniki Yuzhnoi Sibiri i Mongolii*. 2020;19(1):87-92. (In Russian). DOI: 10.14258/pbssm.2020018. EDN: XABKOM.
7. Korsun O.V. Cross-border demand poses a threat to plants in Dauria. *Stepnoi byulleten'*. 2018-2019;51-52:49-51. (In Russian).
8. Shiirevdamba Ts., Adyaa Ya. *Mongolian Red Book*. Ulaanbaatar: Admon Print; 2013, 536 p.
9. Xu Y.-H., Huang Z.-J., Liu S.-L., Yang H., Wang C. A new *Saposhnikovia divaricata* cultivar "Guanfangfeng 1". *Acta Horticulturae Sinica*. 2016;43(6):1221-1222. DOI: 10.16420/j.issn.0513-353x.2015-0826.
10. Zubova K.A. Cultivation and use of medicinal plants of the south siberian botanical garden. In: *Molodye uchenye v reshenii aktual'nykh problem nauki: materialy X Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. = Young scientists in solving urgent scientific problems: Proceedings of the 10th International Scientific and Practical conf.* 23–25 December 2020, Vladikavkaz. Vladikavkaz: Vesta; 2020, p. 69-71. (In Russian).
11. Elisafenko T.V., Korolyuk E.A., Yugrina P.N., Urbagarova B.M., Taraskin V.V. Results of the primary introduction of *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. in the Central Siberian Botanical Garden SB RAS. *Rastitel'nyi mir Aziatskoi Rossii (Vestnik Tsentral'nogo sibir-*

skogo botanicheskogo sada SO RAN) = *Flora and Vegetation of Asian Russia*. 2021;14(4):293-302. (In Russian). DOI: 10.15372/RMAR20210404. EDN: JEMIKX.

12. Zubova K.A. Natural resources of the South Siberian Botanical Garden. In: *Kadastr nedvizhimosti i monitoring prirodnykh resursov: sb. nauch. tr. 6-i Mezhdunar. nauch.-tekhn. int.-konf. = Real estate cadastre and monitoring of natural resources: Proceedings of the 6th International Scientific-Technical internet conferences*. 21–28 December 2020, Tula. Tula: Tula State University; 2021, p. 142-144. (In Russian). EDN: LQACLA.

13. Yugrina P., Urbagarova B., Elisafenko T. Morphological features of fruits and seeds of *Saposhnikovia divaricata* (Apiaceae). *Northern Asia Plant Diversity: Current Trends in Research and Conservation 2021*. 2021;38:00141. DOI: 10.1051/bioconf/20213800141.

14. Elisafenko T.V. Investigations of features of the latent period of plant by the example of section *Mirabiles* of the genus *Viola* (Violaceae). I. The seed production and the biology of seed germination. *Rastitel'nyi mir Aziatskoi Rossii (Vestnik Tsentral'nogo sibirskogo botanicheskogo sada SO RAN) = Flora and Vegetation of Asian Russia*. 2012;2:66-72. (In Russian). EDN: PJRBHZ.

15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15:473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

16. Dou T.-L., Wang Y.-Q., Zhang L.-F., Zuo Q.-H., Zhang X.-Q. Study on promoting germination of *Saposhnikovia Divaricata* Seed. *Seed*. 2010;2:66-68. DOI: 10.16590/j.cnki.1001-4705.2010.02.061.

17. Stupina L.A., Chernetsova N.V. Germination of introduced seeds of medicinal plants in the moderately arid steppe of Altai Region. In: *Agrarnaya nauka – sel'skomu khozyaistvu: materialy XIII Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. = Agrarian Science to Agriculture: Proceedings of the 13th International Research and Practice conference*. 15–16 February 2018, Barnaul. Barnaul: Altai State Agricultural University; 2018, p. 424-425. (In Russian). EDN: YUBTMG.

18. Munkager V., Vestergård M., Priemé A., Altenburger A., de Visser E., Johansen J.L., et al. AgNO₃ sterilizes grains of barley (*Hordeum vulgare*) without inhibiting germination—a necessary tool for plant–microbiome research. *Plants*. 2020;9(3):372. DOI: 10.3390/plants9030372.

19. Gopi C., Vatsala T.M. *In vitro* studies on effects of plant growth regulators on callus and suspension culture biomass yield from *Gymnema sylvestre* R.Br. *African Journal of Biotechnology*. 2006;5(12):1215-1219.

20. Milentyeva I.S., Le V.M., Kozlova O.V., Velichkovich N.S., Fedorova A.M., Loseva A.I., et al. Secondary metabolites in *in vitro* cultures of Siberian medicinal plants: content, antioxidant properties, and antimicrobial characteristics. *Foods and Raw Materials*. 2021;9(1):153-163. DOI: 10.21603/2308-4057-2021-1-153-163.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Елисафенко Татьяна Валерьевна,

д.б.н., ведущий научный сотрудник,
Центральный сибирский
ботанический сад СО РАН,
630090, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская,
101, Российская Федерация,
✉ tatvelisa@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3979-6259>

Железниченко Татьяна Витальевна,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Центральный сибирский
ботанический сад СО РАН,
630090, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская,
101, Российская Федерация,
zhelez05@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2499-5108>

Югрин Полина Николаевна,

инженер-исследователь,
Центральный сибирский
ботанический сад СО РАН,
630090, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская,
101, Российская Федерация,
poly.shapowalowa2015@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6910-771X>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Tatyana V. Elisafenko,

Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher,
Central Siberian Botanical Garden SB RAS,
101, Zolotodolinskaya St., Novosibirsk, 630090,
Russian Federation,
✉ tatvelisa@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3979-6259>

Tatiana V. Zheleznichenko,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Central Siberian Botanical Garden SB RAS,
101, Zolotodolinskaya St., Novosibirsk, 630090,
Russian Federation,
zhelez05@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2499-5108>

Polina N. Yugrina,

Engineer,
Central Siberian Botanical Garden SB RAS,
101, Zolotodolinskaya St., Novosibirsk, 630090,
Russian Federation,
poly.shapowalowa2015@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6910-771X>

Жигмитцыренова Баярма Мунхоевна,
к.фарм.н., старший научный сотрудник,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, Улан-Удэ, Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
Центральный сибирский
ботанический сад СО РАН,
630090, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская,
101, Российская Федерация,
urbagarova.bayarma@mail.ru <https://orcid.org/0000-0003-0455-058X>

Казаков Максим Владимирович,
научный сотрудник,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, Улан-Удэ, Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
Центральный сибирский
ботанический сад СО РАН,
630090, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская,
101, Российская Федерация,
KMV@binm.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4266-9461>

Тараскин Василий Владимирович,
к.фарм.н., старший научный сотрудник,
заведующий лабораторией,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, Улан-Удэ, Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
vvtaraskin@binm.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0909-2629>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 31.07.2023.
Одобрена после рецензирования 12.10.2023.
Принята к публикации 31.10.2023.

Bayarma M. Zhigmittsyrenova,
Cand. Sci. (Pharmacology), Senior Researcher,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 6670047,
Russian Federation,
Central Siberian Botanical Garden SB RAS,
101, Zolotodolinskaya St., Novosibirsk, 630090,
Russian Federation,
urbagarova.bayarma@mail.ru <https://orcid.org/0000-0003-0455-058X>

Maksim V. Kazakov,
Researcher,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 6670047,
Russian Federation,
Central Siberian Botanical Garden SB RAS,
101, Zolotodolinskaya St., Novosibirsk, 630090,
Russian Federation,
KMV@binm.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4266-9461>

Vasilii V. Taraskin,
Cand. Sci. (Pharmacology), Senior Researcher,
Head of the Laboratory,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 6670047,
Russian Federation,
vvtaraskin@binm.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0909-2629>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

Information about the article

The article was submitted 31.07.2023.
Approved after reviewing 12.10.2023.
Accepted for publication 31.10.2023.

Научная статья

УДК 579.64

EDN: HBUBNO

DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-561-568



Способ механической активации суспензии спор черного трюфеля

Н.А. Имидоева*✉, Е.В. Малыгина*, А.Ю. Бельшенко*, М.Е. Дмитриева*,
В.Н. Шелковникова*, М.М. Моргунова***, С.В. Кулинич*, Т.Н. Вавилина*,
С.Н. Евстафьев**, Д.В. Аксёнов-Грибанов*

*Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Российская Федерация

**Иркутский национальный исследовательский технический университет,
г. Иркутск, Российская Федерация

Аннотация. Истинные трюфели, или грибы рода *Tuber*, являются одними из самых ценных, редких, дорогих и загадочных грибов на планете. Размножение трюфельных грибов в дикой природе является сложным процессом, который зависит от многих факторов, например, от присутствия подходящих деревьев-хозяев, оптимальных параметров температуры, влажности, pH почвы, почвенных симбионтов и других организмов. Так, для успешного производства и размножения трюфелей требуется соблюдение множества условий, а главное – высвобождение их спор из асков, прорастание в благоприятных условиях и распространение в природной среде. Целью представленного исследования являлась разработка метода механического разрушения асков для высвобождения спор черного трюфеля. Показано, что высокоэффективным способом разрушения асков является гомогенизация с использованием погружного блендера в тандеме с вибрационным измельчителем. Микроскопирование образцов на всех этапах эксперимента позволило установить, что такой способ приводит к разрушению не менее 85% асков и высвобождению спор трюфеля. При использовании подходов центрифугирования представляется возможным отделить споры черных трюфельных грибов от обломков гифов, грибных симбионтов и различных ассоциированных организмов. Такие споры способны к образованию мицелия на питательных средах. Результаты исследования могут быть использованы для подготовки посевного материала *Tuber* sp. и получения их чистых культур. Таким образом, внедрение способов высвобождения спор из асков способствует повышению эффективности культивации черного трюфеля.

Ключевые слова: черный трюфель, *Tuber* sp., споры, гомогенизация, получение мицелия

Финансирование. Исследование проведено при поддержке Российского научного фонда, проект № 22-76-10036.

Для цитирования: Имидоева Н.А., Малыгина Е.В., Бельшенко А.Ю., Дмитриева М.Е., Шелковникова В.Н., Моргунова М.М. [и др.]. Способ механической активации суспензии спор черного трюфеля // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 561–568. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-561-568. EDN: HBUBNO.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

A way to mechanically activate a suspension of black truffle spores

Natalia A. Imidoeva*✉, Ekaterina V. Malygina*, Aleksandr Yu. Belyshenko*,
Maria E. Dmitrieva*, Victoria N. Shelkovnikova*, Maria M. Morgunova***,
Sophia V. Kulinich*, Tatyana N. Vavilina*, Sergej N. Evstaf'ev**, Denis V. Axenov-Gribanov*

*Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

**Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

© Имидоева Н.А., Малыгина Е.В., Бельшенко А.Ю., Дмитриева М.Е., Шелковникова В.Н., Моргунова М.М., Кулинич С.В., Вавилина Т.Н., Евстафьев С.Н., Аксёнов-Грибанов Д.В., 2023

Abstract. True truffles, or fungi of the genus *Tuber*, are among the most valuable, rare, expensive, and mysterious fungi on the planet. The reproduction of truffle fungi in the wild is a complex process that depends on many factors, for example, the presence of suitable host trees, as well as the optimal parameters of temperature, moisture, soil pH, soil symbionts, and other organisms. Successful production and reproduction of truffles require a large number of conditions to be met, primarily the release of their spores from asci, germination under favorable conditions, and distribution in the environment. The present study aims to develop a method for mechanically breaking asci in order to release the spores of black truffle. It is shown that homogenization by means of an immersion blender together with a vibrating chopper is a highly effective way to break asci. The microscopic examination of the specimens at all stages of the experiment revealed that this method leads to the breakdown of at least 85% of asci and the release of truffle spores. The use of centrifugation approaches enables the separation of black truffle spores from hyphal debris, fungal symbionts, and various associated organisms. Such spores can form mycelium on growth media. The study results can be used to prepare *Tuber* sp. inoculum and obtain their axenic cultures. Thus, the introduction of methods for releasing spores from asci improves the efficiency of black truffle cultivation.

Keywords: black truffle, *Tuber* sp., spores, homogenization, mycelial production

Funding. The Russian Science Foundation (project no. 22-76-10036) financially supported the work.

For citation: Imidoeva N.A., Malygina E.V., Belyshenko A. Yu., Dmitrieva M.E., Shelkovnikova V.N., Morgunova M.M., et al. A way to mechanically activate a suspension of black truffle spores. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiyai Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):561-568. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-561-568. EDN: HBUBNO.

ВВЕДЕНИЕ

Трюфельные грибы (*Tuber* sp.) являются сумчатыми грибами, плодовые тела которых формируются под землей в ассоциации с корнями определенных пород деревьев, таких как дуб, сосна, лесной орех и др. Этот симбиоз позволяет трюфелям получать необходимые питательные вещества от растений. В свою очередь, трюфельные грибы способны поглощать воды и минералов из почвы для роста корневой системы растений [1]. Данные грибы являются малоизученными организмами, а внимание их биотехнологической значимости практически не уделено. Особую актуальность исследованию придает тот факт, что в настоящее время происходит сокращение числа дикорастущих трюфелей [2], а в посевном материале коммерческого мицелия трюфеля, реализуемого в России, по данным наших собственных наблюдений 2022 года, основанных на метагеномном анализе коммерческих образцов, зачастую отмечается отсутствие трюфельных грибов. В связи с этим одним из перспективных направлений исследований является разработка методов выращивания трюфельных грибов в контролируемых лабораторных условиях. Проблемой в данном случае выступает наличие сложного и разнообразного симбионтного сообщества трюфельных грибов, представленного бактериями, грибами, беспозвоночными и другими организмами [3]. Они активно колонизируют трюфели на всех этапах их жизненного цикла, создавая трудности для получения чистой культуры [4, 5].

Трюфельные грибы являются уникальным и ценным продуктом и пользуются большим спросом в кулинарии, так как обладают характерным вкусом и ароматом [6]. В то же время они являются редкими и ограниченно доступными из-за своих специфических требований к климату и условиям почвы [7, 8]. Ввиду высокой стоимости и редкости трюфели стали предметом интереса для исследований и разработок в области сельского хозяйства [9]. Большое количество проведенных ранее исследований было направлено на оптимизацию и улучшение способов выращивания трюфелей с целью сделать их более доступными и коммерчески выгодными

[10, 11]. Так, известен патент KZ 23874A4 «Способ и устройство для получения биомассы трюфеля и других съедобных грибов», в котором описано получение из трюфельных грибов белкового продукта и мицелия [12]. В качестве маточной культуры авторами были использованы измельченные трюфельные грибы, которые помещались в ферментер и культивировались до прироста биомассы. Тем не менее в изобретении не приведено доказательств роста грибов рода *Tuber*, а принимая во внимание высокоразвитые симбиотические сообщества [1] внутри плодового тела грибов, можно утверждать, что заявленное изобретение фактически не решает техническую задачу касательно упомянутых грибов.

Одним из важных условий для размножения трюфельных грибов в дикой природе является высвобождение спор из асков. Аски служат защитной оболочкой для спор от воздействия негативных факторов. В них же происходит активное созревание спор. После освобождения из оболочек споры прорастают, образуя мицелий, который затем образует микоризу и формирует плодовое тело. В настоящее время существуют различные методы получения посевной суспензии спор трюфелей, но они зачастую неэффективны и требуют значительных затрат времени, ресурсов и специфических компонентов. Широко распространен метод микоризации споровой суспензией трюфелей саженцев растений-хозяев [13, 14]. При этом проблема заключается в том, что успешно установленная симбиотическая связь с трюфельными грибами может быть непостоянной и неустойчивой в связи с заражением растений-хозяев патогенами и другими грибами-симбионтами [15]. Кроме того, не все растения-хозяева могут быть успешно микоризированы трюфелями, что ограничивает выбор видов и сортов для получения трюфелей [16]. При отсутствии молекулярного контроля микоризация растения может произойти фитопатогенными грибами – симбионтами трюфеля, а не собственно трюфельными грибами.

Зачастую споры трюфелей распространяются в природе при помощи животных, в т.ч. микрофагов, которые потребляют их в пищу и с помощью ряда пищеварительных ферментов разрушают защитные оболочки

спор, тем самым рассеивая их в окружающую среду [17, 18]. Зрелые споры без сумок быстрее прорастают и эффективнее образуют микоризу, что необходимо для эффективного выращивания трюфелей [19]. Однако такой способ распространения спор трюфелевых грибов во многом зависит от перемещения животных и не позволяет обеспечить доступный поиск грибов.

В связи с вышесказанным целью данного исследования являлась разработка доступного метода механического разрушения асков для облегчения высвобождения спор черных трюфелевых грибов, а следовательно, и создания посевного материала, отличающегося наличием активированных спор черного трюфеля и их способности к росту.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследовании использовали плодовые тела черных трюфелевых грибов *Tuber* sp., собранные в городе Краснодаре ($N = 12$). Данные грибы имеют глобулярную форму и покрыты шероховатым плотным пирамидальным перидием. Цвет перидия черный или темно-коричневый. Размеры плодовых тел варьируют от 2 до 6 см, иногда достигают 15 см. Средний вес грибов составляет около 20 г.

Внутри плодового тела черного трюфеля находится глеба, имеющая серый, коричневый или кремовый цвет. Характерным признаком глебы трюфелей является наличие мраморного рисунка, который формируется множеством плотных извилистых прожилок белого цвета¹ [20].

В ходе осуществленных работ предложен метод механического разрушения асков, содержащих споры трюфеля, сопровождающийся наблюдением с помощью светового микроскопа «Микромед 2» (вар. 3-20, «Микромед», Россия) за спорами при их инокуляции на агаризованные питательные среды. Проведена серия экспериментов, включающая различные методы механического разрушения асков. Для этого стерильным скальпелем вырезали участок плодового тела черного трюфеля *Tuber* sp., после чего его переносили в микропробирку, в которую добавляли 1 мл стерильной дистиллированной воды/физраствора или микробиологических сред (1–5% LB, TSB, Сабуро, Гетчинсона, картофельно-глюкозный агар, среда Чапека и др.) и проводили измельчение (гомогенизацию) различными способами.

Наконец, часть образцов гриба гомогенизировали с помощью лабораторного вибрационного измельчителя БАБРх1 (НПК «Микротех», Россия) посредством интенсивного встряхивания со стальными шарами при 3000 об/мин. Образцы измельчали в течение 3 мин четырехкратно. В перерывах пробы охлаждали и проводили микроскопирование полученного материала.

К оставшимся образцам добавляли до 200 мл дистиллированной воды/физраствора или указанных ранее микробиологических сред и проводили измельчение с помощью погружного блендера. Мелкую фракцию плодового тела трюфеля отбирали в микропробирки. Один образец отправляли на микроскопический анализ, а ко второму добавляли металлические шары, после чего

проводили четырехкратное измельчение при температуре, не превышающей 45 °С. Для очистки споровой суспензии трюфеля от обломков гифов и его симбионтов проводили центрифугирование при скорости 12000 об/мин в течение 5 мин, в результате чего отделяли осадок от надосадочной жидкости. Для очистки образцов проводили пятикратную отмывку в растворах стерильной воды или питательных сред. Изменения в морфологии спор и асков трюфеля во всех трех пробах регистрировали с помощью светового микроскопа.

Далее подготавливали предметные стекла для микроскопирования гомогенизированных проб и детекции прорастивания полученной споровой суспензии грибов. Для этого очищали стекло от пыли и обезжиривали его в течение 15–20 мин в 70%-м растворе спирта, затем промывали дистиллированной водой, сушили и стерилизовали. Каплю агаризованных питательных сред наносили на предметные стекла. Гомогенат, содержащий споры трюфеля, наносили на застывшие питательные среды, в т.ч. питательную среду Сабуро, среду Гетчинсона, картофельно-глюкозный агар, среду Чапека. Предметные стекла помещали в термостатируемые условия в стерильных чашках Петри при температурах от 18 до 30 °С на две недели для того, чтобы споры начали прорасти и образовывать грибные гифы. Микроскопию спор трюфеля проводили сразу после гомогенизации, а также на 7-е, 10-е и 14-е сутки эксперимента. Эксперименты проведены в 12 повторах для исключения влияния случайных факторов. Выполнено более 100 микробиологических посевов споровой суспензии на предметные стекла. Анализ каждого эксперимента проводили в трех микроскопических полях. Оценку достоверности осуществляли, используя U-критерий Манна – Уитни. Статистический анализ проводили с использованием программы Past 4.10.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Микрофотографии, полученные в ходе исследования, позволяют сравнить результаты эффективности разрушения асков в ходе измельчения плодовых тел черного трюфеля рода *Tuber* sp. различными методами. Получены репрезентативные микрофотографии до гомогенизации (рис. 1, а) и после гомогенизации с использованием погружного блендера (рис. 1, б), вибрационного измельчителя (рис. 1, с) и погружного блендера в тандеме с вибрационным измельчителем (рис. 1, д). На фотографии до гомогенизации (см. рис. 1, а) видно, что споры трюфелей находятся внутри асков (степень повреждения асков составляет не более $9,1 \pm 5,7\%$). После гомогенизации с помощью погружного блендера (см. рис. 1, б) было разрушено $22,4 \pm 9,1\%$ асков, а основная часть спор осталась внутри них. В случае гомогенизации с использованием вибрационного измельчителя (см. рис. 1, с) отмечали $51,7 \pm 12\%$ разрушенных асков, но $90 \pm 11,3\%$ спор все еще находилось внутри них. Наконец, гомогенизация с использованием погружного блендера в тандеме с вибрационным измельчителем (см. рис. 1, д) привела к разрушению $86,3 \pm 6,2\%$ асков и высвобождению $70,2 \pm 8,6\%$ спор. По результатам микроскопического анализа этот метод оказался наиболее эффек-

¹Ивойлов А.В., Большаков С.Ю., Силаева Т.Б. Изучение видового разнообразия микромицетов: учеб. пособие. Саранск: Изд-во Мордовского ун-та, 2017. 155 с.

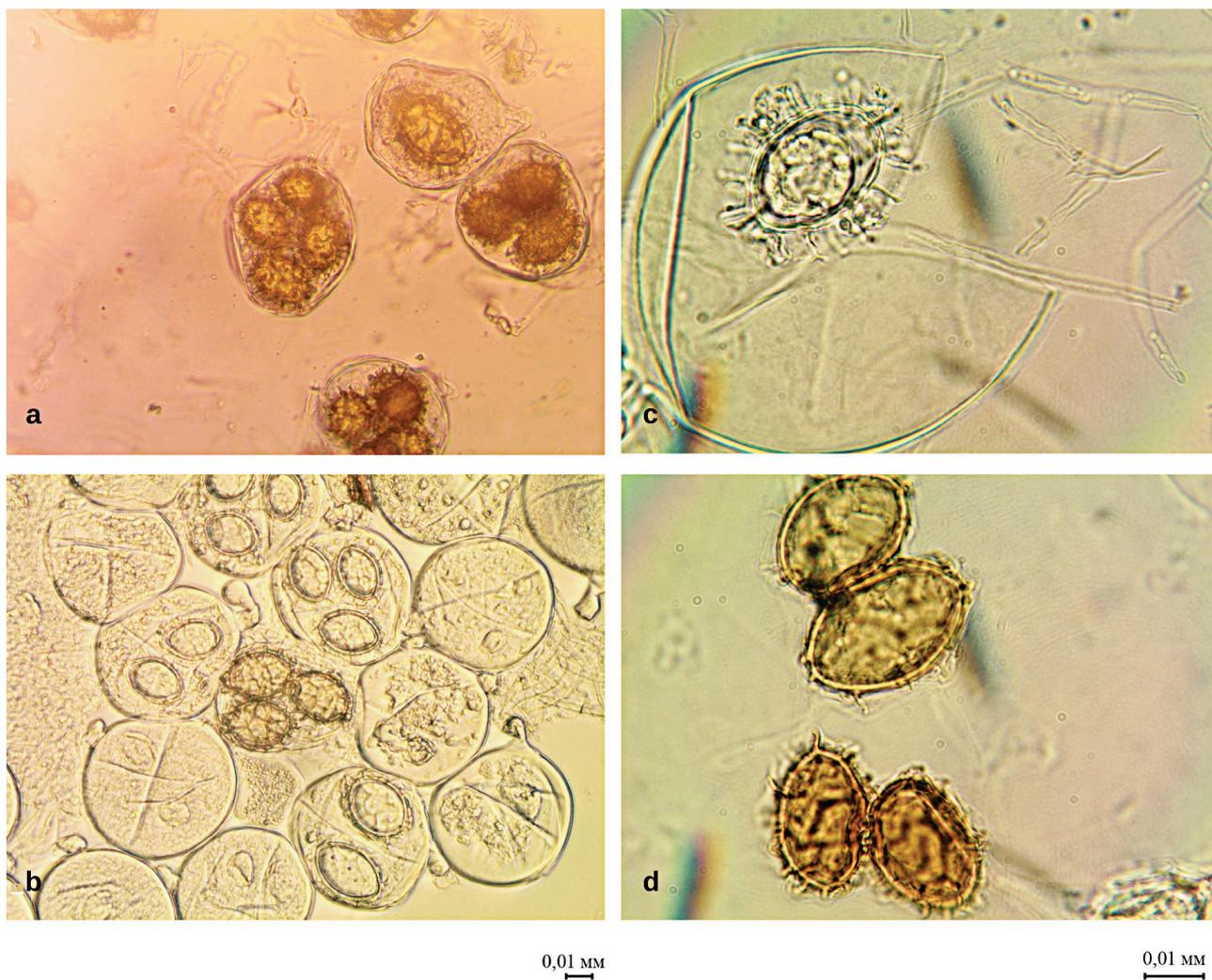


Рис. 1. Микрофотографии образцов до гомогенизации (а) и после гомогенизации с использованием погружного блендера (б), вибрационного измельчителя (с) и погружного блендера в тандеме с вибрационным измельчителем (д)

Fig. 1. Light micrographs before homogenization (a) and after homogenization using immersion blender (b), vibrating chopper (c) and immersion blender in tandem with vibrating chopper (d)

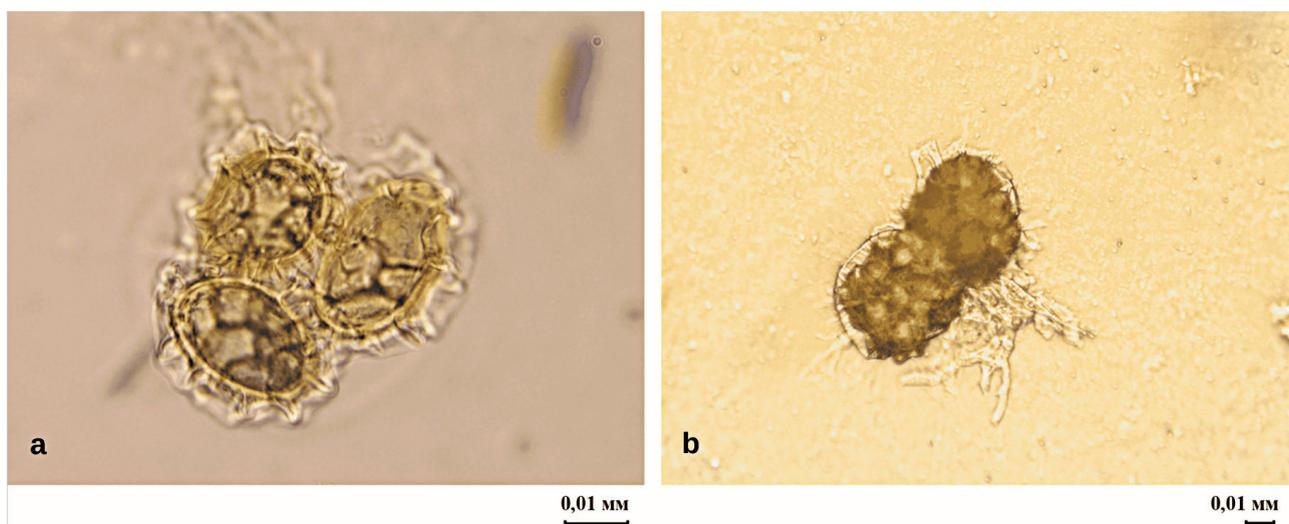


Рис. 2. Микрофотографии споровой суспензии, полученной после гомогенизации с использованием блендера и вибрационного измельчителя на 10-е (а) и 14-е (б) сутки

Fig. 2. Light micrographs of the spore suspension obtained after homogenization using a blender and a vibrating chopper on the 10th (a) and 14th (b) day

тивным в разрушении асков и высвобождении спор по сравнению с иными.

Вместе с тем в ходе исследования показано, что в результате центрифугирования образцов после гомогенизации споры трюфелевых грибов оседают на дно микроцентрифужной пробирки, в то время как обломки гифов, симбионтов и патогенов остаются в надосадочной жидкости. Применение пятикратной отмывки споровой суспензии, сопряженной с центрифугированием, позволяет достичь высокой степени чистоты споровой суспензии, что необходимо для получения чистой культуры трюфеля и снижения воздействия на нее симбиотных и патогенных микроорганизмов, присутствующих в нормальных условиях в составе плодового тела.

Работы, направленные на проращивание в термостатируемых условиях (22–24 °C) споровой суспензии, полученной после гомогенизации с использованием блендера и вибрационного измельчителя (шаровой мельницы), показали, что споры по истечении одной недели не образуют мицелий в 95,1±2% случаев. Споры сохранялись объемными и набухшими до 10 суток (рис. 2, а) и только через две недели в 75,8±9,4% случаев начинали формировать грибные гифы из спор трюфеля (рис. 2, б). Споры, проращиваемые на предметных стеклах, инкубируемых при температуре от 18 до

22 °C, набухли в объеме на 18±3% к 14 суткам эксперимента, однако следов прорастания спор при этом не наблюдали. Споры, проращиваемые на предметных стеклах и инкубируемые при температуре 26–30 °C, не изменили своей морфологии в ходе всего времени эксперимента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов установлено, что комбинированная гомогенизация с использованием погружного блендера и вибрационного измельчителя, а также очистка полученной суспензии при помощи центрифугирования является наиболее эффективным методом получения посевного материала спор трюфелевых грибов. Полученные результаты были подтверждены при помощи проращивания спор трюфелей на агаризованных питательных средах и микроскопического контроля. Использование данного метода может быть полезным для обеспечения более эффективного и быстрого прорастания спор трюфелевых грибов на различных субстратах в лабораторных контролируемых условиях. Принимая во внимание обнаруженное отсутствие трюфелевых грибов в посевном материале российских поставщиков, разработанный метод может быть применен для грибоводства и полезен при формировании производств черных трюфелевых грибов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ori F., Hall I., Gianchino C., Iotti M., Zambonelli A. Truffles and morels: two different evolutionary strategies of fungal-plant interactions in the Pezizales // Plant-microbe interface / eds A. Varma, S. Tripathi, R. Prasad. Cham: Springer, 2019. P. 69–93. DOI: 10.1007/978-3-030-19831-2_3.
2. True truffle (*Tuber* spp.) in the world / eds A. Zambonelli, M. Iotti, C. Murat. Cham: Springer, 2016. 436 p. DOI: 10.1007/978-3-319-31436-5.
3. Marozzi G., Benucci G.M.N., Turchetti B., Massaccesi L., Baciarelli F.L., Bonito G., et al. Fungal and bacterial diversity in the *Tuber magnatum* ecosystem and microbiome // Environmental Microbiology. 2023. Vol. 85. P. 508–521. DOI: 10.1007/s00248-021-01950-1.
4. Vahdatzadeh M., Deveau A., Splivallo R. Are bacteria responsible for aroma deterioration upon storage of the black truffle *Tuber aestivum*: a microbiome and volatiles study // Food Microbiology. 2019. Vol. 84. P. 103251. DOI: 10.1016/j.fm.2019.103251.
5. Splivallo R., Deveau A., Valdez N., Kirchoff N., Frey-Klett P., Karlovsky P. Bacteria associated with truffle-fruiting bodies contribute to truffle aroma // Environmental Microbiology. 2015. Vol. 17, no. 8. P. 2647–2660. DOI: 10.1111/1462-2920.12521.
6. Allen K., Bennet J.W. Tour of truffles: aromas, aphrodisiacs, adaptogens, and more // Mycobiology. 2021. Vol. 49, no. 3. P. 201–212. DOI: 10.1080/12298093.2021.1936766.
7. Zambonelli A., Iotti M., Hall I. Current status of truffle cultivation: recent results and future perspectives // Mycologia Italiana. 2015. Vol. 44, no. 1. P. 31–40. DOI: 10.6092/issn.2465-311X/5593.
8. Hall I.R., Fitzpatrick N., Miros P., Zambonelli A. Counter-season cultivation of truffles in the Southern Hemisphere: an update // Italian Journal of Mycology. 2017. Vol. 46. P. 21–36. DOI: 10.6092/issn.2531-7342/6794.
9. Reyna S., Garcia-Barreda S. Black truffle cultivation: a global reality // Forest Systems. 2014. Vol. 23, no. 2. P. 317–328. DOI: 10.5424/fs/2014232-04771.
10. Deveau A., Clowez P., Petit F., Maurice J.-P., Todesco F., Murat C., et al. New insights into black truffle biology: discovery of the potential connecting structure between a *Tuber aestivum* ascocarp and its host root // Mycorrhiza. 2019. Vol. 29. P. 219–226. DOI: 10.1007/s00572-019-00892-4.
11. Gómez-Molina E., Sánchez S., Puig-Pey M., Garcia-Barreda S. Sequential application of inoculation methods improves mycorrhization of *Quercus ilex* seedlings by *Tuber melanosporum* // Fungal Biology. 2023. Vol. 127, no. 10-11. P. 1328–1335. DOI: 10.1016/j.funbio.2023.07.004.
12. Пат. 23874A4, Республика Казахстан, С12N 1/14, С12M 1/24. Способ и устройство для получения биомассы трюфеля и других съедобных грибов / Р.К. Блиева, Д.Н. Козыбаева, Ж.Б. Сулейменова, Е.Н. Блиев, Д.Н. Блиев. Оpubл. 15.04.2011. Бюл. № 4.
13. Пат. no. CN108934768B, China. Black spore truffle inoculation microbial inoculum, treatment method thereof and mycorrhiza cultivation method / X. Li, L. Ye, J. Zou, J. Zong, D. Wang, X. He, et al. Published 24.11.2020.
14. Пат. no. TW202038705A, Taiwan. Preparation method of truffle strain liquid and cultivation method of truffle mycorrhizal seedling / C.-M. Chen, H.-W. Huang, T.-C. Lin, S.-B. Lin. Published 01.11.2020.
15. Garcia-Barreda S., Marco P., Bonito G., Parladé J., Sánchez S., González V., et al. Interannual dynamics of *Tuber melanosporum* and fungal communities in productive black truffle orchards amended with truffle nests // FEMS Microbiology Ecology. 2023. Vol. 99, no. 8. DOI: 10.1093/femsec/fiad084.
16. Morte A., Arenas F., Marqués-Gálvez J.E., Andriano A.,

Guarnizo Á.L., Gutiérrez A., et al. Desert truffles (*Terfezia* spp.) breeding // *Advances in plant breeding strategies: vegetable crops* / eds J.M. Al-Khayri, S.M. Jain, D.V. Johnson. Cham: Springer, 2021. P. 479–504. DOI: 10.1007/978-3-030-66969-0_13.

17. Elliott T.F., Vernes K. Superb Lyrebird *Menura novae-hollandiae* mycophagy, truffles and soil disturbance // *IBIS*. 2019. Vol. 161, no. 1. P. 198–204. DOI: 10.1111/ibi.12644.

18. Ori F., Menotta M., Leonardi M., Amicucci A., Zambonelli A., Covès H., et al. Effect of slug mycophagy on *Tuber aestivum* spores // *Fungal Biology*. 2021. Vol. 125,

no. 10. P. 796–805. DOI: 10.1016/j.funbio.2021.05.002.

19. Thomas P.W., Thomas H.W. Mycorrhizal fungi and invertebrates: Impacts on *Tuber melanosporum* ascospore dispersal and lifecycle by isopod mycophagy // *Food Webs*. 2022. Vol. 33. P. e00260. DOI: 10.1016/j.fooweb.2022.e00260.

20. Mello A., Zampieri E., Zambonelli A. Truffle ecology: genetic diversity, soil interactions and functioning // *Mycorrhiza – function, diversity, state of the art* / eds A. Varma, R. Prasad, N. Tuteja. Cham: Springer, 2017. P. 231–252. DOI: 10.1007/978-3-319-53064-2_11.

REFERENCES

1. Ori F., Hall I., Gianchino C., Iotti M., Zambonelli A. Truffles and morels: two different evolutionary strategies of fungal-plant interactions in the Pezizales. In: Varma A., Tripathi S., Prasad R. (eds). *Plant microbe interface*. Cham: Springer; 2019, p. 69–93. DOI: 10.1007/978-3-030-19831-2_3.

2. Zambonelli A., Iotti M., Murat C. *True truffle (Tuber spp.) in the world*. Cham: Springer; 2016, 436 p. DOI: 10.1007/978-3-319-31436-5.

3. Marozzi G., Benucci G.M.N., Turchetti B., Massaccesi L., Baciarelli F.L., Bonito G., et al. Fungal and bacterial diversity in the *Tuber magnatum* ecosystem and microbiome. *Environmental Microbiology*. 2023;85:508–521. DOI: 10.1007/s00248-021-01950-1.

4. Vahdatzadeh M., Deveau A., Splivallo R. Are bacteria responsible for aroma deterioration upon storage of the black truffle *Tuber aestivum*: a microbiome and volatilomestudy. *Food Microbiology*. 2019;84:103251. DOI: 10.1016/j.fm.2019.103251.

5. Splivallo R., Deveau A., Valdez N., Kirchhoff N., Frey-Klett P., Karlovsky P. Bacteria associated with truffle-fruiting bodies contribute to truffle aroma. *Environmental Microbiology*. 2015;17(8):2647–2660. DOI: 10.1111/1462-2920.12521.

6. Allen K., Bennet J.W. Tour of truffles: aromas, aphrodisiacs, adaptogens, and more. *Mycobiology*. 2021;49(3):201–212. DOI: 10.1080/12298093.2021.1936766.

7. Zambonelli A., Iotti M., Hall I. Current status of truffle cultivation: recent results and future perspectives. *Mycologia Italiana*. 2015;44(1):31–40. DOI: 10.6092/issn.2465-311X/5593.

8. Hall I.R., Fitzpatrick N., Miros P., Zambonelli A. Counter-season cultivation of truffles in the Southern Hemisphere: an update. *Italian Journal of Mycology*. 2017;46:21–36. DOI: 10.6092/issn.2531-7342/6794.

9. Reyna S., Garcia-Barreda S. Black truffle cultivation: a global reality. *Forest Systems*. 2014;23(2):317–328. DOI: 10.5424/fs/2014232-04771.

10. Deveau A., Clowez P., Petit F., Maurice J.-P., Todesco F., Murat C., et al. New insights into black truffle biology: discovery of the potential connecting structure between a *Tuber aestivum* ascocarp and its host root. *Mycorrhiza*. 2019;29:219–226. DOI: 10.1007/s00572-019-00892-4.

11. Gómez-Molina E., Sánchez S., Puig-Pey M., Gar-

cia-Barreda S. Sequential application of inoculation methods improves mycorrhization of *Quercus ilex* seedlings by *Tuber melanosporum*. *Fungal Biology*. 2023;127(10-11):1328–1335. DOI: 10.1016/j.funbio.2023.07.004.

12. Bliieva R.K., Kozybaeva D.N., Suleimenova Zh.B., Bliiev E.N., Bliiev D.N. *Method and device for obtaining biomass of truffle and other edible mushrooms*. Patent KZ, no. 23874 A4; 2011. (In Russian).

13. Li X., Ye L., Zou J., Zong J., Wang D., He X., et al. *Black spore truffle inoculation microbial inoculum, treatment method thereof and mycorrhiza cultivation method*. Patent CN, no. CN108934768B; 2020. (In Chinese).

14. Chen C.-M., Huang H.-W., Lin T.-C., Lin S.-B. *Preparation method of truffle strain liquid and cultivation method of truffle mycorrhizal seedling*. Patent TW, no. TW202038705A; 2020. (In Chinese).

15. Garcia-Barreda S., Marco P., Bonito G., Parladé J., Sánchez S., González V., et al. Interannual dynamics of *Tuber melanosporum* and fungal communities in productive black truffle orchards amended with truffle nests. *FEMS Microbiology Ecology*. 2023;99(8). DOI: 10.1093/femsec/fiad084.

16. Morte A., Arenas F., Marqués-Gálvez J.E., Andriano A., Guarnizo Á.L., Gutiérrez A., et al. Desert truffles (*Terfezia* spp.) breeding. In: Al-Khayri J.M., Jain S.M., Johnson D.V. (eds). *Advances in plant breeding strategies: vegetable crops*. Cham: Springer; 2021, p. 479–504. DOI: 10.1007/978-3-030-66969-0_13.

17. Elliott T.F., Vernes K. Superb Lyrebird *Menura novae-hollandiae* mycophagy, truffles and soil disturbance. *IBIS*. 2019;161(1):198–204. DOI: 10.1111/ibi.12644.

18. Ori F., Menotta M., Leonardi M., Amicucci A., Zambonelli A., Covès H., et al. Effect of slug mycophagy on *Tuber aestivum* spores. *Fungal Biology*. 2021;125(10):796–805. DOI: 10.1016/j.funbio.2021.05.002.

19. Thomas P.W., Thomas H.W. Mycorrhizal fungi and invertebrates: Impacts on *Tuber melano-sporum* ascospore dispersal and lifecycle by isopod mycophagy. *Food Webs*. 2022;33:e00260. DOI: 10.1016/j.fooweb.2022.e00260.

20. Mello A., Zampieri E., Zambonelli A. Truffle ecology: genetic diversity, soil interactions and functioning. In: Varma A., Prasad R., Tuteja N. (eds). *Mycorrhiza – function, diversity, state of the art*. Cham: Springer; 2017, p. 231–252. DOI: 10.1007/978-3-319-53064-2_11.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Имидоева Наталья Александровна,
лаборант-исследователь,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
✉ nat.imidoeva@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-6327-5517>

Малыгина Екатерина Владимировна,
научный сотрудник,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
cat.malygina@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-2673-0226>

Бельшенко Александр Юрьевич,
научный сотрудник,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
al.belyshenko@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-8812-2250>

Дмитриева Мария Егоровна,
младший научный сотрудник,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1,
Российская Федерация,
marriee.dmitrieva@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-9229-1954>

Шелковникова Виктория Николаевна,
лаборант-исследователь,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
shelkovnikova551@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4411-7521>

Моргунова Мария Михайловна,
научный сотрудник,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
аспирант,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
marymikhmorg@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7939-1432>

Кулинич София Владимировна,
студент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
kulinich.sophie@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0004-0701-2175>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Natalia A. Imidoeva,
Laboratory Assistant-Researcher,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
✉ nat.imidoeva@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-6327-5517>

Ekaterina V. Malygina,
Researcher,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
cat.malygina@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-2673-0226>

Aleksandr Yu. Belyshenko,
Researcher,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
al.belyshenko@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-8812-2250>

Maria E. Dmitrieva,
Junior Researcher,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
marriee.dmitrieva@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-9229-1954>

Victoria N. Shelkovnikova,
Laboratory Assistant-Researcher,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
shelkovnikova551@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4411-7521>

Maria M. Morgunova,
Researcher,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
Postgraduate Student,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
marymikhmorg@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7939-1432>

Sophia V. Kulinich,
Student,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
kulinich.sophie@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0004-0701-2175>

Вавилина Татьяна Николаевна,
студент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
t.vavilina03@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0001-9725-9523>

Tatyana N. Vavilina,
Student,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
t.vavilina03@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0001-9725-9523>

Евстафьев Сергей Николаевич,
д.х.н., профессор, заведующий кафедрой,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
esn@istu.edu
<https://orcid.org/0000-0002-3681-9478>

Sergei N. Evstaf'ev,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Head of the Department,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
esn@istu.edu
<https://orcid.org/0000-0002-3681-9478>

Аксёнов-Грибанов Денис Викторович,
к.б.н., доцент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
denis.axengri@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2020-6084>

Denis V. Axenov-Gribanov,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
denis.axengri@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2020-6084>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 22.03.2023.
Одобрена после рецензирования 19.11.2023.
Принята к публикации 30.11.2023.

Information about the article

*The article was submitted 22.03.2023.
Approved after reviewing 19.11.2023.
Accepted for publication 30.11.2023.*

Научная статья
УДК 635.21:579.64(470.57)
EDN: CLFIST
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-569-578



Влияние эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* на активность метаболических процессов, протекающих в клубнях картофеля при хранении

Л.И. Пусенкова*✉, С.Р. Гарипова***, О.В. Ласточкина***,

И.А. Шпирная**, В.А. Валиева*

*Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, г. Уфа, Российская Федерация

**Уфимский университет науки и технологий, г. Уфа, Российская Федерация

***Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, г. Уфа, Российская Федерация

Аннотация. Изучено влияние предпосадочной инокуляции клубней картофеля бактериями *Bacillus subtilis* на биохимические процессы в клубнях нового урожая в послеуборочный период в разные сроки хранения. Содержание малонового диальдегида в клубнях, обработанных штаммами 10-4 и 26Д, через 1 и 6 месяцев снижалось на 15,5 и 35,5% и на 14,9 и 13,6% относительно контроля. Содержание пролина в клубнях, предобработанных штаммом 10-4, в оба срока хранения незначительно отличалось от контроля, а в случае использования штамма 26Д было ниже контроля на 14,7 и 26,3%. Сначала активность защитных белков в обработанных клубнях снижалась относительно контроля, затем активность ингибиторов трипсина в клубнях значительно превышала показатели в клубнях, хранящихся непродолжительное время. Содержание белка в предобработанных клубнях сначала было выше контроля, затем либо на уровне (штамм 26Д), либо на 15% ниже контроля (штамм 10-4). Содержание аскорбиновой кислоты в предобработанных штаммом 10-4 клубнях на 16,1 и 17,9% превышало контроль через 1 и 6 месяцев хранения, а в случае использования штамма 26Д не отличалось от контроля. Количество редуцирующих сахаров было на 39,4% ниже контроля через 1 и 6 месяцев хранения (штамм 10-4) и на 35,6% через 6 месяцев хранения (штамм 26Д). Предобработка штаммами 10-4 и 26Д положительно повлияла на основные биохимические показатели клубней при длительном хранении, обеспечив защитный эффект и сохранение биологической ценности продукции.

Ключевые слова: эндофитные бактерии, картофель, хранение, ингибиторы трипсина, протеолитическая активность

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00262 (<https://rscf.ru/project/23-26-00262/>).

Для цитирования: Пусенкова Л.И., Гарипова С.Р., Ласточкина О.В., Шпирная И.А., Валиева В.А. Влияние эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* на активность метаболических процессов, протекающих в клубнях картофеля при хранении // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 569–578. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-569-578. EDN: CLFIST.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Effect of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* on metabolic processes in potato tubers during storage

Ludmila I. Pusenkova*✉, Svetlana R. Garipova***, Oksana V. Lastochkina***,

Irina A. Shpirnaya**, Valeria A. Valieva*

*Bashkir Research Institute of Agriculture of Ufa Federal Research Centre RAS, Ufa, Russian Federation

**Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russian Federation

***Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Centre RAS, Ufa, Russian Federation

© Пусенкова Л.И., Гарипова С.Р., Ласточкина О.В., Шпирная И.А., Валиева В.А., 2023

Abstract. The article examines the effect produced by the preplant inoculation of potato tubers with *Bacillus subtilis* on biochemical processes occurring in the tubers of a new crop during the postharvest period at different storage periods. The content of malondialdehyde in tubers treated with strains 10-4 and 26D decreased by 15.5 and 35.5% and by 14.9 and 13.6% relative to the control after one and six months, respectively. The proline content in tubers pretreated with strain 10-4 differed insignificantly from the control in both storage periods, while in the case of strain 26D, it was lower than the control by 14.7 and 26.3%. First, the activity of protective proteins in treated tubers decreased relative to the control; then, the activity of trypsin inhibitors in tubers was found to significantly exceed that in tubers stored for a short time. The protein content of pretreated tubers was initially higher than that of the control; then, it was either at the same level (strain 26D) or 15% lower than the control (strain 10-4). The content of ascorbic acid in tubers pretreated with strain 10-4 exceeded that of the control by 16.1 and 17.9% after one and six months of storage, respectively, whereas in the case of strain 26D, no difference from the control was noted. The amount of reducing sugars was 39.4% lower than the control after one and six months of storage (strain 10-4) and 35.6% after six months of storage (strain 26D). The pretreatment with strains 10-4 and 26D positively affected the main biochemical parameters of tubers during long-term storage, providing a protective effect and preserving the biological value of produce.

Keywords: endophytic bacteria, potatoes, storage, trypsin inhibitors, proteolytic activity

Funding. The Russian Science Foundation (grant no. 23-26-00262; <https://rscf.ru/project/23-26-00262/>) supported the study.

For citation: Pusenkova L.I., Garipova S.R., Lastochkina O.V., Shpirnaya I.A., Valieva V.A. Effect of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* on metabolic processes in potato tubers during storage. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):569-578. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-569-578. EDN: CLFIST.

ВВЕДЕНИЕ

Картофель является одной из важнейших полевых культур, особенность биологии которой связана с вегетативным способом ее размножения. Вследствие регулярного накопительного воздействия фитопатогенов данная культура с течением времени вырождается и физиологически стареет под влиянием абиотических стрессов, связанных с неблагоприятными внешними факторами при выращивании и хранении [1], что вызывает как снижение урожая клубней и их качества, так и ухудшение их сохранности. Качество клубней, сформированное в полевых условиях во время роста и развития растений, должно быть сохранено во время послеуборочного хранения [2]. Повышение сохранности семенного и продовольственного картофеля является особенно актуальным вопросом, поскольку ежегодные потери урожая при хранении вследствие клубневых инфекций составляют от 15–20 до 80–100% [3]. Хранение клубней – это естественный процесс их старения [4], на который оказывает влияние множество факторов, в том числе сорт картофеля, зрелость клубней [5, 6], а также биохимические, физиологические и микробиологические процессы, протекающие в поствегетационный период [7].

Применение микробных биопрепаратов оказывает направленное воздействие на ход обменных процессов в клубнях при их хранении, обеспечивая сокращение потерь. Так, обработки клубней препаратами группы «Экстрасол» (штамм *Bacillus subtilis* Ч-13) в лечебный период снижают потери в период хранения более чем на 30% [8]. Биологическая эффективность обработки клубней жидкой препаративной формой на основе штамма *B. subtilis* И5-12/23 перед закладкой на длительное хранение составила 78,9–86,9% и была выше, чем у химического стандарта – фунгицида «Максим КС» (52,1%) [9]. Применение микробных препаратов для интенсификации адаптационных защитных реакций клубней картофеля при хранении – эффективный прием,

активирующий ответные защитные реакции клубней более чем в 2 раза [8].

Особый интерес представляют эндофитные бактерии *B. subtilis*, способные колонизировать ткани растений-хозяев и изнутри влиять на их метаболизм в ходе всего онтогенеза, сохраняя защитный потенциал в послеуборочный период [10]. Ранее нами было показано пролонгированное действие биопрепарата «Фитоспорин-М» (штамм *B. subtilis* 26Д) на сохранность клубней: полученные при обработке растений клубни обладали более высокой устойчивостью к возбудителям фузариозной сухой гнили и фитофтороза в период хранения по сравнению с контрольными [11]. Доказана также способность модулировать защитные механизмы гидропонных стерильных клубней при обработке *B. subtilis* непосредственно перед закладкой на хранение [12].

Поскольку формирование конституционных защитных механизмов происходит во время роста, одним из механизмов защиты клубней при хранении может являться иммунизация растений в период их выращивания. Сведения о физиологических механизмах сохранения индуцированной в полевых условиях устойчивости клубней картофеля в поствегетационный период в научной литературе практически отсутствуют.

Целью проведенной работы являлось изучение влияния предпосадочной обработки клубней эндофитными бактериями *B. subtilis* на адаптационные защитные реакции картофеля при его хранении.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводили на клубнях картофеля сорта Башкирский, выращенных из предобработанных штаммами *B. subtilis* 10-4 (10^8 КОЕ/мл) и 26Д (10^9 КОЕ/мл) клубней в полевых условиях и заложенных на длительное хранение. Объектами исследования являлись эндофитные бактерии *B. subtilis*: штаммы 10-4 (новый штамм из коллекции Башкирского научно-исследовательского института сельского хозяйства,

регистрационный номер Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов В-12988) и 26Д (эталонный штамм, регистрационный номер 016-02-2491-1, бактериальная основа препарата биофунгицидного действия «Фитоспорин-М» научно-внедренческого предприятия «Башинком»). Предпосадочную обработку клубней проводили путем опрыскивания жидкой формой препарата штаммов бактерии *B. subtilis* 10-4 и 26Д в концентрации 10^8 КОЕ/мл.

Влияние предобработок растений эндофитными бактериями на биохимические показатели работы фитоиммунной системы в клубнях картофеля в период хранения оценивали через 1 месяц после уборки (лечебный период, в течение которого клубни хранились при температуре 16 °С для залечивания механических повреждений, созревания клубней и их подготовки к длительному хранению) и через 6 месяцев хранения при температуре 3 ± 1 °С по степени накопления конечного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малонового диальдегида (МДА), содержанию пролина, неферментативного антиоксиданта – аскорбиновой кислоты, оценивали также протеолитическую активность и уровень активности ингибиторов трипсина, содержание редуцирующих сахаров.

Оценка уровня перекисного окисления липидов. Об интенсивности ПОЛ судили по содержанию в клубнях конечного продукта ПОЛ – МДА – с помощью цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой [13]. Навеску клубней (0,5 г) растирали с 3 мл дистиллированной воды, добавляли 3 мл 20%-й трихлоруксусной кислоты и центрифугировали (10000 g, 10 мин). К 2 мл надосадочной жидкости добавляли 2 мл 0,5%-й тиобарбитуровой кислоты в 20%-й трихлоруксусной кислоте, инкубировали при 100 °С (30 мин), далее раствор охлаждали и измеряли оптическую плотность при 532 и 590 нм (Spectrophotometer SmartSpec™ Plus, Bio-Rad, США). Концентрацию МДА вычисляли с использованием коэффициента молярной экстинкции $155000 \text{ л}/(\text{см} \cdot \text{моль})$.

Определение содержания пролина. Содержание пролина оценивали с помощью нингидринового реактива [14]. Навеску клубней (0,5 г) заливали 5 мл кипящей дистиллированной воды, инкубировали при 100 °С (30 мин) и охлаждали. Далее 1 мл экстракта смешивали с 1 мл нингидринового реактива и 1 мл ледяной уксусной кислоты, инкубировали при 100 °С (1 ч) и охлаждали. Оптическую плотность растворов измеряли при 522 нм (Spectrophotometer SmartSpec™ Plus, Bio-Rad, США).

Определение содержания аскорбиновой кислоты. Определение содержания аскорбиновой кислоты проводили методом титрования (ГОСТ 24556-89). Навеску (10 г) растирали с 10 мл дистиллированной воды, переносили в колбу на 100 мл, выдерживали 10 мин, а затем фильтровали. Полученный экстракт использовали для титрования раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до установления розовой окраски.

Определение активности ингибиторов трипсина и протеолитической активности. Для получения экстрактов из клубня пробочным сверлом вырезали цилиндры, включающие все зоны клубня. Навеску клубня гомогенизировали в фарфоровой ступке со стеклянным песком, ресуспендировали в дистиллированной воде

(1:9) и выдерживали 30 мин при 4 °С. Полученный экстракт дважды центрифугировали при 10000 g и 4 °С в течение 10 мин на центрифуге Eppendorf 5417R (Eppendorf, Германия). В супернатанте определяли активность ингибиторов трипсина и протеолитическую активность. Супернатанты замораживали и хранили при минус 18 °С. Для определения содержания белка их размораживали, центрифугировали при 10000 g и 4 °С в течение 10 мин, белок определяли по Бредфорду. Протеолитическую активность определяли по методу Эрлангера [15], активность ингибиторов трипсина определяли методом Гофмана и Вайсблая [16] микрометодом, оптическую плотность измеряли на планшетном фотометре «Униплан» (АИФР-01) (ПИКОН, Россия).

Содержание редуцирующих сахаров. Содержание редуцирующих сахаров определяли спектрофотометрическим методом, основанном на их способности давать окрашенные соединения с 3,5-динитросалициловой кислотой [17].

Все эксперименты были проведены в трех биологических и трех аналитических повторах. Статистическая обработка данных включала оценку достоверности различий средних арифметических (t-тест) при уровне значимости $p < 0,05$ с использованием программ Microsoft Excel.

Происходящие при длительном хранении клубней окислительно-восстановительные процессы, в результате которых накапливаются продукты ПОЛ и снижается функция антиоксидантной системы, рассматриваются в качестве основных физиолого-биохимических механизмов, определяющих сохранность картофеля [18]. Соответственно, по степени накопления или убывания в клубнях конечного продукта ПОЛ – МДА, а также пролина – многофункционального стрессового метаболита растений, выполняющего также роль антиоксиданта, можно судить о характере и направленности физиологических процессов в клубнях под влиянием предобработки бактериями и оценить вклад этого фактора в повышение жизнеспособности клубней в период хранения.

Анализ содержания МДА показал, что в клубнях без обработки (контроль) в период длительного хранения (6 месяцев) по сравнению с его уровнем при краткосрочном хранении отмечена активация реакций ПОЛ. Так, в контроле уровень МДА после 6 месяцев хранения составил 15,79 нМг/г сырой массы, что на 36,8% выше по сравнению с первоначальным значением. В то же время в предобработанных эндофитными бактериями *B. subtilis* клубнях отмечено снижение уровня накопления МДА по сравнению с контролем на 15,5 и 35,5% через 1 и 6 месяцев хранения в случае использования штамма 10-4 и на 14,9 и 13,6% при обработке штаммом 26Д соответственно (рис. 1, а). Таким образом, в начале срока хранения и особенно через полгода хранения обработанные бактериями *B. subtilis* клубни отличались сниженным по сравнению с необработанными клубнями содержанием МДА, что свидетельствовало о протекторной роли бактерий, приводящей к ослаблению окислительных повреждений мембран.

Увеличение содержания пролина в растениях часто связывают с активизацией процессов системной защиты в ответ на стрессовые воздействия, а величину его снижения – со степенью физиологического благополучия

организма [19]. Выявлено, что в начальный срок хранения содержание пролина как в клубнях, предобработанных штаммом 10-4, так и в контрольном варианте отличалось незначительно и составило 1,09 и 1,19 мкг/г сырой массы, тогда как содержание пролина в клубнях, предобработанных штаммом 26Д, было ниже контроля на 14,7 и 26,3% соответственно в начальный и конечный сроки хранения (рис. 1, b). Очевидно, что эти штаммы по-разному воздействуют на физиологические процессы в длительно хранящихся клубнях. Под влиянием штамма 10-4 в конечный срок хранения отмечено большее снижение содержания МДА и большее увеличение содержания пролина по отношению к варианту обработки штаммом 26Д.

Известно, что одним из механизмов защитного действия растений против фитопатогенов и фитофагов является продукция защитных белков, ингибирующих активность протеиназ патогенов и фитофагов [20], синтез которых может индуцироваться под влиянием эндофитных бактерий *B. thuringiensis* штамма В-5351 [21]. Представляло интерес исследование активности

данных соединений в хранящихся клубнях в связи с бактериальной обработкой эндофитных штаммов *B. subtilis* 10-4 и 26Д (рис. 2).

Анализ ингибиторной активности в тканях заложенных на хранение клубней, полученных от предобработанных штаммами *B. subtilis* 10-4 и 26Д растений, показал, что при непродолжительном хранении уровень активности ингибиторов трипсина в контрольном варианте был значительно выше при сравнении с клубнями, подвергнутыми бактериальной обработке (см. рис. 2, а). Однако при анализе данной активности после длительного хранения показано, что клубни, полученные из предобработанных растений, существенно превышали уровень контрольного варианта по содержанию белков – ингибиторов трипсина. Таким образом, обработка имела модулирующий эффект на показатели активности защитных белков. В начале срока закладки на хранение в обработанных бактериями клубнях наблюдалось снижение содержания данных соединений по сравнению с контролем. Это может быть связано с реакциями, приводящими к эффекту праймирования,

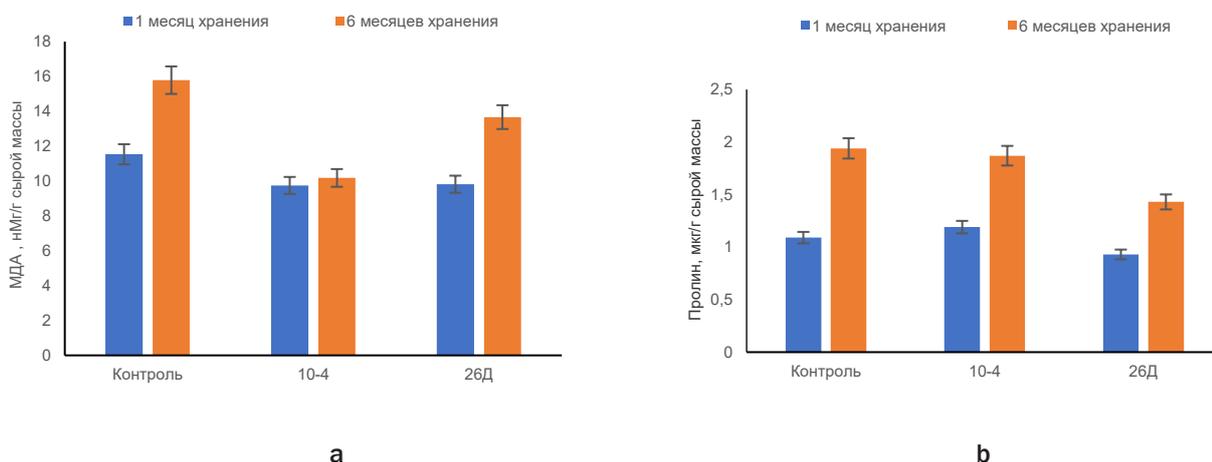


Рис. 1. Влияние предобработки штаммами *Bacillus subtilis* 10-4 и 26Д на содержание малонового диальдегида (а) и пролина (b) в клубнях при хранении

Fig. 1. Impact of *Bacillus subtilis* (10-4, 26D) on the content of malondialdehyde (a) and proline (b) in tubers during storage

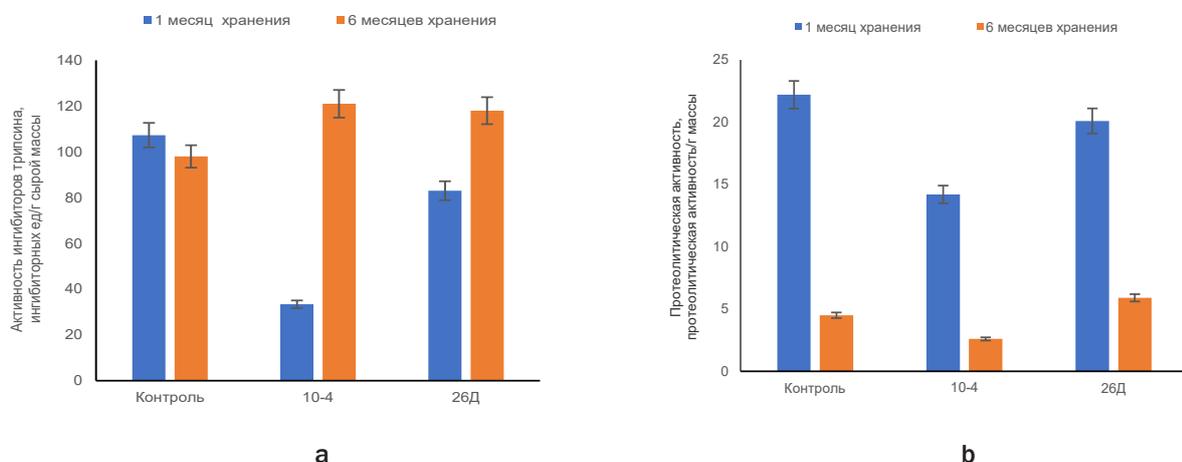


Рис. 2. Влияние предобработки штаммами *Bacillus subtilis* 10-4 и 26Д на уровень активности ингибиторов трипсина (а) и протеолитической активности (b) в клубнях при хранении

Fig. 2. Impact of *Bacillus subtilis* (10-4, 26D) on the level of trypsin inhibitors activity (a) and proteolytic activity in tubers (b)

в которых действие эндофитных бактерий может быть сравнимо с процессами слабого патогенеза.

Тем не менее в конце срока хранения активность ингибиторов протеиназ в клубнях значительно превышала показатели клубней, хранящихся непродолжительное время, что свидетельствовало об усилении защитного действия обоих штаммов эндофитных бактерий в клубнях при длительном хранении. Примечательно, что в контрольных образцах данная активность не столь лабильна и незначительно снижается к концу хранения.

Протеолитическая активность тканевых ферментов имела тенденцию к снижению как в контрольных, так и в обработанных бактериями клубнях, что уменьшает вероятность накопления свободных аминокислот (см. рис. 2, б). Примечательно, что наибольшее снижение протеолитической активности (на 36 и 42,2% по отношению к контролю соответственно) выявлено в варианте обработки штаммом 10-4. Таким образом, обработка эндофитными бактериями оказала модулирующий и штаммоспецифичный по силе воздействия эффект на показатели активности защитных белков.

В состоянии пониженной функциональной активности растительного организма при низкой температуре хранения уровень аскорбиновой кислоты может характеризовать ответную реакцию растительных тканей на продукты метаболизма бактерий [8]. В нашем эксперименте выявлено, что содержание аскорбиновой кислоты в предобработанных эндофитными бактериями *B. subtilis* штамма 10-4 клубнях превышало величину этого показателя в контроле на 16,1% через 1 месяц и на 17,9% через 6 месяцев хранения. При этом содержание аскорбиновой кислоты в предобработанных штаммом *B. subtilis* 26Д клубнях в оба срока достоверно не отличалось от контроля (рис. 3, а). Можно предположить, что повышенное накопление антиоксиданта в варианте бактериализации штаммом 10-4 (см. рис. 3, а) явилось компенсаторной реакцией растения на снижение активности ингибиторов протеиназ (см. рис. 2, а).

Отмечена тенденция снижения содержания растворимого белка при хранении. Бактериальные обработки оказали влияние на данный показатель, который зависел от срока хранения клубней (рис. 3, б). Так, при непродолжительном хранении содержание белка в обработанных клубнях на 20% превышало значения контрольного варианта. При длительном хранении данный показатель оказался на уровне контрольного варианта (штамм 26Д) или был снижен на 15% (штамм 10-4).

За период хранения в контрольных клубнях произошло увеличение содержания редуцирующих сахаров на 48,2% (рис. 3, с), что снижало технологическое качество клубней и их лежкость. В начальный срок хранения в обработанных штаммом 10-4 клубнях содержание редуцирующих сахаров было исходно ниже контроля на 39,4%. Но к концу 6-месячного срока хранения оно сравнялось с величиной данного показателя в обработанных штаммом 26Д клубнях. При этом оба инокулированных варианта характеризовались меньшим накоплением редуцирующих сахаров при длительном хранении по сравнению с контролем на 39,4% (штамм 10-4) и 35,6% (штамм 26Д), что сопряжено с положительным влиянием на пригодность к переработке хранящихся клубней.

По совокупности измеренных физиолого-биохимических показателей клубней в период хранения

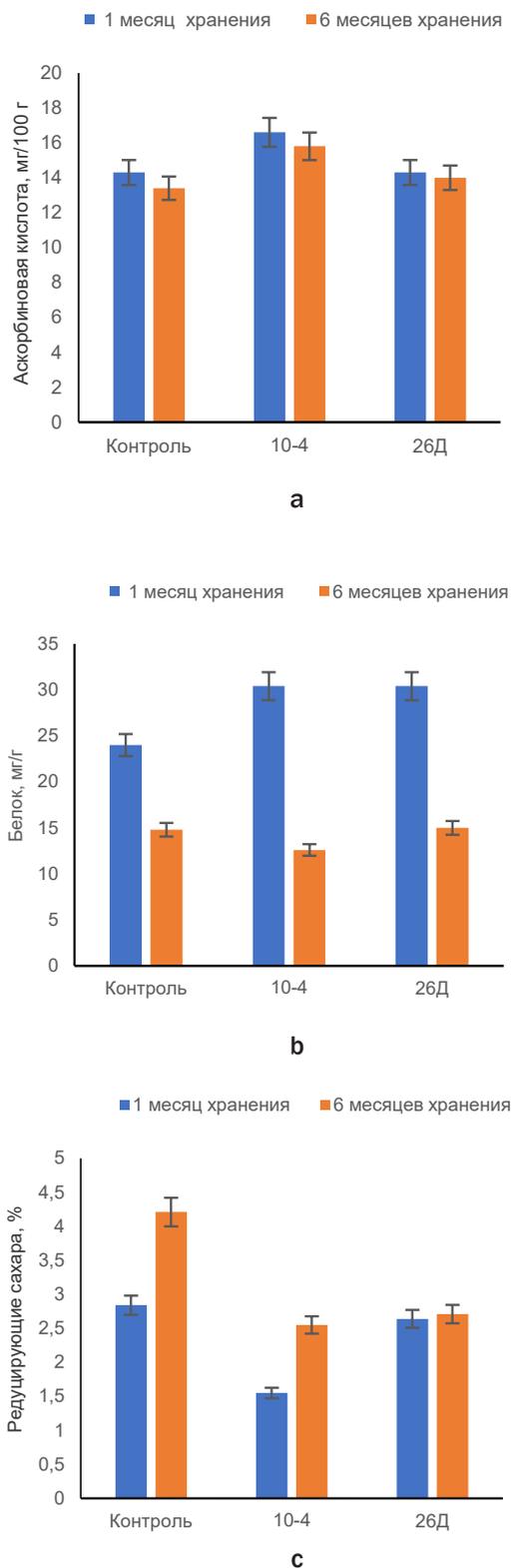


Рис. 3. Влияние предобработки штаммами *Bacillus subtilis* 10-4 и 26Д на содержание аскорбиновой кислоты (а), растворимого белка (б) и редуцирующих сахаров (с) в клубнях при хранении

Fig. 3. Impact of *Bacillus subtilis* (10-4, 26D) on the content of ascorbic acid (a), soluble protein (b), and reducing sugars (c) in tubers during storage

выявлено, что предобработка эндофитными бактериями положительно повлияла на хозяйственно-ценные признаки клубней, обеспечив защитный эффект, который в большей степени был выражен при обработке штаммом *B. subtilis* 10-4. Это выразилось в уменьшении содержания МДА, повышении содержания пролина, уменьшении активности протеиназ и увеличении содержания аскорбиновой кислоты по сравнению с действием штамма 26Д, при этом оба штамма способствовали повышению уровня активности ингибиторов протеиназ и уменьшению содержания редуцирующих сахаров.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что инокуляция эндофитными бактериями не только оказывает долгосрочное действие на растение в течение его онтогенеза, но и влияет на физиологическое состояние клубней в период их хранения [11]. Для оценки вклада обработки растений картофеля бактериями *B. subtilis* штаммов 26Д и 10-4 нами были оценены такие физиолого-биохимические показатели клубней, как содержание в их тканях МДА, пролина, активность ингибиторов трипсина и протеиназная активность, а также содержание аскорбиновой кислоты, растворимого белка и редуцирующих сахаров.

Выявленное в эксперименте увеличение содержания МДА в контрольных клубнях при хранении, вероятно, связано с процессами физиологического старения клубней, которые сопровождаются нарушением внутриклеточного баланса активных форм кислорода (АФК). Увеличение концентрации свободных радикалов изменяет нормальный редокс-статус клеток, вызывая окислительные стрессы, которые приводят к повреждению функциональных макромолекул (ферментов) и нарушению физиологических процессов, протекающих в клеточных структурах клубней [7]. При этом обнаруженное в нашем эксперименте уменьшение содержания МДА в хранящихся 6 месяцев клубнях, предобработанных бактериями, свидетельствует об ослаблении оксидативного стресса в клубнях и защищенности клеток от повреждающего действия АФК. Можно предположить, что защитный эффект *B. subtilis* связан с модуляцией активности антиоксидантных ферментов под их влиянием, вследствие чего они могут контролировать уровень АФК, приводящих к ПОЛ [22]. Как было показано, растения томата, инокулированные эндофитными бактериями *Sphingomonas* sp. LK11, характеризовались повышением активности каталазы, полифенолоксидазы, а также усилением синтеза глутатиона, что в совокупности способствовало снижению в этих растениях стресс-индуцированного уровня ПОЛ и накоплению МДА [23]. Таким образом, полученные нами результаты согласуются с имеющимися в литературе данными о снижении под влиянием ростстимулирующих бактерий окислительных повреждений растений.

Известно, что накопление пролина является широко распространенным ответом растений на стрессовые ситуации в окружающей среде. В нашем эксперименте уровень пролина в хранящихся клубнях возрос от начала хранения до периода 6-месячного хранения во всех вариантах опыта, однако меньшее его накопление зафиксировано при обработке штаммом 26Д в оба срока наблюдений. Вероятно, эти различия могут быть связаны с разной степенью колонизации тканей картофеля разными штаммами или с различиями в природных свойствах штаммов, которые, как было показано ранее, способны в разной степени вызывать лигнификацию клеточных стенок и продуцировать разные количества индолил-3-уксусной кислоты [24].

Косвенным подтверждением различий в физиологической активности штаммов является также дифференцированная способность вызывать ответную реакцию растений по активности ингибиторов трипсина (см. рис. 2, а) и протеиназной активности (см. рис 2, б). Ранее способность эндофитных бактерий модулировать уровень активности ингибиторов протеиназ была отмечена в работе [20]. Вероятно, более сильное влияние, оказанное штаммом 10-4 на физиологический статус клубней, обусловило и более выраженный эффект праймирования, который зафиксирован в нашем эксперименте по накоплению аскорбиновой кислоты именно в варианте предобработки штаммом 10-4. В нашем эксперименте содержание аскорбиновой кислоты в предобработанных эндофитными бактериями *B. subtilis* штамма 10-4 клубнях превышало величину этого показателя в контроле в 1,2 раза, что согласуется с данными других исследований [8, 25]. Вероятно, именно с эффективно сработавшей системной защитой в ответ на присутствие штамма 10-4 связано уменьшение содержания редуцирующих сахаров в клубнях при хранении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует в пользу того, что предпосадочная инокуляция клубней эндофитными бактериями *B. subtilis* штамма 10-4 посредством снижения уровня стресс-индуцированного увеличения ПОЛ, снижения концентрации пролина, более усиленного накопления аскорбиновой кислоты оказала защитный эффект на растения картофеля в период длительного хранения, обеспечивая замедление процессов старения с сохранением биологической ценности продукции. Защитный эффект клубней в период хранения связан со способностью бактерий *B. subtilis* проникать в растительные ткани картофеля, заселяя их эндофитно, сосуществовать в них и способствовать формированию длительной защиты от стрессовых факторов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Усков А.И., Кравченко Д.В., Ускова Л.Б., Галушка П.А., Замятин А.А., Скулачев М.В. Регуляция физиологического старения культуры картофеля // Земледелие. 2019. N 8. С. 33–37. DOI: 10.24411/0044-3913-2019-10808.
2. Ávila-Valdés A., Quinet M., Lutts S., Martínez J. P., Lizana X.C. Tuber yield and quality responses of potato to moderate temperature increase during Tuber bulking under two water availability scenarios // Field Crops Research. 2020. Vol. 251. P. 107786. DOI: 10.1016/j.fcr.2020.107786.

3. Белов Г.Л., Зейрук В.Н., Мальцев С.В., Абашкин О.В., Абросимов Д.В. Применение химических и биологических препаратов для защиты картофеля при хранении // Агрехимический вестник. 2020. N 6. С. 75–78. DOI: 10.24411/1029-2551-2020-10090. EDN: DRZOJK.
4. Draie R., Al-Absi M. Regulation and control of potato tuber dormancy and sprouting // International Journal of Recent Advances in Multidisciplinary Research. 2019. Vol. 6, no 1. P. 4573–4583.

5. Федотова Л.С., Тимошина Н.А., Князева Е.В. Динамика биохимических показателей картофеля в период хранения // Картофель и овощи. 2017. N 1. С. 31–34. EDN: XIROXT.
6. Elmore J.S., Briddon A., Dodson A.T., Muttucumaru N., Halford N.G., Mottram D.S. Acrylamide in potato crisps prepared from 20 UK-grown varieties: effects of variety and tuber storage time // Food Chemistry. 2015. Vol. 182. P. 1–8. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.02.103.
7. Усков А.И., Ускова Л.Б., Кравченко Д.В., Галушка П.А., Закабунина Е.Н. Регуляция процессов физиологического старения при длительном репродукции картофеля // Земледелие. 2018. N 5. С. 40–44. DOI: 10.24411/0044-3913-2018-10511.
8. Чеботарь В.К., Кипрушкина Е.И. Применение микробных препаратов в технологиях хранения картофеля // Достижения науки и техники АПК. 2015. Т. 29. N 1. С. 33–35. EDN: TMZFSZ
9. Новикова И.И., Титова Ю.А., Бойкова И.В., Зейрук В.Н., Краснобаева И.Л. Биологическая эффективность новых биопрепаратов на основе микробов-антагонистов для контроля возбудителей болезней картофеля при вегетации и хранении клубней // Биотехнология. 2017. Т. 33. N 6. С. 68–76. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-68-76. EDN: YMVEAK.
10. Lastochkina O., Aliniaiefard S., Seifkhalhor M., Yuldashev R., Pusenkova L., Garipova S. Plant growth-promoting bacteria: biotic strategy to cope with abiotic stresses in wheat // Wheat production in changing environments / eds M. Hasanuzzaman, K. Nahar, Md.A. Hossain. Singapore: Springer, 2019. P. 579–614. DOI: 10.1007/978-981-13-6883-7_23.
11. Максимов И.В., Пусенкова Л.И., Абизгильдина Р.Р. Влияние биопрепаратов на основе эндофитной бактерии *Bacillus subtilis* 26Д на поствегетационное сохранение защитного потенциала клубней картофеля против патогенов // Агрехимия. 2011. N 6. С. 43–48. EDN: NURDSX.
12. Lastochkina O., Pusenkova L., Garshina D., Yuldashev R., Shpirnaya I., Kasnak C., et al. The effect of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* and salicylic acid on some resistance and quality traits of stored *Solanum tuberosum* L. tubers infected with fusarium dry rot // Plants. 2020. Vol. 9, no. 6. P. 738. DOI: 10.3390/plants9060738.
13. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1968. Vol. 125, no. 1. P. 189–198. DOI: 10.1016/0003-9861(68)90654-1.
14. Bates L.S., Waldern R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant and Soil. 1973. Vol. 39. P. 205–207. DOI: 10.1007/BF00018060.
15. Гофман Ю.Я., Вайсблай И.М. Определение ингибитора трипсина в семенах гороха // Прикладная биохимия и микробиология. 1975. N 5. С. 777–783.
16. Erlanger B.F., Kokowski N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1961. Vol. 95, no 2. P. 271–278. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X.
17. Vasanthan T., Bergthaller W., Driedger D., Yeung J., Sporus P. Starch from Alberta potatoes: wet Isolation and some physicochemical properties // Food Research International. 1999. Vol. 32, no. 5. P. 355–365. DOI: 10.1016/S0963-9969(99)00096-4.
18. Щербачков А.В., Щербачкова Е.Н., Мулина С.А., Роц П.Ю., Дарью Р.Ф., Кипрушкина Е.И. [и др.]. Психрофильные псевдомонады-эндофиты как потенциальные агенты в биоконтроле фитопатогенных и гнилостных микроорганизмов при холодильном хранении картофеля // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. N 1. С. 116–128. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.1.116rus. EDN: YFQFFJ.
19. Garipova S.R., Markova O.V., Fedorova K.A., Dedova M. A., Kamaletdinova A. A., Lastochkina O. V., et al. Malondialdehyde and proline content in bean cultivars following the inoculation with endophytic bacteria // Acta Physiologiae Plantarum. 2022. Vol. 44. P. 89. DOI: 10.1007/s11738-022-03427-1.
20. Яруллина Л.Г., Ахатова А.Р., Касимова Р.И. Гидролитические ферменты и их белковые ингибиторы в регуляции взаимоотношений растений с патогенами // Физиология растений. 2016. Т. 63. N 2. С. 205–217. DOI: 10.7868/S0015330316020159. EDN: VINZCF.
21. Сорокань А.В., Бурханова Г.Ф., Алексеев В.Ю., Гордеев А.А., Марданшин И.С., Максимов И.В. Совместное влияние *Bacillus thuringiensis* В-5351 и салициловой кислоты на устойчивость растений картофеля к *Phytophthora infestans* и урожайность в полевых условиях // Biomics. 2023. Т. 15. N 1. С. 1–6. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-1. EDN: NSIMDV.
22. Yarullina L.G., Veselova S.V., Ibragimov R.I., Shpirnaya I.A., Kasimova R.I., Akhatova A.R., et al. Tsvetkov V., Maksimov I. Search for molecular markers of wheat resistance to fungal pathogens // Agricultural Sciences. 2014. Vol. 5. P. 722–729. DOI: 10.4236/as.2014.58076.
23. Hao Y., Wu H., Liu Y., Hu Q. Mitigative effect of *Bacillus subtilis* QM3 on root morphology and resistance enzyme activity of wheat root under lead stress // Advances in Microbiology. 2015. Vol. 5, no. 6. P. 469–478. DOI: 10.4236/aim.2015.56048.
24. Lastochkina O., Aliniaiefard S., Garshina D., Garipova S., Pusenkova L., Allagulova Ch., et al. Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* strain-specifically improves growth of *Phaseolus vulgaris* plants under normal and salinity conditions and exerts anti-stress effect through induced lignin deposition in roots and decreased oxidative and osmotic damage // Journal of Plant Physiology. 2021. Vol. 263. P. 153462. DOI: 10.1016/j.jplph.2021.153462.
25. Lastochkina O., Pusenkova L., Garshina D., Kasnak C., Palamutoglu R., Shpirnaya I., et al. Improving the biocontrol potential of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* with salicylic acid against *Phytophthora infestans*-caused postharvest potato tuber late blight and impact on stored tubers quality // Horticulturae. 2022. Vol. 8, no. 2. P. 117. DOI: 10.3390/horticulturae8020117.

REFERENCES

1. Uskov A.I., Kravchenko D.V., Uskova L.B., Galushka P.A., Zamyatnin A.A., Skulachev M.V. Regulation of physiological aging of potato culture. *Zemledelie*. 2019;8:33-37. (In Russian). DOI: 10.24411/0044-3913-2019-10808.
2. Ávila-Valdés A., Quinet M., Lutts S., Martínez J. P., Lizana X.C. Tuber yield and quality responses of potato to

- moderate temperature increase during Tuber bulking under two water availability scenarios. *Field Crops Research*. 2020;251:107786. DOI: 10.1016/j.fcr.2020.107786.
- 3.** Belov G.L., Zeyruk V.N., Maltsev S.V., Abashkin O.V., Abrosimov D.V. Protection of potato during storage with chemical and biological preparations. *Agrokhimicheskiy vestnik = Agrochemical Herald*. 2020;6:75-78. (In Russian). DOI: 10.24411/1029-2551-2020-10090. EDN: DRZOJK.
- 4.** Draie R., Al-Absi M. Regulation and control of potato tuber dormancy and sprouting. *International Journal of Recent Advances in Multidisciplinary Research*. 2019;6(1):4573-4583.
- 5.** Fedotova L.S., Timoshina N.A., Knyazeva E.V. Dynamics of potato biochemical indicators during storage. *Kartofel' i ovoshchi = Potato and Vegetables*. 2017;1:31-34. (In Russian). EDN: XIROXT.
- 6.** Elmore J.S., Briddon A., Dodson A.T., Muttucumar N., Halford N.G., Mottram D.S. Acrylamide in potato crisps prepared from 20 UK-grown varieties: effects of variety and tuber storage time. *Food Chemistry*. 2015;182:1-8. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.02.103.
- 7.** Uskov A.I., Uskova L.B., Kravchenko D.V., Galushka P.A., Zakabunina E.N. Regulation of Physiological Aging Processes during Long-Term Potato Reproduction. *Zemledelie*. 2018;5:40-44. (In Russian). DOI: 10.24411/0044-3913-2018-10511.
- 8.** Chebotar V.K., Kiprushkina E.I. Application of microbial preparations in potato storage technologies. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2015;29(1):33-35. (In Russian). EDN: TMZFSZ.
- 9.** Novikova I.I., Titova Yu.A., Boikova I.V., Zeiruk V.N., Krasnobayeva I.L. Biological efficiency of new biopreparations based on antagonistic microbes in control of potato pathogens during plant vegetation and tuber storage. *Biotehnologiya*. 2017;33(6):68-76. (In Russian). DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-68-76. EDN: YMVEAK.
- 10.** Lastochkina O., Aliniaiefard S., Seifikalhor M., Yuldashev R., Pusenkova L., Garipova S. Plant growth-promoting bacteria: biotic strategy to cope with abiotic stresses in wheat. In: Hasanuzzaman M., Nahar K., Hossain Md.A. (eds). *Wheat production in changing environments*. Singapore: Springer; 2019, p. 579-614. DOI: 10.1007/978-981-13-6883-7_23.
- 11.** Maksimov I.V., Pusenkova L.I., Abizgildina R.R. Biopreparation with endophytic bacterium *Bacillus subtilis* 26D created postharvest protecting effect in potato tubers. *Agrokhimiya*. 2011;6:43-48. (In Russian). EDN: NURDSX.
- 12.** Lastochkina O., Pusenkova L., Garshina D., Yuldashev R., Shpirnaya I., Kasnak C., et al. The effect of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* and salicylic acid on some resistance and quality traits of stored *Solanum tuberosum* L. tubers infected with fusarium dry rot. *Plants*. 2020;9(6):738. DOI: 10.3390/plants9060738.
- 13.** Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1968;125(1):189-198. DOI: 10.1016/0003-9861(68)90654-1.
- 14.** Bates L.S., Waldern R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 1973;39:205-207. DOI: 10.1007/BF00018060.
- 15.** Gofman Yu.Ya., Vaisblai I.M. Determination of trypsin inhibitor in pea seeds. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 1975;5:777-783. (In Russian).
- 16.** Erlanger B.F., Kokowski N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1961;95(2):271-278. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X.
- 17.** Vasanthan T., Bergthaller W., Driedger D., Yeung J., Sporus P. Starch from Alberta potatoes: wet Isolation and some physicochemical properties. *Food Research International*. 1999;32(5):355-365. DOI: 10.1016/S0963-9969(99)00096-4.
- 18.** Shcherbakov A.V., Shcherbakova E.N., Mulina S.A., Rots P.Yu., Daryu R.F., Kiprushkina E.I., et al. Psychrophilic endophytic pseudomonas as potential agents in biocontrol of phytopathogenic and putrefactive microorganisms during potato storage. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya = Agricultural Biology*. 2017;52(1):116-128. (In Russian). DOI: 10.15389/agrobiol.2017.1.116rus. EDN: YFQFFJ.
- 19.** Garipova S.R., Markova O.V., Fedorova K.A., Dedova M. A., Kamaletdinova A. A., Lastochkina O. V., et al. Malondialdehyde and proline content in bean cultivars following the inoculation with endophytic bacteria. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2022;44:89. DOI: 10.1007/s11738-022-03427-1.
- 20.** Yarullina L.G., Akhatova A.R., Kasimova R.I. Hydrolytic enzymes and their proteinaceous inhibitors in regulation of plant-pathogen interactions. *Fiziologiya rastenii*. 2016;63:2:205-217. (In Russian). DOI: 10.7868/S0015330316020159. EDN: VINZCF.
- 21.** Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Alekseev V. Yu., Gordeev A.A., Mardanshin I.S., Maksimov I.V. Simultaneous effect of *Bacillus thuringiensis* B-5351 and salicylic acid on the resistance of potato plants to *Phytophthora infestans* and yield in the field. *Biomics*. 2023;15(1):1-6. (In Russian). DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-1. EDN: NSIMDV.
- 22.** Yarullina L.G., Veselova S.V., Ibragimov R.I., Shpirnaya I.A., Kasimova R.I., Akhatova A.R., et al. Tsvetkov V., Maksimov I. Search for molecular markers of wheat resistance to fungal pathogens. *Agricultural Sciences*. 2014;5:722-729. DOI: 10.4236/as.2014.58076.
- 23.** Hao Y., Wu H., Liu Y., Hu Q. Mitigative effect of *Bacillus subtilis* QM3 on root morphology and resistance enzyme activity of wheat root under lead stress. *Advances in Microbiology*. 2015;5(6):469-478. DOI: 10.4236/aim.2015.56048.
- 24.** Lastochkina O., Aliniaiefard S., Garshina D., Garipova S., Pusenkova L., Allagulova Ch., et al. Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* strain-specifically improves growth of *Phaseolus vulgaris* plants under normal and salinity conditions and exerts anti-stress effect through induced lignin deposition in roots and decreased oxidative and osmotic damage. *Journal of Plant Physiology*. 2021;263:153462. DOI: 10.1016/j.jplph.2021.153462.
- 25.** Lastochkina O., Pusenkova L., Garshina D., Kasnak C., Palamutoglu R., Shpirnaya I., et al. Improving the biocontrol potential of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* with salicylic acid against *Phytophthora infestans*-caused postharvest potato tuber late blight and impact on stored tubers quality. *Horticulturae*. 2022;8(2):117. DOI: 10.3390/horticulturae8020117.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Пусенкова Людмила Ивановна,
к.с.-х.н., доцент, ведущий научный сотрудник,
Башкирский научно-исследовательский
институт сельского хозяйства – обособленное
структурное подразделение Уфимского
федерального исследовательского центра РАН,
450059, г. Уфа, ул. Рихарда Зорге, 19,
Российская Федерация,
✉ L.Pusenkova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6341-0486>

Гарипова Светлана Равилевна,
д.б.н., доцент,
ведущий научный сотрудник,
Башкирский научно-исследовательский
институт сельского хозяйства – обособленное
структурное подразделение Уфимского
федерального исследовательского центра РАН,
450059, г. Уфа, ул. Рихарда Зорге, 19,
Российская Федерация,
профессор,
Уфимский университет науки и технологий,
450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32,
Российская Федерация,
garipovasvetlana@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0276-6689>

Ласточкина Оксана Владимировна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Институт биохимии и генетики – обособленное
структурное подразделение Уфимского
федерального исследовательского центра РАН,
450054, г. Уфа, пр. Октября, 71,
Российская Федерация,
oksanaibg@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-3398-1493>

Шпирная Ирина Андреевна,
к.б.н., доцент,
Уфимский университет науки и технологий,
450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32,
Российская Федерация,
i-shia@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6348-8467>

Валиева Валерия Азаматовна,
исполняющий обязанности
младшего научного сотрудника,
Башкирский научно-исследовательский
институт сельского хозяйства – обособленное
структурное подразделение Уфимского
федерального исследовательского центра РАН,
450059, г. Уфа, ул. Рихарда Зорге, 19,
Российская Федерация,
valiyeva.valeriya.01@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0004-7968-9054>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ludmila I. Pusenkova,
Cand. Sci. (Agriculture), Associate Professor,
Leading Researcher,
Bashkir Research Institute of Agriculture
of Ufa Federal Research Centre RAS,
9, Rikhard Zorge St., Ufa, 450059,
Russian Federation,
✉ L.Pusenkova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6341-0486>

Svetlana R. Garipova,
Dr. Sci. (Biology), Associate Professor,
Leading Researcher,
Bashkir Research Institute of Agriculture
of Ufa Federal Research Centre RAS,
9, Rikhard Zorge St., Ufa, 450059,
Russian Federation,
Professor,
Ufa University of Science and Technology,
32 Zaki Validi St., Ufa, 450076,
Russian Federation,
garipovasvetlana@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0276-6689>

Oksana V. Lastochkina,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Institute of Biochemistry and Genetics
of Ufa Federal Research Centre RAS,
71, Oktyabrya Ave., Ufa, 450054,
Russian Federation,
oksanaibg@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-3398-1493>

Irina A. Shpirnaya,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Ufa University of Science and Technology,
32 Zaki Validi St., Ufa, 450076,
Russian Federation,
i-shia@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6348-8467>

Valeria A. Valieva,
Acting Junior Researcher,
Bashkir Research Institute of Agriculture
of Ufa Federal Research Centre RAS,
9, Rikhard Zorge St., Ufa, 450059,
Russian Federation,
valiyeva.valeriya.01@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0004-7968-9054>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 09.08.2023.
Одобрена после рецензирования 19.10.2023.
Принята к публикации 31.10.2023.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 09.08.2023.
Approved after reviewing 19.10.2023.
Accepted for publication 31.10.2023.

Научная статья

УДК 574.24

EDN: POQFWF

DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-579-588



Влияние водного дефицита на накопление дегидринов в клетках каллусной культуры сосны обыкновенной

Н.Е. Коротаева✉, В.Н. Шмаков, С.Э. Молдавская

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Российская Федерация

Аннотация. Внутривидовые различия в уровне стрессоустойчивости у древесных растений остаются малоисследованными, хотя данный признак важен для селекции деревьев. Дегидрины являются белками внутриклеточной защиты, предохраняющими другие белки, а также мембраны от повреждений, вызванных внутриклеточным обезвоживанием при действии водного дефицита. Целью настоящей работы было изучение возможности выявления дегидринов, связанных с ответом на водный дефицит, а также межindividуальных различий в накоплении дегидринов у сосны обыкновенной в условиях *in vitro*. В работе использовали каллусную культуру, полученную из тканей ветвей и почек двух деревьев сосны обыкновенной (д3 и д4), для которых были обнаружены количественные и качественные различия в составе дегидринов. Межиндивидуальные различия у каллусных культур выражались в варьировании частоты событий каллусообразования и индекса нарастания каллусной культуры. Влияние водного дефицита на каллусную культуру при добавлении в среду культивирования 5 или 8% полиэтиленгликоля выражалось в дозозависимом снижении в клетках каллусов содержания воды, накоплении стрессового белка Hsp70 и дегидринов с массами 47, 42, 27 кД. Состав и уровень накопления дегидринов различался для каллусов, полученных из д3 и д4, что позволяет предположить различный уровень устойчивости к действию водного дефицита у клеток данных каллусных культур. Существование таких различий может стать основой для выявления дегидринов сосны обыкновенной, связанных с защитой от водного дефицита.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris* L., дегидрины, каллусная культура, водный дефицит

Благодарности. Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования научным оборудованием «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск, Российская Федерация).

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-10035 (<https://rscf.ru/project/23-24-10035/>).

Для цитирования: Коротаева Н.Е., Шмаков В.Н., Молдавская С.Э. Влияние водного дефицита на накопление дегидринов в клетках каллусной культуры сосны обыкновенной // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 579–588. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-579-588. EDN: POQFWF.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Effect of water stress on the accumulation of dehydrins in callus culture cells from *Pinus sylvestris* L.

Natalia E. Korotaeva✉, Vladimir N. Shmakov, Sofia E. Moldavskaya

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. Intraspecific differences in the level of stress tolerance in woody plants remain understudied, even though this characteristic is important for tree breeding. Dehydrins are intracellular defense proteins that protect other proteins, as well as membranes, from damage caused by intracellular dehydration under water stress. The present paper aims to examine the possibility of detecting dehydrins produced in response to water stress, as well as interindividual differences in dehydrin accumulation in *Pinus sylvestris* L. (Scots pine) under *in vitro* conditions. In this work, callus culture derived from the branch and bud tissues of two Scots pine trees (T3 and T4) was used; for

these trees, quantitative and qualitative differences in the composition of dehydrins were found. Interindividual differences in callus cultures were expressed as variations in the frequency of callus formation events and callus culture growth index. With the addition of 5 or 8% polyethylene glycol to the culture medium, the effect of water stress on the callus culture was expressed in a dose-dependent decrease of water content in callus cells, as well as the accumulation of shock protein Hsp70 and dehydrins having masses of 47, 42, and 27 kDa. The composition of dehydrins and the level of their accumulation differed between calluses derived from T3 and T4, suggesting different levels of water stress tolerance in the cells of these callus cultures. The existence of such differences may provide a basis for detecting dehydrins in Scots pine produced in response to water stress.

Keywords: *Pinus sylvestris* L., dehydrins, callus culture, water stress

Acknowledgements. The work was carried out on the equipment of the Center for Collective use of scientific equipment "Bioanalitika", Siberian Institute of Physiology and Biochemistry SB RAS (Irkutsk, Russian Federation).

Funding. The study was carried out at the expense of a grant of the Russian Science Foundation no. 23-24-10035 (<https://rscf.ru/project/23-24-10035/>).

For citation: Korotaeva N.E., Shmakov V.N., Moldavskaya S.E. Effect of water stress on the accumulation of dehydrins in callus culture cells from *Pinus sylvestris* L. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):579-588. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-579-588. EDN: POQFWF.

ВВЕДЕНИЕ

Лесовосстановление является актуальной задачей для Сибирского региона, т.к. леса данных территорий регулярно подвергаются воздействию пожаров и вырубок¹. В то же время одним из препятствий к высокоэффективному восстановлению лесного покрова оказывается низкая устойчивость древесной рассады к неблагоприятным климатическим воздействиям [1, 2]. Весна в зоне Восточной Сибири характеризуется сезонными засухами [3]. Усиление засушливости климата способствует микробной инвазии и неблагоприятно действует на выживаемость хвойных пород в Прибайкалье [4, 5]. В сочетании с высокой интенсивностью освещенности засушливость климата, особенно в весенний период, весной делает погодные условия в Восточной Сибири близкими к экстремальным.

Накопление белков-дегидринов (ДГ) приводит к появлению у растений устойчивости к холоду и водному дефициту (ВД) [6]. Действие этих белков заключается в удержании внутри клеток молекул воды и в имитации вокруг полярных остатков молекул белков и мембранных липидов гидратной оболочки, потеря которой приводит к неспецифическим взаимодействиям и утрате белками и липидами их физиологических свойств [7, 8]. Еще одно важное назначение ДГ состоит в их способности связывать в клетках растений активные формы кислорода, повышенное содержание которых приводит к окислению биомолекул [9, 10]. Характерной структурной особенностью всех ДГ является наличие специфической полярной высококонсервативной С-концевой К-последовательности, богатой остатками лизина, которая определяет значительную термостойчивость и растворимость этих белков и их основные функции внутри клетки [11, 12]. Было показано, что накопление ДГ приводит к появлению у растений холодо-, морозо- и засухоустойчивости, что позволяет рассматривать эти белки как факторы и маркеры холодо- и засухоустойчивости [7, 8].

Известно, что рост экспрессии генов отдельных ДГ происходит в ответ на действие ВД, холода, света, причем одно и то же воздействие может приводить к накоплению как специфических только для этого воздействия ДГ, так и ДГ, регулирующихся несколькими факторами [13, 14]. В естественных условиях невозможно отделить влияние холода, освещенности или ВД, что делает невозможным определение специфичности накопления тех или иных ДГ в ответ на определенный фактор среды.

К настоящему моменту накоплено мало информации о внутривидовой вариабельности способности накапливать ДГ хвойными. Известно, что экспрессия генов этих белков существенно варьирует для различных популяций у *Pinus sylvestris* и *Pinus pinaster* [6, 15]. При этом высокие активность и разнообразие экспрессирующихся генов отмечаются для деревьев, произрастающих в более суровых условиях по признаку эффектора такой экспрессии [6]. Ранее были показаны межиндивидуальные различия в накоплении ДГ в хвое сосны обыкновенной [16] и в однолетних побегах лиственницы Каяндера [17] в период зимнего покоя у деревьев, произрастающих в Якутии. Выявление среди долгоживущих растений отдельных образцов с повышенным накоплением ДГ, которые являются маркерами устойчивости к разнообразным неблагоприятным факторам, может иметь важное хозяйственное значение с точки зрения селекции этих растений и их использования для лесовосстановления в зонах с неблагоприятными климатическими условиями.

Использование в дополнение к традиционно применяемым методам культуры клеток, органов и тканей *in vitro* открывает перспективы для детального изучения действия какого-либо конкретного фактора на растительную клетку и ее реакции на это воздействие в строго контролируемых условиях при максимальном устранении влияния других сопутствующих факторов. Дополнительно применение этих методов позволяет разделить устойчивость и адаптацию растений на уровне

¹Государственный доклад о состоянии и об охране окружающей среды в Иркутской области в 2021 году. Ижевск: ООО «Принт», 2022. 252 с.

организма и клеточный уровень устойчивости, на основе клеточной селекции отобрать устойчивые к токсиканту клоны или линии, а далее и целые растения.

Целью данного исследования стало изучение возможности использования каллусной культуры сосны обыкновенной для выявления ДГ, накопление которых вызывается действием ВД, а также для поиска межиндивидуальных различий в накоплении ДГ в ответ на ВД. Для достижения поставленной цели были использованы каллусные культуры, полученные из побегов ветвей и почек взрослых деревьев сосны обыкновенной.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для характеристики условий среды в период сбора проб использовали информацию из доклада Всероссийского научно-исследовательского института гидрометеорологической информации – Мирового центра данных «Климатические условия на территории России. Погода на территории Российской Федерации в 2022 году»².

В работе использовали два дерева (д3 и д4) сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), произрастающие на экспериментальном участке Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН. Данный участок был заложен из однолетних саженцев в 1985 г. на окраине г. Иркутска. Почва на участке серая лесная неоподзоленная суглинистая. Грунтовые воды залегают на значительной глубине (11–50 м) и не оказывают заметного влияния на режим влажности почв. Возраст деревьев в период проведения исследования – 37–38 лет.

Сбор побегов ветвей и почек для анализа содержания ДГ был произведен в марте 2023 г. Для этого образцы измельчали, замораживали в жидком азоте и хранили в криостате при минус 70 °С. Для получения каждого измельченного образца использовали не менее трех побегов с каждого дерева и не менее 10 почек с разных побегов.

Для получения каллусов образцы собирали в сентябре – октябре 2022 г. В качестве растительного материала для получения каллусов сосны обыкновенной брали верхушки ветвей из нижней трети кроны (примерно 3–4 см) с хвоей и почками. Перед стерилизацией хвою удаляли и стерилизовали почки с участками несущих побегов с использованием последовательно 3%-го раствора перекиси водорода (30 мин), 0,1%-го раствора хлорида ртути (10 мин) и двукратной отмычки по 30 мин в 3%-м растворе перекиси водорода.

Для получения эксплантов стерильные почки с участками несущих побегов переносили на стерильные фильтры (в чашках Петри). Из средних частей почек и несущих побегов вырезали поперечные диски толщиной 2–3 мм и помещали срезом горизонтально на питательную среду Мурасиге – Скуга, содержащую половинный состав макро- и микросолей с добавлением 0,8 мг/л тиамин, 0,4 мг/л пиридоксин, 0,4 мг/л никотиновой кислоты, 100 мг/л инозитола, 200 мг/л гидролизата казеина и 20 г/л сахарозы; в качестве регуляторов роста использовали 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2 мг/л) и 6-бензиламинопурин (0,5 мг/л). Экспланты и

полученные из них каллусы культивировали в темноте при постоянной температуре 25 °С. Продолжительность одного цикла культивирования полученного каллуса составляла 28 суток. Для создания действия ВД каллусы на 10 суток пересаживали на среду культивирования, содержащую 5 или 8% полиэтиленгликоля (ПЭГ), контрольные образцы на это же время пересаживали на среду без добавления ПЭГ.

Каллусогенез анализировали по трем признакам: 1) скорость инициации каллусной ткани – время образования первых следов каллуса на экспланте (сут.); 2) частота случаев каллусообразования – число эксплантов, сформировавших каллус, относительно общего количества эксплантов (%) (определяли на 2-е, 3-е, 5-е, 10-е, 15-е и 20-е сутки культивирования); 3) интенсивность каллусогенеза – оценивали по индексу нарастания, где 1 балл – объем каллусной ткани меньше объема экспланта, 2 балла – объем каллусной ткани примерно равен объему экспланта, 3 балла – объем каллусной ткани больше объема экспланта (оценку по данному параметру вели в завершающей фазе каллусогенеза (на 20-е сутки) в процентах относительно общего количества эксплантов) [18].

Определение содержания общей воды в каллусах проводили по изменению веса каллусов. Прирост каллусов вычисляли как разницу в сыром весе каллуса перед переносом на питательную среду, содержащую ПЭГ 2000 (LOBA Chemie Fischamend, Австрия) (или среду без ПЭГ для контрольных образцов), и того же каллуса через 10 суток культивирования, выраженную в процентах от первоначального веса.

Для выделения общего белка использовали образцы каллуса либо пробы измельченного материала побега или почек весом 0,5 г, зафиксированные в жидком азоте и хранившиеся в криостате при минус 70 °С. Пробу растирали в жидком азоте с кварцевым песком в 2,5 мл буфера, содержащего 100 мМ трис–HCl (pH 7,4–7,6), 0,1% додецилсульфата натрия (ДДС–Na), 12 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ фенолметилсульфонилфлюорида и нерастворимый поливинилпирролидон (10% от веса пробы). После центрифугирования (18000 g, 10 мин) белок из полученного супернатанта осаждали пятикратным объемом охлажденного до минус 20 °С ацетона (8500 g, 10 мин). Осадок общего клеточного белка растворяли в буфере для образца, содержащем 0,125 М трис–HCl (pH 6,8), 10% ДДС–Na, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту, 20%-й глицерин, с последующим нагреванием при 97 °С в течение 3 мин на водяной бане и центрифугированием при 12000 g в течение 10 мин. Концентрацию белка в получившихся пробах определяли с помощью флуориметра Qubit™ (Invitrogen, США) согласно инструкции с использованием набора реактивов (Quant-iT Protein Assay kits, Invitrogen, США).

Для определения содержания стрессового белка Hsp70 и ДГ 30 мкг белка из каждой пробы разделяли электрофоретически в полиакриламидном геле в присутствии ДДС–Na и переносили на нитроцеллюлозную

²Аржанова Н.М., Давлетшин С.Г., Дементьева Т.В., Клещенко Л.К., Коршунова Н.Н., Швец Н.В. Погода на территории Российской Федерации в 2022 году // Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды. Режим доступа: <http://meteo.ru/climate/93-klimaticheskie-usloviya/179-klimaticheskie-usloviya-na-territorii-rossii> (дата обращения: 16.06.2023).

мембрану в системе mini-Protean III (BioRad, США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Белки детектировали с помощью антител. Использовали первичные моноклональные антитела против общего Hsp70 (Hsp70/Hsc70; SPA-820, StressGen Bioreagents, Канада; разведение 1:1000) и поликлональные антитела против ДГ (AS07 206, Agrisera, Швеция; разведение 1:500). Антитела визуализировали с помощью вторичных антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой (Sigma, США), с использованием субстрата BCIP/NBT (Gerbu, Германия). Молекулярную массу (*Mr*) выявленных ДГ определяли с использованием белковых маркеров PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific, США) с помощью программного обеспечения Image Laboratory (версия 5.2) (Bio Rad, США).

Интенсивность окрашивания белкового пятна на мембране определяли денситометрически после сканирования в цифровом формате с помощью сканера Gel Doc™ XR+ (Bio Rad, США) и программного обеспечения Image Laboratory (версия 5.2) (Bio Rad, США). Окрашивание измерялось как количество окрашенных пикселей на изображении. Интенсивность окрашивания белка на нитроцеллюлозной мембране пропорциональна количеству специфических антител, связавшихся с мембраной после инкубации, и количеству исследуемого белка в образце, фракционированном методом электрофореза. Интенсивность окрашивания в каждом экспериментальном образце выражали в условных единицах относительно окрашивания в контрольном образце, принятом за 1.

Измерения проводили не менее чем в трех повторностях, вычисляли среднее арифметическое и стандартное отклонение.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Условия среды, предшествующие сбору растительного материала – побегов ветвей и почек взрослых деревьев сосны обыкновенной, в том числе и для получения каллусной культуры, можно охарактеризовать как аномально теплые. В период зимы 2021–2022 и весны 2022 г. превышение среднемесячных температур составляло 2–4° С; в декабре 2022 г. – 2° С. Повышенными были уровень осадков (февраль 2022 г. – 120–160% от нормы; август 2022 г. – 120–200% от нормы) и продолжительность солнечного сияния (112 и 109% в январе – феврале и 105% в мае – июне 2022 г.)². Продолжительность солнечного сияния была аномально низкой в августе 2022 г. (86%, значение вошло в список пяти минимальных по России), а температура воздуха – в октябре. Декабрь 2022 г. в общем соответствовал норме по температуре и осадкам, хотя в первой декаде было аномально тепло (как отмечалось ранее, превышение среднемесячных температур составляло 2° С). Описание условий произрастания позволяет сделать вывод о том, что деревья перед отбором образцов для получения каллусов не подвергались экстремальному воздействию дефицита влаги.

В образцах побегов ветвей и почек д3 и д4 были выявлены ДГ с *Mr* 150, 140, 70, 23, 21, 19, 17 и 14 кД (рис. 1, а). В побегах было обнаружено большее разнообразие среднемолекулярных ДГ (*Mr* 23–17 кД), тогда как высокомолекулярные ДГ с *Mr* 150 и 140 кД были выявлены только в образцах белка из почек. Причем

только у д4 был обнаружен ДГ с *Mr* 140 кД, что указывает на существование межиндивидуальных различий в способности накапливать ДГ у д3 и д4. В образцах побегов и почек д3 и д4 был обнаружен низкомолекулярный ДГ с *Mr* 14 кД. Известно, что накопление этого белка в хвое сопряжено с воздействием отрицательной температуры [16, 19]. Появление морозоустойчивости связано с повышением содержания *Mr* ДГ до 14 кД [20]. Перечисленные ДГ ранее были обнаружены в хвое сосны обыкновенной, произрастающей на территории Иркутской области, накопление этих белков происходило в холодное время года [21, 22]. Таким образом, на основе полученных результатов можно сделать предположение о связи этих ДГ с холодным воздействием. Накопление большего количества ДГ с *Mr* 70 и 14 кД в образце из побегов и белка с *Mr* 140 кД в образце из почек у д4 (рис. 1, б) может говорить в пользу большей устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды клеток почек и побегов этого дерева.

На первом этапе исследования каллусов проводилась оценка параметров каллусогенеза в зависимости от генотипа исходных деревьев. На эксплантах почек как д3, так и д4 первые следы каллуса стали появляться уже на 2-е сутки, а на эксплантах побегов – на 5-е сутки культивирования. Результаты изучения частоты случаев каллусообразования на эксплантах представлены в табл. 1. Данный показатель различался как между генотипами, так и между эксплантами различного происхождения внутри каждого из исследуемых генотипов. Частота случаев каллусообразования к концу фазы каллусогенеза (20-е сутки, далее каллус больше не образовывался) для эксплантов почек д3 составляла 99,2%. В случае д4 все экспланты, полученные из почек, формировали каллус. При этом каллус на эксплантах побегов д3 к 20-му дню образовался в 96,3% случаев, а для д4 этот показатель составил 75%. Частота событий каллусообразования для эксплантов различного происхождения и генотипов в значительной мере варьировала и по конкретным промежуточным датам оценки этого показателя – на 2-е, 3-е, 5-е, 10-е, 15-е сутки культивирования (см. табл. 1).

Индекс нарастания каллусной культуры на эксплантах представлен в табл. 2. Установлено, что интенсивность роста каллуса, определяемая по степени обрастания каллусом первичных эксплантов к концу фазы каллусогенеза, была выше на растительном материале, полученном из почек. Это характерно для обоих исследуемых деревьев. Первичный каллус значительно превышал размеры экспланта, на котором он формировался, в 61,3% случаев для эксплантов почек д3 и в 58,7% случаев для эксплантов почек д4. Для эксплантов побегов д3 характерно относительно равное распределение количества эксплантов с низкой, средней и высокой скоростью нарастания каллуса согласно оценке индекса нарастания по баллам. При этом преобладали каллусы с высоким индексом нарастания (38,7%). Для эксплантов побегов д4, наоборот, количество каллусов с высокой степенью обрастания экспланта было наименьшим (13,6%). Наибольшее количество каллусов имело среднюю степень обрастания, соответствующую 2 баллам (36,7%), что говорит о более низкой скорости роста каллуса на эксплантах побегов д4 к концу фазы каллусогенеза по сравнению с аналогичным материалом, полученным

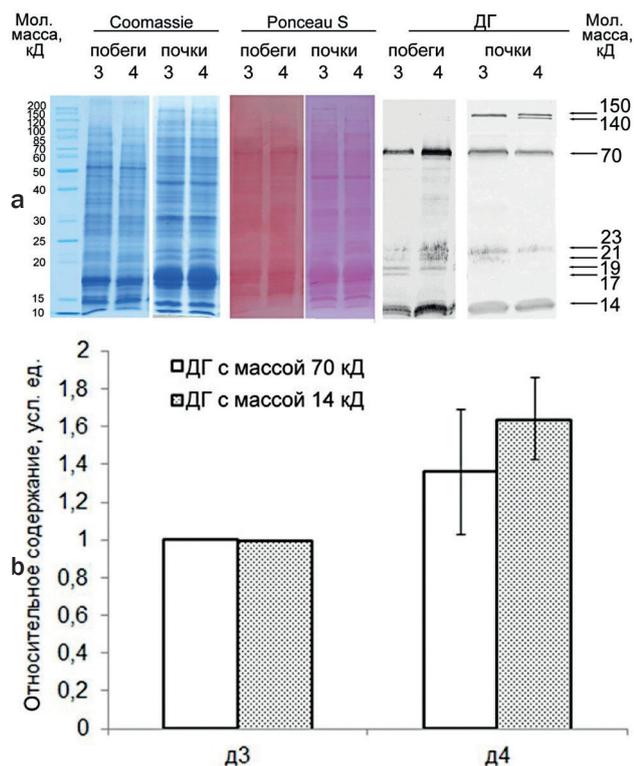


Рис. 1. Дегидрины побегов и почек сосны обыкновенной (3 – д3; 4 – д4): а – Coomassie – окраска полиакриламидного геля после электрофореза, Ponceau S – окраска нитроцеллюлозной мембраны после Western Blot, ДГ – окраска нитроцеллюлозной мембраны после инкубирования с антителами против дегидринов (использованные антитела специфически связываются со специфической К-последовательностью, обнаруженной у всех дегидринов, исследованных к настоящему времени; слева представлены молекулярные массы маркерных белков, справа – молекулярные массы дегидринов); б – денситометрическая оценка содержания дегидринов с массой 70 и 14 кД в побегах д3 и д4 (представленная величина выражает интенсивность окрашивания белка, выраженную в условных единицах относительно интенсивности окрашивания д3, принятого за 1; ошибка представляет стандартное отклонение)

Fig. 1. Shoots and buds dehydrins of scots pine (3 – tree 3, T3; 4 – tree 4, T4): а – Coomassie – polyacrylamide gel staining after electrophoresis, Ponceau S – nitrocellulose membrane staining after Western Blot, ДГ – nitrocellulose membrane staining after incubation with antibodies against dehydrins (on the right are the molecular weights of dehydrins); б – densitometric assessment of the content of dehydrins 70 and 14 kDa in T3 and T4 shoots (the presented value expresses the intensity of protein staining, expressed in conventional units relative to the intensity of T3 staining, taken as 1)

от д3. Исследование особенностей роста и развития калусных культур позволяет заключить, что по этому признаку между образцами д3 и д4 существуют различия.

Для выявления реакции клеток калусов на ВД полученные из побегов и почек д3 и д4 калусы были подвергнуты действию 5 и 8% ПЭГ в течение 10 суток. При этом в клетках калусов всех образцов было зафиксировано небольшое дозозависимое снижение содержания общей воды, которое не превышало 5% (рис. 2, б). Это свидетельствует в пользу создания в эксперименте условий ВД. Однако из литературных данных известно, что внесение в питательную среду для роста культур ПЭГ в дозе 5 и 8% нельзя считать воздействием, которое может вызывать в клетках сильный защитный физиологический ответ [23]. Этот факт может объяснять отсутствие достоверного подавления прироста калусной ткани в нашем эксперименте (рис. 2, б). Свидетельством неблагоприятного воздействия на клетки каллуса считается потемнение калусной ткани и расширение площади темных участков, которое происходит в результате происходящих в клетках культуры окислительных процессов [18]. Таких изменений по мере повышения концентрации ПЭГ мы не наблюдали (рис. 2, а). При этом накопление стрессового белка Hsp70 в клетках всех исследованных калусов при действии 5% ПЭГ (рис. 3, 4) говорит о небольшом влиянии ВД, которое можно назвать в большей мере адаптирующим, но не повреждающим. Отсутствие роста содержания Hsp70 после экспозиции на среде с 8% ПЭГ по сравнению с контролем во всех образцах, кроме побегов д4, может говорить в пользу актуализации других защитных механизмов помимо Hsp70 при воздействии 8% ПЭГ по сравнению с 5% ПЭГ. К таким механизмам, действующим при снижении содержания воды в клетках растений, согласно данным литературы, можно отнести накопление осмолитов и усиление активности антиоксидантной системы [24].

В образцах белка из калусов д3 и д4 были обнаружены ДГ с Mr 76, 71, 46, 42 и 27 кД (см. рис. 3), из которых ДГ с Mr 71 кД по молекулярной массе близок к ДГ с Mr 70 кД, выявленному в образцах побегов и почек, вероятно, это один и тот же белок. ДГ с Mr 76 кД ранее был описан для хвои сосны обыкновенной [22]. Остальные ДГ обнаружены только в клетках калусов. Появление этих белков в клетках калусов не только при обработке ПЭГ, но и в контрольных образцах, возможно, объясняется потенциально стрессовыми условиями, в которых находятся клетки калусной культуры при выращивании в условиях *in vitro*, а также тем, что накопление ДГ контролируется на уровне организма и наблюдать рост их содержания можно при снятии такого контроля.

В клетках калусов при действии ПЭГ происходит рост содержания ДГ с Mr 27 кД (д3, д4 побеги; д3 почки), 42 кД (д4 побеги, почки; д3 почки), 47 кД (д3 побеги,

Таблица 1. Скорость инициации калусной ткани и частота случаев калусообразования

Table 1. Initiation rate of callus tissue and cases frequency of callus formation

Вариант	Материал	Калусогенез по дням культивирования, %					
		2-й день	3-й день	5-й день	10-й день	15-й день	20-й день
д3	Почки	10,4	20,8	68,8	88,0	88,0	99,2
	Побеги	0,0	0,0	4,4	36,6	57,8	96,3
д4	Почки	8,8	13,5	66,9	85,3	95,3	100,0
	Побеги	0,0	0,0	1,8	16,1	25,6	75,0

Таблица 2. Интенсивность каллусогенеза

Table 2. Intensity of callus formation

Вариант	Материал	Индекс нарастания, %			
		Без каллусогенеза	1 балл	2 балла	3 балла
д3	Почки	0,8	12,1	25,8	61,3
	Побеги	3,7	24,7	32,9	38,7
д4	Почки	0,0	18,4	22,9	58,7
	Побеги	25,0	24,7	36,7	13,6

почки) (см. рис. 4). Наиболее ярко дозозависимый рост содержания ДГ при действии ВД, вызванного ПЭГ, выявлен у образца д3 (почки) (см. рис. 4). Таким образом, воздействие ВД способно привести к изменению содержания ДГ в каллусных клетках. Подобным образом был показан рост содержания ДГ с *Mr* 24 кД и появление ДГ с *Mr* 42 кД в клетках соматических

эмбрионов, полученных из эмбрионных клеточных линий *Picea glauca*, подвергнутых различной степени ВД [25], а рост содержания ДГ с *Mr* 65 кД и транскриптов генов ДГ *PsDhn4* и *PsDhn2* наблюдали в хвое и побегах трехмесячных ростков сосны обыкновенной при действии ВД [26]. Межиндивидуальные качественные различия в содержании ДГ наиболее выражены в накоплении ДГ с *Mr* 47 кД в образцах побегов, остальные различия можно отнести к количественным.

На уровне органов качественные межиндивидуальные различия в накоплении ДГ были зафиксированы в клетках почек, а на уровне культуры клеток такие различия наблюдали для каллусных культур побегов. Таким образом, межиндивидуальные различия в накоплении ДГ на уровне органов и на уровне клеточной культуры могут быть неодинаковы и нужно с осторожностью относиться к тому, чтобы прогнозировать накопление ДГ на уровне органа или организма в ответ на ВД, основываясь на данных о накоплении ДГ в клетках каллусной культуры, и наоборот.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования были выявлены межиндивидуальные различия между образцами двух деревьев сосны обыкновенной в накоплении ДГ в весенний период. Накопление ДГ с *Mr* 150, 70, 23, 21, 19, 17 и 14 кД в образцах побегов д4 оказалось выше, что может ука-

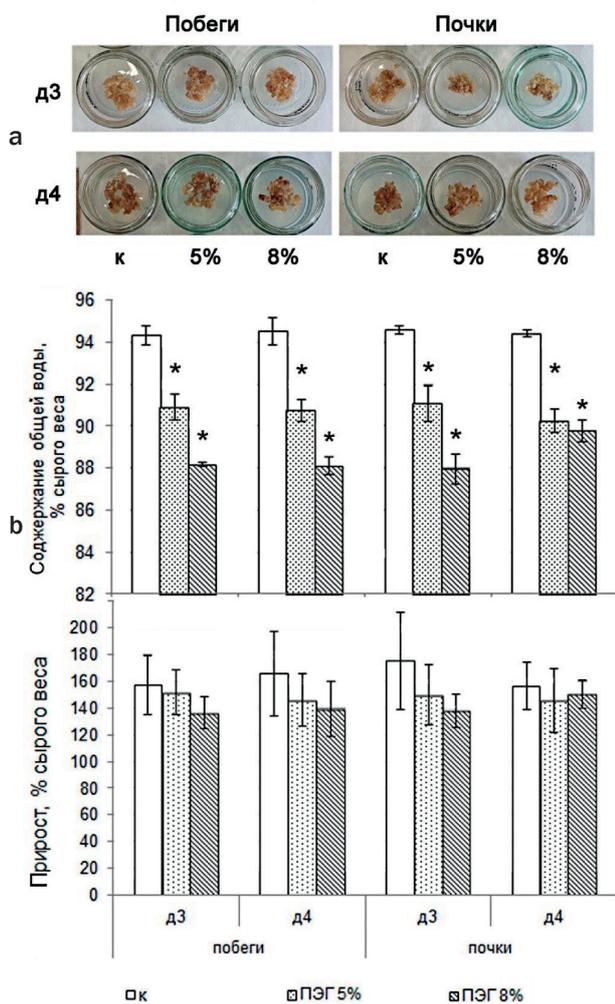


Рис. 2. Влияние водного дефицита на внешний вид (а), а также прирост и содержание общей воды (б) каллусов д3 и д4 ($M \pm m$, $n = 3-9$, к – контроль; * – отличие от контроля значимо при $p < 0,05$. Для оценки значимости различий был использован софт Statistica, t-тест и ранговый тест Манна – Уитни)

Fig. 2. Effect of water deficit on the appearance (a), growth and total water content (b) of T3 and T4 calluses ($M \pm m$, $n = 3-9$, к – control; * – the difference from the control is significant at $p < 0.05$. To assess the significance of the differences, the Statistica soft, the t-test and the Mann – Whitney rank sum test were used)

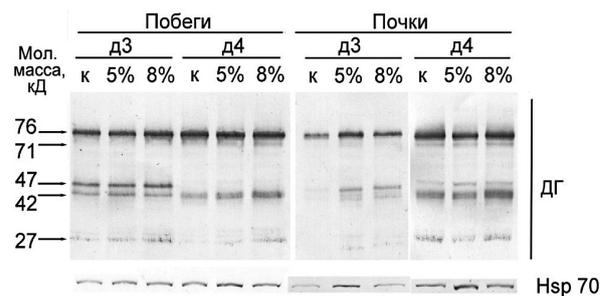


Рис. 3. Влияние водного дефицита на содержание дегидринов и стрессового белка Hsp70 в каллусах д3 и д4 (к – контроль, 5% и 8% – содержание полиэтиленгликоля в среде культивирования). Представлен результат Western Blot после электрофоретического фракционирования. Слева обозначены молекулярные массы дегидринов. На рисунке представлена типичная мембрана

Fig. 3. Effect of water deficit on the content of dehydrins and Hsp70 in T3 and T4 callus (к – control, 5% and 8% – polyethylene glycol content in the cultivation medium). The result of Western Blot after electrophoretic fractionation is presented. The molecular weights of dehydrins are indicated on the left. The figure shows a typical membrane

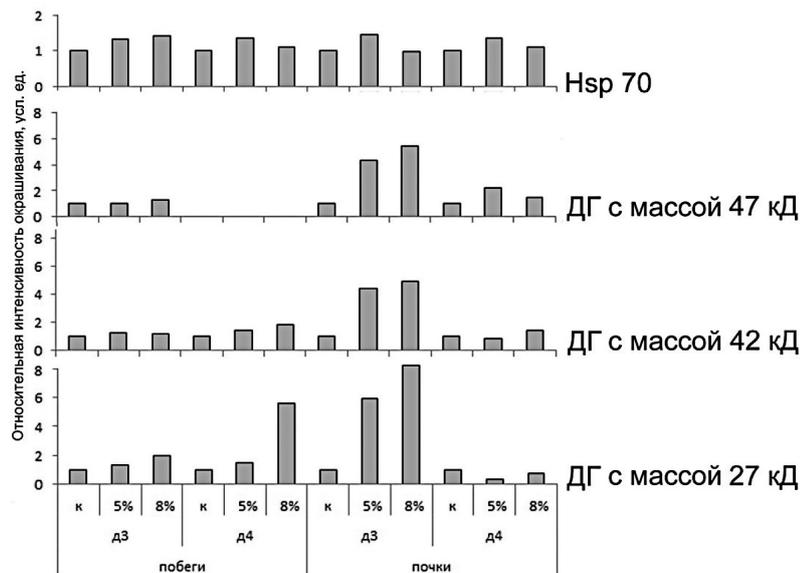


Рис. 4. Изменение относительного содержания дегидринов и стрессового белка Hsp70 в клетках каллусов побегов и почек д3 и д4 под действием водного дефицита (к – контроль, 5% и 8% – содержание полиэтиленгликоля в среде культивирования). Интенсивность окрашивания в каждом экспериментальном образце выражали в условных единицах относительно окрашивания в контрольном образце, принятом за 1

Fig. 4. Change in the relative content of dehydrins and Hsp70 in the cells of shoot's and bud's calluses of T3 and T4 under water deficit (к – control, 5% and 8% – polyethylene glycol content in the cultivation medium). The intensity of staining in each experimental sample was expressed in conventional units relative to the staining in the control sample, taken as 1

зывать на большую холодо- и засухоустойчивость д4. Обнаруженные в каллусной культуре из побегов и почек ДГ с *Mr* 76, 71, 46, 42 и 27 кД связаны по уровню накопления с действием ВД, при этом межиндивидуальные различия между д3 и д4 выражаются в различном уровне накопления отдельных ДГ. Хотя в образце д4 накопление ДГ в побегах и почках было выше, каллусы из побегов и почек д4 не обладали однозначными преимуществами по этим показателям, таким образом, нельзя говорить о том, что накопление ДГ в образце растения имеет прямую связь с накоплением в каллусе, полученном из тканей этого же растения. Однако в каллусах присутствуют межиндивидуальные различия в накоплении ДГ, что говорит в пользу существования различного уровня устойчивости к действию ВД на клеточном

уровне у каллусных культур различного происхождения. Существование таких различий может стать основой для выявления связи между уровнем накопления ДГ и засухоустойчивостью на уровне клеток. Применение каллусной культуры позволило обнаружить ДГ, которые не выявляются на уровне органа или организма, что делает использование такого подхода полезным для выявления протеомных факторов засухоустойчивости у сосны обыкновенной. Поскольку использование клеточных культур позволяет четко разделить устойчивость и адаптацию растений на уровне организма и клеточный уровень устойчивости, ДГ с *Mr* 46, 42 и 27 кД можно считать перспективными для дальнейшего изучения с целью селекции устойчивых культур клеток сосны обыкновенной, а в дальнейшем и целых растений.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Гоф А.А., Жигулин Е.В., Залесов С.В. Причины низкой приживаемости сеянцев сосны обыкновенной с закрытой корневой системой в ленточных борах Алтая // Успехи современного естествознания. 2019. N 12. С. 9–13. EDN: XDILUZ.
2. Гоф А.А., Жигулин Е.В., Залесов С.В., Оплетаяев А.С. Опыт создания лесных культур сеянцами с закрытой корневой системой на гаях Алтайского края // Международный научно-исследовательский журнал. 2019. N 12. С. 125–130. DOI: 10.23670/IRJ.2019.90.12.073. EDN: ZMBMPW.
3. Густокашина Н.Н. Многолетние изменения основных элементов климата на территории Предбайкалья: монография. Иркутск: Изд-во ИГ СО РАН, 2003. 107 с. EDN: QKEXHJ.
4. Kharuk V.I., Im S.T., Petrov I.A., Golyukov A.S., Ranson K.J., Yagunov M.N. Climate-induced mortality of Siberian pine and fir in the Lake Baikal Watershed, Siberia // Forest Ecology and Management. 2017. Vol. 384. P. 191–199. DOI: 10.1016/j.foreco.2016.10.050.
5. Воронин В.И., Морозова Т.И. Устойчивость темнохвойных лесов Прибайкалья к «новым» болезням // Экология и география растений и растительных сообществ: материалы IV Междунар. науч. конф. (г. Екатеринбург, 16–19 апреля 2018 г.). Екатеринбург: Изд-во АНО ВО «Гуманитарный университет», 2018. С. 155–159. EDN: RWCJWD.
6. Velasco-Conde T., Yakovlev I., Majada J.P., Aranda I., Johnsen Ø. Dehydrins in maritime pine (*Pinus pinaster*) and their expression related to drought stress response // Tree Genetics & Genomes. 2012. Vol. 8. P. 957–973. DOI: 10.1007/s11295-012-0476-9.
7. Aziz M.A., Sabeem M., Mullath S.K., Brini F., Mas-moudi K. Plant group II LEA proteins: intrinsically disordered structure for multiple functions in response to environmental stresses // Biomolecules. 2021. Vol. 11, no. 11. P. 1662. DOI: 10.3390/biom11111662.

8. Riyazuddin R., Nisha N., Singh K., Verma R., Gupta R. Involvement of dehydrin proteins in mitigating the negative effects of drought stress in plants // *Plant Cell Reports*. 2022. Vol. 41. P. 519–533. DOI: 10.1007/s00299-021-02720-6.

9. Halder T., Upadhyaya G., Basak C., Das A., Chakraborty C., Ray S. Dehydrins impart protection against oxidative stress in transgenic tobacco plants // *Frontiers in Plant Science*. 2018. Vol. 9. P. 136. DOI: 10.3389/fpls.2018.00136.

10. Szlachowska Z., Rurek M. Plant dehydrins and dehydrin-like proteins: characterization and participation in abiotic stress response // *Frontiers in Plant Science*. 2023. Vol. 14. P. 1213188. DOI: 10.3389/fpls.2023.1213188.

11. Cuevas-Velazquez C.L., Rendón-Luna D.F., Covarrubias A.A. Dissecting the cryoprotection mechanisms for dehydrins // *Frontiers in Plant Science*. 2014. Vol. 5. P. 583. DOI: 10.3389/fpls.2014.00583.

12. Yu Z., Wang X., Zhang L. Structural and functional dynamics of dehydrins: a plant protector protein under abiotic stress // *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. Vol. 19, no. 11. P. 3420. DOI: 10.3390/ijms19113420.

13. Richard S., Morency M.-J., Drevet C., Jouanin L., Séguin A. Isolation and characterization of a dehydrin gene from white spruce induced upon wounding, drought and cold stresses // *Plant Molecular Biology*. 2000. Vol. 43. P. 1–10. DOI: 10.1023/a:1006453811911.

14. Bassett C.L., Wisniewski M.E., Artlip T.S., Norelli J.L., Renaut J., Farrell Jr. R.E. Global analysis of genes regulated by low temperature and photoperiod in peach bark // *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2006. Vol. 131, no. 4. P. 551–563. DOI: 10.21273/jashs.131.4.551.

15. Joosen R.V.L., Lammers M., Balk P.A., Brønnum P., Konings M.C.J.M., Perks M., et al. Correlating gene expression to physiological parameters and environmental conditions during cold acclimation of *Pinus sylvestris*, identification of molecular markers using cDNA microarrays // *Tree Physiology*. 2006. Vol. 26, no. 10. P. 1297–1313. DOI: 10.1093/treephys/26.10.1297.

16. Татарина Т.Д., Перк А.А., Бубякина В.В., Васильева И.В., Пономарев А.Г., Максимов Т.Х. Стрессовые белки-дегидрины в хвое *Pinus sylvestris* L. в условиях экстремального климата Якутии // *Доклады Академии наук*. 2017. Т. 473. N 2. С. 233–236. DOI: 10.7868/S0869565217080242. EDN: VXONRY.

17. Татарина Т.Д., Перк А.А., Пономарев А.Г., Васильева И.В. Связь дегидринов с адаптацией лиственницы Каяндера к условиям криолитозоны Якутии // *Физиология*

растений. 2023. Т. 70. N 5. С. 537–546. DOI: 10.31857/S001533032360016X. EDN: WWJMZE.

18. Аминова Е.Ю., Табацкая Т.М., Машкина О.С., Попов В.Н. Оценка засухоустойчивости отдельных генотипов *Pinus sylvestris* L. на основе метода культуры ткани *in vitro* в моделируемых стрессовых условиях // *Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства*. 2017. N 1. С. 14–22. DOI: 10.21178/2079-6080.2017.1.14. EDN: YMZHGX.

19. Petrov K.A., Sofronova V.E., Bubyakina V.V., Perk A.A., Tatarinova T.D., Ponomarev A.G., et al. Woody plants of Yakutia and low-temperature stress // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2011. Vol. 58. P. 1011–1019. DOI: 10.1134/S1021443711060148.

20. Chang C.Y., Fréchette E., Unda F., Mansfield S.D., Ensminger I. Elevated temperature and CO₂ stimulate late-season photosynthesis but impair cold hardening in pine // *Plant Physiology*. 2016. Vol. 172, no. 2. P. 802–818. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.16.00753>.

21. Коротаева Н.Е., Иванова М.В., Суворова Г.Г., Боровский Г.Б. Дегидрины в адаптации сосны обыкновенной и ели сибирской к условиям произрастания в период вегетации // *Сибирский лесной журнал*. 2020. N 6. С. 54–63. DOI: 10.15372/SJFS20200605. EDN: TUJBFZ.

22. Korotaeva N., Romanenko A., Suvorova G., Ivanova M.V., Lomovatskaya L., Borovskii G., et al. Seasonal changes in the content of dehydrins in mesophyll cells of common pine needles // *Photosynthesis Research*. 2015. Vol. 124. P. 159–169. DOI: 10.1007/s11120-015-0112-2.

23. Newton R.J., Sen S., Puryear J.D. Free proline changes in *Pinus taeda* L. callus in response to drought stress // *Tree Physiology*. 1986. Vol. 1, no. 3. P. 325–332. DOI: 10.1093/treephys/1.3.325.

24. Wu J., Wang J., Hui W., Zhao F., Wang P., Su C., et al. Physiology of plant responses to water stress and related genes: a review // *Forests*. 2022. Vol. 13, no. 2. P. 324. DOI: 10.3390/f13020324.

25. Bomal C., Le V.Q., Tremblay F.M. Induction of tolerance to fast desiccation in black spruce (*Picea mariana*) somatic embryos: relationship between partial water loss, sugars, and dehydrins // *Physiologia Plantarum*. 2002. Vol. 115, no. 4. P. 523–530. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2002.1150406.x.

26. Kartashov A.V., Zlobin I.E., Pashkovskiy P.P., Pojidaeva E.S., Ivanov Y.V., Mamaeva A.S., et al. Quantitative analysis of differential dehydrin regulation in pine and spruce seedlings under water deficit // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2021. Vol. 162. P. 237–246. DOI: 10.1016/j.plaphy.2021.02.040.

REFERENCES

1. Gof A.A., Zhigulin E.V., Zalesov S.V. Reasons of low survival rate of common pine seedlings with a closed root system in Altay strip-pine forests. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya = Advances in current natural sciences*. 2019;12:9-13. (In Russian). EDN: XDILUZ.

2. Gof A.A., Zhigulin E.V., Zalesov S.V., Opletaev A.S. Experience in forest crops creation by seedlings with closed roots on burnt spot of Altai krai. *Mezhdunarodnyj naučno-issledovatel'skij žurnal = International Research Journal*. 2019;12(90):125-130. (In Russian). DOI: 10.23670/IRJ.2019.90.12.073. EDN: ZMBMPW.

3. Gustokashina N.N. Long-term changes in the main

elements of the climate in the territory of the Pred-Baikalye region. Irkutsk: V.B. Sochava Institute of Geography SB RAS; 2003, 107 p. EDN: QKEHXJ.

4. Kharuk V.I., Im S.T., Petrov I.A., Golyukov A.S., Ranson K.J., Yagunov M.N. Climate-induced mortality of Siberian pine and fir in the Lake Baikal Watershed, Siberia. *Forest Ecology and Management*. 2017;384:191-199. DOI: 10.1016/j.foreco.2016.10.050.

5. Voronin V.I., Morozova T.I. Resistance of dark-needle coniferous forests of the Baikal region to “new” diseases. In: *Ekologiya i geografiya rastenii i rastitel'nykh soobshchestv: materialy IV Mezhdunar. nauch. konf.* =

Ecology and geography of plants and plant communities: Proceedings of the 4th International Scientific Conference. 16–19 April 2018, Ekaterinburg. Ekaterinburg: Gumanitarnyi universitet; 2018, p. 155-159. (In Russian). EDN: RWCJWD.

6. Velasco-Conde T., Yakovlev I., Majada J.P., Aranda I., Johnsen Ø. Dehydrins in maritime pine (*Pinus pinaster*) and their expression related to drought stress response. *Tree Genetics & Genomes.* 2012;8:957-973. DOI: 10.1007/s11295-012-0476-9.

7. Aziz M.A., Sabeem M., Mullath S.K., Brini F., Masmoudi K. Plant group II LEA proteins: intrinsically disordered structure for multiple functions in response to environmental stresses. *Biomolecules.* 2021;11(11):1662. DOI: 10.3390/biom11111662.

8. Riyazuddin R., Nisha N., Singh K., Verma R., Gupta R. Involvement of dehydrin proteins in mitigating the negative effects of drought stress in plants. *Plant Cell Reports.* 2022;41:519-533. DOI: 10.1007/s00299-021-02720-6.

9. Halder T., Upadhyaya G., Basak C., Das A., Chakraborty C., Ray S. Dehydrins impart protection against oxidative stress in transgenic tobacco plants. *Frontiers in Plant Science.* 2018;9:136. DOI: 10.3389/fpls.2018.00136.

10. Szlachowska Z., Rurek M. Plant dehydrins and dehydrin-like proteins: characterization and participation in abiotic stress response. *Frontiers in Plant Science.* 2023;14:1213188. DOI: 10.3389/fpls.2023.1213188.

11. Cuevas-Velazquez C.L., Rendón-Luna D.F., Covarrubias A.A. Dissecting the cryoprotection mechanisms for dehydrins. *Frontiers in Plant Science.* 2014;5:583. DOI: 10.3389/fpls.2014.00583.

12. Yu Z., Wang X., Zhang L. Structural and functional dynamics of dehydrins: a plant protector protein under abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences.* 2018;19(11):3420. DOI: 10.3390/ijms19113420.

13. Richard S., Morency M.-J., Drevet C., Jouanin L., Séguin A. Isolation and characterization of a dehydrin gene from white spruce induced upon wounding, drought and cold stresses. *Plant Molecular Biology.* 2000;43:1-10. DOI: 10.1023/a:1006453811911.

14. Bassett C.L., Wisniewski M.E., Artlip T.S., Norelli J.L., Renaut J., Farrell Jr. R.E. Global analysis of genes regulated by low temperature and photoperiod in peach bark. *Journal of the American Society for Horticultural Science.* 2006;131(4):551-563. DOI: 10.21273/jashs.131.4.551.

15. Joosen R.V.L., Lammers M., Balk P.A., Brønnum P., Konings M.C.J.M., Perks M., et al. Correlating gene expression to physiological parameters and environmental conditions during cold acclimation of *Pinus sylvestris*, identification of molecular markers using cDNA microarrays. *Tree Physiology.* 2006;26(10):1297-1313. DOI: 10.1093/treephys/26.10.1297.

16. Tatarinova T.D., Perk A.A., Bubyakina V.V., Vasilieva I.V., Ponomarev A.G., Maximov T.C. Dehydrin stress proteins in *Pinus sylvestris* L. needles under conditions of extreme climate of Yakutia. *Doklady Akademii nauk.* 2017;473(2):233-236. (In Russian). DOI: 10.7868/S0869565217080242. EDN: VXONRY.

17. Tatarinova T.D., Perk A.A., Ponomarev A.G., Vasil'eva I.V. Connection of dehydrins with the adaptation of Kayander larch to the conditions of the Yakutia cryolithozone. *Fiziologiya rastenii.* 2023;70(5):537-546. (In Russian). DOI: 10.31857/S001533032360016X. EDN: WWJMZE.

18. Amineva E.Yu., Tabatskaya T.M., Mashkina O.S., Popov V.N. Assessment of drought resistance of individual genotypes of *Pinus sylvestris* L. on the basis of *in vitro* tissue culture method in simulated stress conditions. *Trudy Sankt-Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo khozyaistva = Proceedings of the Saint Petersburg Forestry Research Institute.* 2017;1:14-22. (In Russian). DOI: 10.21178/2079-6080.2017.1.14. EDN: YMHZGZ.

19. Petrov K.A., Sofronova V.E., Bubyakina V.V., Perk A.A., Tatarinova T.D., Ponomarev A.G., et al. Woody plants of Yakutia and low-temperature stress. *Russian Journal of Plant Physiology.* 2011;58:1011-1019. DOI: 10.1134/S1021443711060148.

20. Chang C.Y., Fréchette E., Unda F., Mansfield S.D., Ensminger I. Elevated temperature and CO₂ stimulate late-season photosynthesis but impair cold hardening in pine. *Plant Physiology.* 2016;172(2):802-818. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.16.00753>.

21. Korotaeva N.E., Ivanova M.V., Suvorova G.G., Borovskii G.B. Dehydrins in the adaptation of common pine and Siberian spruce to growing conditions during vegetation period. *Sibirskii lesnoi zhurnal = Siberian Journal of Forest Science.* 2020;6:54-63. (In Russian). DOI: 10.15372/SJFS20200605. EDN: TUJBFZ.

22. Korotaeva N., Romanenko A., Suvorova G., Ivanova M.V., Lomovatskaya L., Borovskii G., et al. Seasonal changes in the content of dehydrins in mesophyll cells of common pine needles. *Photosynthesis Research.* 2015;124:159-169. DOI: 10.1007/s11120-015-0112-2.

23. Newton R.J., Sen S., Puryear J.D. Free proline changes in *Pinus taeda* L. callus in response to drought stress. *Tree Physiology.* 1986;1(3):325-332. DOI: 10.1093/treephys/1.3.325.

24. Wu J., Wang J., Hui W., Zhao F., Wang P., Su C., et al. Physiology of plant responses to water stress and related genes: a review. *Forests.* 2022;13(2):324. DOI: 10.3390/f13020324.

25. Bomal C., Le V.Q., Tremblay F.M. Induction of tolerance to fast desiccation in black spruce (*Picea mariana*) somatic embryos: relationship between partial water loss, sugars, and dehydrins. *Physiologia Plantarum.* 2002;115(4):523-530. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2002.1150406.x.

26. Kartashov A.V., Zlobin I.E., Pashkovskiy P.P., Pojidaeva E.S., Ivanov Y.V., Mamaeva A.S., et al. Quantitative analysis of differential dehydrin regulation in pine and spruce seedlings under water deficit. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2021;162:237-246. DOI: 10.1016/j.plaphy.2021.02.040.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Коротаева Наталья Евгеньевна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
✉ korotaeva73@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4236-389X>

Шмаков Владимир Николаевич,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
scherckr@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2965-1758>

Молдавская Софья Эдуардовна,
старший лаборант,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
aria.zymys@bk.ru
<https://orcid.org/0009-0005-2039-8428>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 24.08.2023.
Одобрена после рецензирования 08.11.2023.
Принята к публикации 31.10.2023.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Natalia E. Korotaeva,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ korotaeva73@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4236-389X>

Vladimir N. Shmakov,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
scherckr@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2965-1758>

Sofia E. Moldavskaya,
Senior Laboratory Assistant,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
aria.zymys@bk.ru
<https://orcid.org/0009-0005-2039-8428>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

Information about the article

The article was submitted 24.08.2023.
Approved after reviewing 08.11.2023.
Accepted for publication 31.10.2023.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 581.1:661.163
EDN: MBSOJL
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-589-601



Влияние тебуконазола и азоксистробина на физиологические параметры и устойчивость проростков пшеницы к водному дефициту

Т.П. Побежимова*, Е.В. Бережная*, Е.А. Полякова*, А.В. Корсукова*, Н.С. Забанова***, И.В. Любушкина***, А.В. Степанов*, Н.В. Дорофеев*, О.И. Грабельных✉***

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Российская Федерация

**Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Российская Федерация

Аннотация. Фунгициды класса триазолов и стробилуринов активно применяются в сельском хозяйстве в составе протравителей для защиты растений от грибковых заболеваний, кроме того, они оказывают на растения различные физиологические эффекты, в том числе могут повышать устойчивость к неблагоприятным факторам среды. Совместное действие данных фунгицидов при водном дефиците мало изучено. Целью представленного исследования было изучение отдельного и совместного влияния тебуконазола и азоксистробина на ростовые характеристики и устойчивость пшеницы к водному дефициту. В ходе работы использовали растения озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), выращенные из семян, обработанных суспензиями тебуконазола (2 мг/50 г семян) и азоксистробина (4 мг/50 г семян) по отдельности или совместно. Для создания водного дефицита проростки в возрасте 5 суток перемещали на раствор 20%-го полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000), устойчивость оценивали в возрасте 7 и 9 суток. Установлено, что тебуконазол оказывал ретардантный эффект на побеги и стимулировал рост корней. Азоксистробин ингибировал рост побегов и особенно рост корней. При совместной обработке тебуконазол частично снижал вызванное азоксистробином ингибирование корневой системы. Азоксистробин усиливал отрицательное действие водного дефицита, в то время как тебуконазол эффективно защищал корневую систему проростков и частично снижал действие азоксистробина. Сделано заключение, что стимулирование роста корневой системы тебуконазолом играет важную роль в обеспечении устойчивости озимой пшеницы к водному дефициту и может быть использовано в сельском хозяйстве.

Ключевые слова: пшеница, тебуконазол, азоксистробин, рост побегов и корней, водный дефицит

Благодарности. Исследования проводились на оборудовании Центра коллективного пользования «Биоаналитика» с использованием коллекций Центра коллективного пользования «Биоресурсный центр» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск, Российская Федерация).

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (№ 122041100049-0).

Для цитирования: Побежимова Т.П., Бережная Е.В., Полякова Е.А., Корсукова А.В., Забанова Н.С., Любушкина И.В. [и др.]. Влияние тебуконазола и азоксистробина на физиологические параметры и устойчивость проростков пшеницы к водному дефициту // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 589–601. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-589-601. EDN: MBSOJL.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Effect of tebuconazole and azoxystrobin on the physiological parameters of wheat seedlings and their resistance to water stress

Tamara P. Pobezhimova*, Ekaterina V. Berezhnaya*, Elizaveta A. Polyakova*, Anna V. Korsukova*, Natalya S. Zabanova***, Irina V. Lyubushkina***, Alexey V. Stepanov*, Nikolay V. Dorofeev*, Olga I. Gabelnych✉***

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

**Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

© Побежимова Т.П., Бережная Е.В., Полякова Е.А., Корсукова А.В., Забанова Н.С., Любушкина И.В., Степанов А.В., Дорофеев Н.В., Грабельных О.И., 2023

Abstract. *Strobilurin and triazole class fungicides are actively used in agriculture as part of dressers to protect plants from fungal disease. In addition, they have various physiological effects on plants, including increased resistance to adverse environmental factors. The combined effect of these fungicides under water stress is understudied. The present work aims to examine the individual and combined effects of tebuconazole and azoxystrobin on the growth characteristics of wheat and its resistance to water stress. The study used winter wheat (*Triticum aestivum* L.) plants grown from seeds treated with tebuconazole (2 mg/50 g seeds) and azoxystrobin (4 mg/50 g seeds) suspensions separately or together. In order to create water stress, five-day seedlings were transferred to 20% polyethylene glycol solution (PEG 6000), with stability assessed at seven and nine days. Tebuconazole was found to have a retardant effect on shoots and stimulate root growth. Azoxystrobin inhibited shoot growth and particularly root growth. When used together, tebuconazole partially reduced azoxystrobin-induced root inhibition. Azoxystrobin increased the negative effect of water stress, while tebuconazole effectively protected the root system of seedlings, partially reducing the effect of azoxystrobin. The stimulation of root growth with tebuconazole was concluded to play an important role in providing resistance of winter wheat to water stress and to have the potential for use in agriculture.*

Keywords: wheat, tebuconazole, azoxystrobin, shoot growth, root growth, water stress

Acknowledgements. *The research was carried out using the equipment of the Center for Collective Use "Bioanalytics" and the collections of the Center for Collective Use "Bioresource Center" of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (Irkutsk, Russian Federation).*

Funding. *The work was performed within the framework of the state assignment of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (no. 122041100049-0).*

For citation: Pobezhimova T.P., Berezhnaya E.V., Polyakova E.A., Korsukova A.V., Zabanova N.S., Lyubushkina I.V., et al. Effect of tebuconazole and azoxystrobin on the physiological parameters of wheat seedlings and their resistance to water stress. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2023;13(4):589-601. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-589-601. EDN: MBSOJL.

ВВЕДЕНИЕ

Дефицит воды и засуха являются одними из основных абиотических стрессов, оказывающих негативное влияние на продуктивность растений. Изучение механизмов адаптации к водному дефициту, поиск и разработка технологий снижения неблагоприятного действия этого фактора на растения является актуальной задачей растениеводства. Водный дефицит угнетает рост, реакции фотосинтеза и дыхания, приводит к развитию окислительного стресса и снижает урожайность важных сельскохозяйственных культур. Повышение устойчивости растений к недостатку влаги в почве возможно путем применения средств химической защиты. Протравливание семенного материала фунгицидными препаратами при предпосевной обработке семян представляет собой эффективный способ предотвращения грибковых заболеваний, а наличие выраженных физиологических эффектов этих веществ на растения позволяет считать ряд фунгицидов «стресс-протекторами». Такой термин вполне подходит для азолов и стробилуринов, препараты на основе которых занимают значительное место в сельскохозяйственном производстве.

Азолы представляют собой системные фунгициды защитного, искореняющего и лечебного действия, им свойственна низкая фитотоксичность и широкий спектр противогрибковой активности¹ [1]. Фунгицидная активность азолов связана с их способностью нарушать биосинтез стероидов и терпеноидов у грибов¹ [2]. Выступая в качестве ретардантов, азолы вызывают у зерновых культур торможение удлинения междоузлий и роста осевых органов растений за счет нарушения биосинтеза гиббереллинов¹. Наибольшее применение среди азолов получили триазолы, которые оказывают физиологические

эффекты на растения и помимо ретардантного действия и влияния на баланс гормонов (ингибирование синтеза гиббереллинов и повышение содержания абсцизовой кислоты) увеличивают содержание хлорофилла (эффект «зеленения» листьев), растворимого белка и сахаров, вызывают изменения в интенсивности дыхания, функционировании системы антиоксидантной защиты клетки, изменяют состав жирных кислот и в итоге влияют на устойчивость к стрессам и урожайность [3]. Одним из представителей производных 1,2,4-триазола является тебуконазол, который в основном применяют как профилактический и лечебный системный фунгицид, поскольку он эффективен против всех видов ржавчины зерновых культур, септориоза, а также подавляет головневые грибы, возбудителей корневых гнилей и плесневения семян¹. Тебуконазол и тебуконазол-содержащие препараты оказывают разнонаправленный эффект на рост побегов и корней пшеницы: ингибируют рост побегов, но стимулируют рост корней [4, 5]. Показан положительный эффект триазолов и, в частности, тебуконазола на устойчивость растений к водному дефициту, засухе и засолению [6–8]. Усиление устойчивости к недостатку влаги в основном было связано с более развитой под действием триазолов корневой системой, повышенным содержанием пигментов, более эффективной работой фотосинтетического аппарата и антиоксидантной системы защиты клетки.

Стробилурины представляют собой контактные фунгициды с лечащим действием и частичным системным эффектом¹. Их фунгицидное действие связано с ингибированием митохондриального дыхания клеток патогенов на уровне комплекса III [9]. Как и триазолам, стробилуринам свойственна низкая фитотоксичность¹

¹Попов С.Я., Дорожкина Л.А., Калинин В.А. Основы химической защиты растений: учеб. пособие. М.: Арт-Лион, 2003. 208 с.

и наличие физиологических эффектов действия на растения, которые очень сильно варьируют не только среди видов, но даже внутри одного вида [10]. Среди стробилуринов наиболее широкое применение получил метоксиакрилат азоксистробин, ингибирующий прорастание спор грибов и обладающий искореняющим, защитным, трансламинарным и системным действием [9]. Некоторые авторы отмечают сходные физиологические эффекты триазолов и стробилуринов, например, Янь-Цзюнь Чжан с соавторами [11] обнаружили, что опрыскивание тебуконазолом и азоксистробинном сходным образом предотвращает старение листьев озимой пшеницы в полевых условиях и позволяет получить более высокий урожай зерна. Задержка старения листьев пшеницы [11] и женьшеня [12] была связана с повышением активности антиоксидантных ферментов и снижением развития окислительного стресса. Среди других эффектов действия азоксистробина авторы отмечали увеличение содержания хлорофилла и растворимого белка. Существуют данные об увеличении содержания сахаров под влиянием азоксистробина [13]. В отличие от триазолов, азоксистробин ингибирует длину не только побегов, но и корней [13, 14]. Показаны как положительные эффекты азоксистробина при стрессе, вызванном водным дефицитом и засухой [10, 14–17], так и отрицательные [18]. Азоксистробин восстанавливал скорость ассимиляции углекислого газа и устьичную проводимость и повышал урожай зерна пшеницы [15]. Совместное применение азоксистробина с другими регуляторами роста (4-хлорфеноксиуксусной кислотой) позволяло частично избежать проявления его негативных эффектов, например задержки прорастания семян [19].

Комбинирование в составе препаратов для протравливания семян нескольких действующих веществ из разных классов предотвращает формирование у патогенов резистентности и повышает эффективность обработки. Пока остается слабоизученным вопрос о том, какое влияние оказывает сочетание фунгицидов с различным механизмом действия на физиологические процессы растений. При выборе протравителя и разработке комбинированных препаратов рекомендуется учитывать возможный фитотоксический эффект, зависящий от дозы протравителя и сочетания фунгицидов [20]. Комбинации действующих веществ могут по-разному влиять на всхожесть семян, рост проростков и стрессоустойчивость растений, при этом не всегда удается выявить вклад отдельного фунгицида в оказываемое препаратом действие. Так, показан положительный эффект совместной обработки тебуконазолом и трифлостробинном на ростовые процессы, содержание пигментов, состояние воды в листьях, про- или антиоксидантный статус и ряд других показателей у пшеницы при засолении и кадмиевом стрессе [21–23].

Недостаточная водообеспеченность в осенний период роста и развития озимых культур является одним из значимых риск-факторов, определяющих полевую всхожесть, а также подготовку растений к зимовке и, как следствие, их зимостойкость и дальнейшую продуктивность. Предпосевная обработка семян служит наиболее экономически эффективным и экологически безопасным способом коррекции фитосанитарного состояния семян и растений, а дополнительные физиологические эффекты фунгицидных протравителей позволяют влиять и на

устойчивость растений к неблагоприятным факторам различной природы. Совместное действие тебуконазола и азоксистробина при обработке семенного материала на физиологические характеристики озимой пшеницы при водном дефиците ранее не исследовалось.

Целью представленного исследования было изучение влияния тебуконазола и азоксистробина по отдельности и совместно на ростовые показатели и устойчивость проростков озимой пшеницы к водному дефициту, вызванному полиэтиленгликолем (ПЭГ 6000).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали растения озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Иркутская в возрасте 5, 7 и 9 суток, выращенные из семян, обработанных и не обработанных фунгицидами. Очищенные от пыли и примесей семена обрабатывали суспензиями тебуконазола (2 мг/50 г семян) и азоксистробина (4 мг/50 г семян) по отдельности (варианты «ТЕБ» и «АЗ») или совместно (вариант «ТЕБ + АЗ»). Фунгициды растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) (50 мкл ДМСО/50 г семян), переносили в небольшой объем воды для получения мутно-белой суспензии, которой обрабатывали влажные семена. В качестве контрольных использовали не обработанные фунгицидами семена, поверхность которых обрабатывалась либо дистиллированной водой (вариант «К1»), либо ДМСО (вариант «К2»).

Сразу же после нанесения фунгицидов на поверхность семян семена заливали дистиллированной водой выше уровня семян на 1 см и оставляли набухать в темноте в течение суток при комнатной температуре. Данный способ обработки был выбран как оптимальный для проявления ретардантного эффекта фунгицидов на основании предварительных экспериментов. С не обработанными фунгицидами семенами проводили те же действия. Через сутки воду сливали, семена промывали и оставляли еще на сутки в закрытом сосуде в этих же условиях. Проклюнувшиеся семена распределяли на рамки из полиамидной сетки, размещенные в пластиковых контейнерах (объемом 3,5 л) с водой и выращивали в камере KBW 720 (Binder, Германия) с температурой 23/20±0,1 °С (фотопериод 16 ч), влажностью 70% и освещенностью 250 мкмоль/м²×с⁻¹ ФАР. Через двое суток растения переносили на раствор Кнопса (1/2 нормы) и продолжали выращивать до возраста 5 суток. У 5-суточных проростков питательный раствор заменяли на свежий, а для создания водного дефицита часть растений переносили на раствор Кнопса, содержащий 20%-й полиэтиленгликоль с молекулярной массой $M_r \geq 6000$ (ПЭГ 6000), и продолжали выращивать проростки до возраста 7 суток. У 7-суточных проростков растворы заменяли на свежие и выращивали их до возраста 9 суток. Общая продолжительность воздействия ПЭГ 6000 составила 96 часов. Молекулы ПЭГ 6000 инертные, нетоксичные, не проникают в ткани растения и позволяют выводить воду из клетки контролируемым образом, поэтому его широко применяют для моделирования условий почвенной засухи на разных культурах, в том числе пшенице [24]. Концентрацию ПЭГ 6000 подбирали в предварительном эксперименте.

Для оценки влияния фунгицидов на рост измеряли длину надземной части (длину coleoptily и всего побега) и суммарную длину корней у проростков в возрасте 5,

7 и 9 суток. Влияние водного дефицита на ростовые параметры оценивали через 48 и 96 часов нахождения проростков на растворе с ПЭГ 6000 (в возрасте проростков 7 и 9 суток). Проводили по 50 независимых измерений в каждой биологической повторности. Также рассчитывали для каждого проростка отношение длины побега к сумме длин корней – данный показатель наглядно отображает направленность действия фунгицидов на ростовые процессы. Для определения сырой и сухой биомассы использовали по 50 штук проростков каждого варианта. Высушивание проводили при 80 °С до постоянного веса.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программного пакета SigmaPlot v. 14.0. Данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты [25%; 75%]. Для доказательства наличия значимых различий использовали ранговый однофакторный дисперсионный анализ Краскела – Уоллиса с последующей процедурой множественного сравнения по методу Данна. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Многие фунгициды помимо своей основной активности оказывают на растения побочные физиологические эффекты – как положительные (регуляция роста и повышение устойчивости к стрессам), так и отрицательные (токсическое действие). Ранее мы показали, что тебуконазол-содержащий протравитель «Бункер» (АО «Август», Россия, действующее вещество тебуконазол 60 г/л) в рекомендуемой производителем (0,5 л/т) и трехкратно повышенной дозах ингибирует рост побегов и стимулирует рост корней озимой пшеницы [5]. Препарат ожидаемо проявлял фунгицидный эффект, не оказывал фитотоксического действия и не снижал всхожесть семян, при этом приводил к повышению морозоустойчивости [25]. Стимулирование роста корневой системы у яровой пшеницы и ярового ячменя наблюдалось после обработки семян другим тебуконазол-содержащим протравителем – «Ламадор» (АО «Байер», действующие вещества протиоконазол 250 г/л и тебуконазол 150 г/л) [4]. Увеличение длины корней после обработки протравителем «Ламадор» в первые недели роста растений повышало засухоустойчивость и улучшало потребление влаги и элементов питания, а также увеличивало коэффициент кущения [4]. В то же время фунгицид азоксистробин в чистом виде в концентрации 5–20 мкМ вызывал значительное ингибирование роста побегов и корней озимой пшеницы, однако не имел фитотоксического действия [13]. Ингибирование азоксистробином длины корней и побегов и сырого веса побегов отмечалось и другими авторами [14].

Определение морфометрических параметров (длина coleoptilia, длина побега, сумма длин корней, сырая и сухая биомасса побегов и корней) проростков озимой пшеницы, выращенных из обработанных фунгицидами семян, подтвердило различия в направленности изменений ростовых процессов, вызываемых тебуконазолом и азоксистробином. Спустя 5 суток роста было обнаружено, что обработка семян тебуконазолом снижала длину надземной части проростка (на 27–30%) и не влияла на рост корней (рис. 1, а, б). Снижение длины побегов под действием тебуконазола не сопровождалось

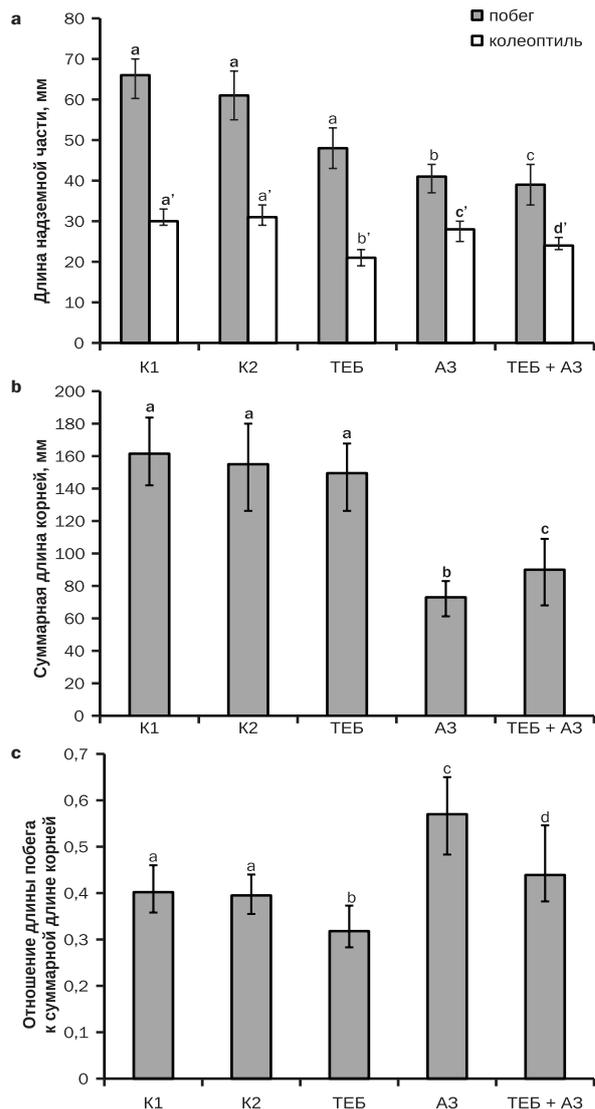


Рис. 1. Влияние фунгицидов на длину coleoptилей и побегов (а), сумму длин корней (б) и отношение длины побега к сумме длин корней (с) проростков озимой пшеницы в возрасте 5 суток. К1 – необработанные семена (контроль, дистиллированная вода); К2 – семена, обработанные диметилсульфоксидом (контроль, диметилсульфоксид); ТЕБ – семена, обработанные тебуконазолом (2 мг/50 г семян); А3 – семена, обработанные азоксистробином (4 мг/50 г семян); ТЕБ + А3 – семена, обработанные совместно тебуконазолом (2 мг/50 г семян) и азоксистробином (4 мг/50 г семян). Данные представлены в виде медианы [25%; 75%], $n = 100-200$. Разными буквами показаны статистически значимые различия при $P \leq 0,05$ (метод Данна)

Fig. 1. Effect of fungicides on the length of coleoptiles and shoots (a), the sum of root lengths (b) and the ratio of shoot length to the sum of root lengths (c) in winter wheat seedlings on the 5th day of growth. K1 – untreated seeds (control, distilled water); K2 – seeds treated with dimethyl sulfoxide solution (control, dimethyl sulfoxide); ТЕБ – seeds treated with tebuconazole (2 mg/50 g seeds); А3 – seeds treated with azoxystrobin (4 mg/50 g of seeds); ТЕБ + А3 – seeds treated together with tebuconazole (2 mg/50 g of seeds) and azoxystrobin (4 mg/50 g of seeds). Data are presented as Me [25%; 75%], $n = 100-200$. Different letters show statistically significant differences at $P \leq 0.05$ (Dunn's method)

статистически значимым снижением сырой и сухой биомассы (рис. 2). Внешне побеги выглядели крепкими, имели утолщенный стебель, более широкую листовую пластинку и темно-зеленый цвет. Следует отметить, что контрольные проростки из не обработанных фунгицидами семян, поверхность которых обрабатывалась дистиллированной водой (K1) или ДМСО, являвшимся растворителем для фунгицидов (K2), не отличались между собой по ростовым характеристикам (см. рис. 1, 2), поэтому изменения параметров роста после обработки фунгицидами приведены в процентах от показателей варианта K1.

Отличное от тебуконазола действие на проростки озимой пшеницы оказывала обработка семян азоксистробинном: он не только более существенно снижал рост побегов (на 37%), но и значительно ингибировал рост корней (на 55%) (см. рис. 1, a, b). Снижение длины

побегов и корней под действием азоксистробина приводило к статистически значимому снижению сырой и сухой биомассы (см. рис. 2). Внешне побеги выглядели более тонкими, имели узкую листовую пластинку и светло-зеленый цвет. При совместной обработке семян тебуконазолом и азоксистробинном, так же, как и при обработке отдельно азоксистробинном, наблюдали снижение длины побегов и корней и снижение их биомассы (см. рис. 1, 2). Однако ингибирование длины побегов и корней в случае совместной обработки было менее выражено, что свидетельствует о возможном защитном действии тебуконазола. Направленность изменений роста побега и корней под влиянием тебуконазола и азоксистробина и их совместного действия отражает такой показатель, как отношение длины побега к сумме длин корней: его величина снижается при ингибировании длины побегов в большей степени, чем корней,

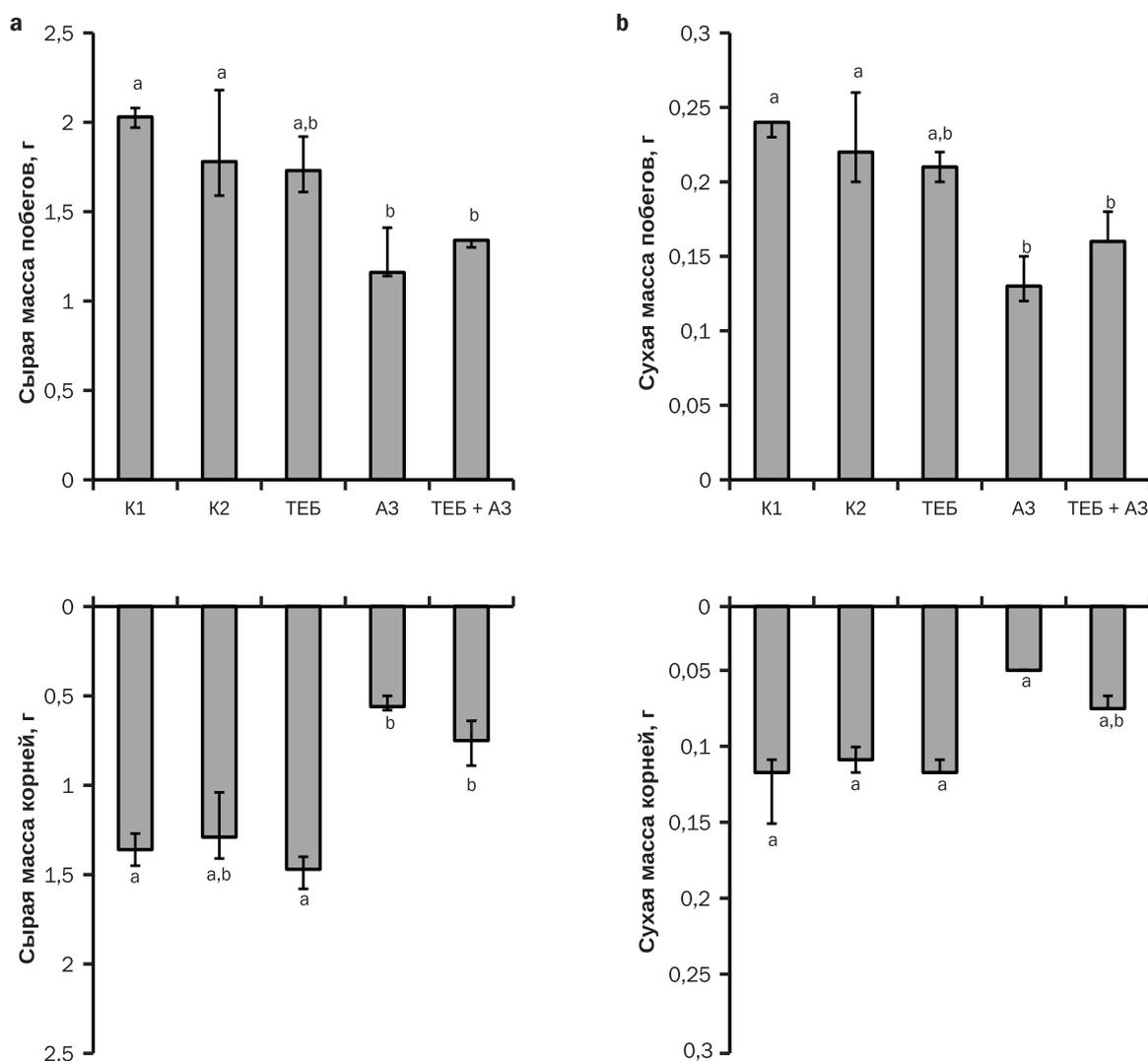


Рис. 2. Влияние фунгицидов на сырую (a) и сухую (b) биомассу побегов и корней проростков озимой пшеницы в возрасте 5 суток. Сырая и сухая биомасса включают вес 50 проростков. Обозначения те же, что и на рис. 1. Данные представлены в виде медианы [25%; 75%], $n = 3-5$. Разными буквами показаны статистически значимые различия при $P \leq 0,05$ (метод Данна)

Fig. 2. Effect of fungicides on the wet (a) and dry (b) biomass of shoots and roots of winter wheat seedlings on the 5th day of growth. Wet and dry biomass include the weight of 50 seedlings. The designations are the same as in Fig. 1. Data are presented as Me [25%; 75%], $n = 3-5$. Different letters indicate statistically significant differences at $P \leq 0.05$ (Dunn's method)

и, наоборот, увеличивается при сильном ингибировании длины корней (рис. 1, с).

Ранее было установлено, что ингибирование роста побегов под действием тебуконазол-содержащего протравителя «Бункер» и чистого азоксистробина сопровождается снижением расхода сахаров, что приводит к их более высокому содержанию в тканях побегов [3, 13]. Меньший расход сахаров под действием этих фунгицидов также может быть связан с их функционированием в качестве ингибиторов дыхания: тебуконазол ингибирует транспорт электронов через комплекс I дыхательной цепи [26], а азоксистробин, как известно из литературы, блокирует транспорт электронов через комплекс III дыхательной цепи [9]. Сахара выполняют осморегуляторную, криопротекторную и антиоксидантную функции и задействованы в защитных реакциях растений при водном дефиците.

Чтобы оценить влияние тебуконазола и азоксистробина по отдельности и совместно на устойчивость проростков озимой пшеницы к водному дефициту, использовали осмотик ПЭГ 6000, который вносили в питательную среду через 5 суток роста в конечной концентрации 20%, и отслеживали изменения ростовых характеристик через 48 (возраст проростков 7 суток) и 96 (возраст проростков 9 суток) часов воздействия (рис. 3, 4).

В отсутствии водного дефицита у 7- и 9-суточных проростков действие тебуконазола на побеги и корни озимой пшеницы сохранялось и даже усиливалось. Так, у 7-суточных проростков было обнаружено, что тебуконазол снижает длину побегов на 31%, при этом он не влияет на длину корней и на биомассу побегов и корней (см. рис. 3, 4). У 9-суточных проростков ингибирование длины побегов тебуконазолом составило 35% и он значительно стимулировал рост корней – суммарная длина корней у проростков увеличивалась на 40% по сравнению с контрольными (см. рис. 3). Сырая масса побегов и корней статистически значимо не изменялась (см. рис. 4). Обработка азоксистробинем снижала длину побегов на 20 и 18%, а длину корней на 46 и 44% у 7- и 9-суточных проростков соответственно (см. рис. 3), эти изменения сопровождалось снижением сырой и сухой биомассы побегов и корней (см. рис. 4). При совместной обработке тебуконазолом и азоксистробинем ингибирование длины побегов и корней у 7-суточных проростков составляло 37% и сопровождалось уменьшением сырой и сухой биомассы (см. рис. 3, 4). При этом обнаруживалась тенденция к повышению показателей биомассы при совместной обработке по сравнению с действием только азоксистробина, что, вероятно, было связано с проявлением защитного эффекта тебуконазола. Защитный эффект тебуконазола при совместной обработке в большей мере проявился у 9-суточных проростков и был направлен на развитие корневой системы, при этом суммарная длина корней у проростков этого варианта (ТЕБ + АЗ) соответствовала длине корней проростков из необработанных семян (К1 и К2) (см. рис. 3). Сырая масса корней и побегов при совместной обработке не отличалась от показателей контрольных растений.

Водный дефицит оказывал существенное влияние на ростовые характеристики проростков озимой пшеницы, особенно на их корневую систему. В присутствии ПЭГ

6000 в питательной среде через 48 часов воздействия (7-суточные проростки) наблюдали снижение длины побегов на 16–18% у контрольных вариантов и на 21% у проростков, выращенных из семян, обработанных азоксистробинем (см. рис. 3, 4). При этом осмотик не оказывал влияния на длину побегов проростков из обработанных тебуконазолом семян и на длину побегов проростков, выращенных из семян, подвергнутых совместной обработке тебуконазолом и азоксистробинем. Независимо от влияния на длину побегов, сырая биомасса побегов снижалась во всех вариантах. Водный дефицит снижал длину корней контрольных и обработанных тебуконазолом проростков и не влиял на длину корней после обработки азоксистробинем и при совместной обработке. Сырая масса корней снижалась только у контрольных вариантов.

Через 96 часов воздействия ПЭГ 6000 сохранялось действие водного дефицита на рост побегов и корней озимой пшеницы: наблюдалось снижение длины побегов у контрольных проростков и проростков из семян, обработанных азоксистробинем (как отдельно, так и совместно с тебуконазолом). При этом азоксистробин при отдельном действии усиливал отрицательное действие водного дефицита на побеги: если ингибирование длины побега у контрольных вариантов составляло 16–18%, то после обработки азоксистробинем оно выросло до 32% (см. рис. 3). Сырая масса побегов снижалась у всех вариантов, но ингибирование прироста биомассы было наиболее существенным в вариантах обработки семян азоксистробинем как отдельно, так и совместно с тебуконазолом. Если снижение прироста биомассы у вариантов К1, К2 и при действии тебуконазола в среднем составляло 29–33%, то в варианте с обработкой семян азоксистробинем – 40%. Статистически значимое снижение сухой биомассы при водном дефиците также наблюдали только при обработке семян азоксистробинем отдельно или совместно с тебуконазолом. Длина корней контрольных проростков и проростков, выращенных из семян, обработанных тебуконазолом, через 96 часов воздействия ПЭГ 6000 снижалась, но у обработанных тебуконазолом проростков абсолютное значение суммы корней было на уровне контрольных без воздействия осмотического агента. Водный дефицит не оказывал влияния на длину корней, обработанных азоксистробинем, но ингибировал длину корней при совместной с тебуконазолом обработке, хотя абсолютное значение было на уровне контрольных растений при водном дефиците. Таким образом, тебуконазол снижал негативное действие азоксистробина через 96 часов воздействия осмотика.

Полученные нами результаты о защитном действии тебуконазола при водном дефиците согласуются с результатами исследований других авторов. Так, тебуконазол и другие триазолы (гексаконазол и пропиконазол) снижали действие засухи на растения подсолнечника, что проявлялось в увеличении длины корней, повышении содержания хлорофиллов, каротиноидов и антоцианов, а также урожайности [7]. Опрыскивание тебуконазолом повышало устойчивость растений сахарной свеклы к водному стрессу за счет улучшения параметров роста и фотосинтеза, активации ряда антиоксидантных ферментов и снижения окислительного стресса, что приводило к повышению урожайности [8]. Увеличение содержания

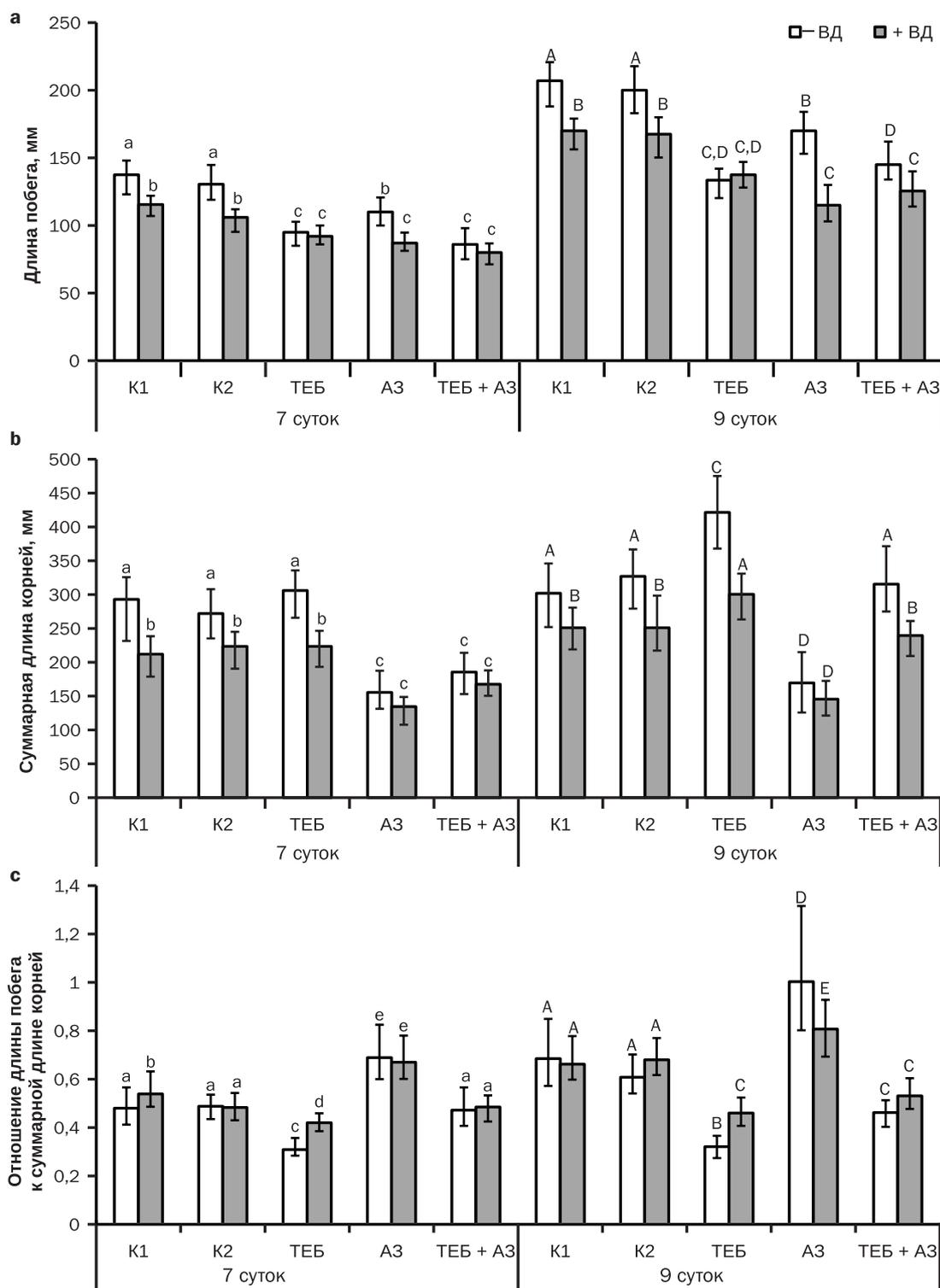


Рис. 3. Влияние фунгицидов и водного дефицита (ВД) на длину побегов (а), сумму длин корней (б) и отношение длины побега к сумме длин корней (с) проростков озимой пшеницы в возрасте 7 и 9 суток. Проростки в возрасте 5 суток переносили на питательный раствор, содержащий 20% ПЭГ 6000, и подвергали стрессу в течение 48 и 96 часов (анализ проводили на 7-е и 9-е сутки роста соответственно). Обозначения те же, что и на рис. 1. Данные представлены в виде медианы [25%; 75%], $n = 100-200$. Разными буквами показаны статистически значимые различия при $P \leq 0,05$ (метод Данна)

Fig. 3. Effect of fungicides and water deficiency (ВД) on the length of shoots (a), the sum of root lengths (b) and the ratio of shoot length to the sum of root lengths (c) of winter wheat seedlings on the 7th and 9th days of growth. Seedlings at the age of 5 days were transferred to a nutrient solution containing 20% PEG 6000 and subjected to stress for 48 and 96 hours (analysis was carried out on days 7 and 9 of growth, respectively). The designations are the same as in Fig. 1. Data are presented as Me [25%; 75%], $n = 100-200$. Different letters show statistically significant differences at $P \leq 0.05$ (Dunn's method)

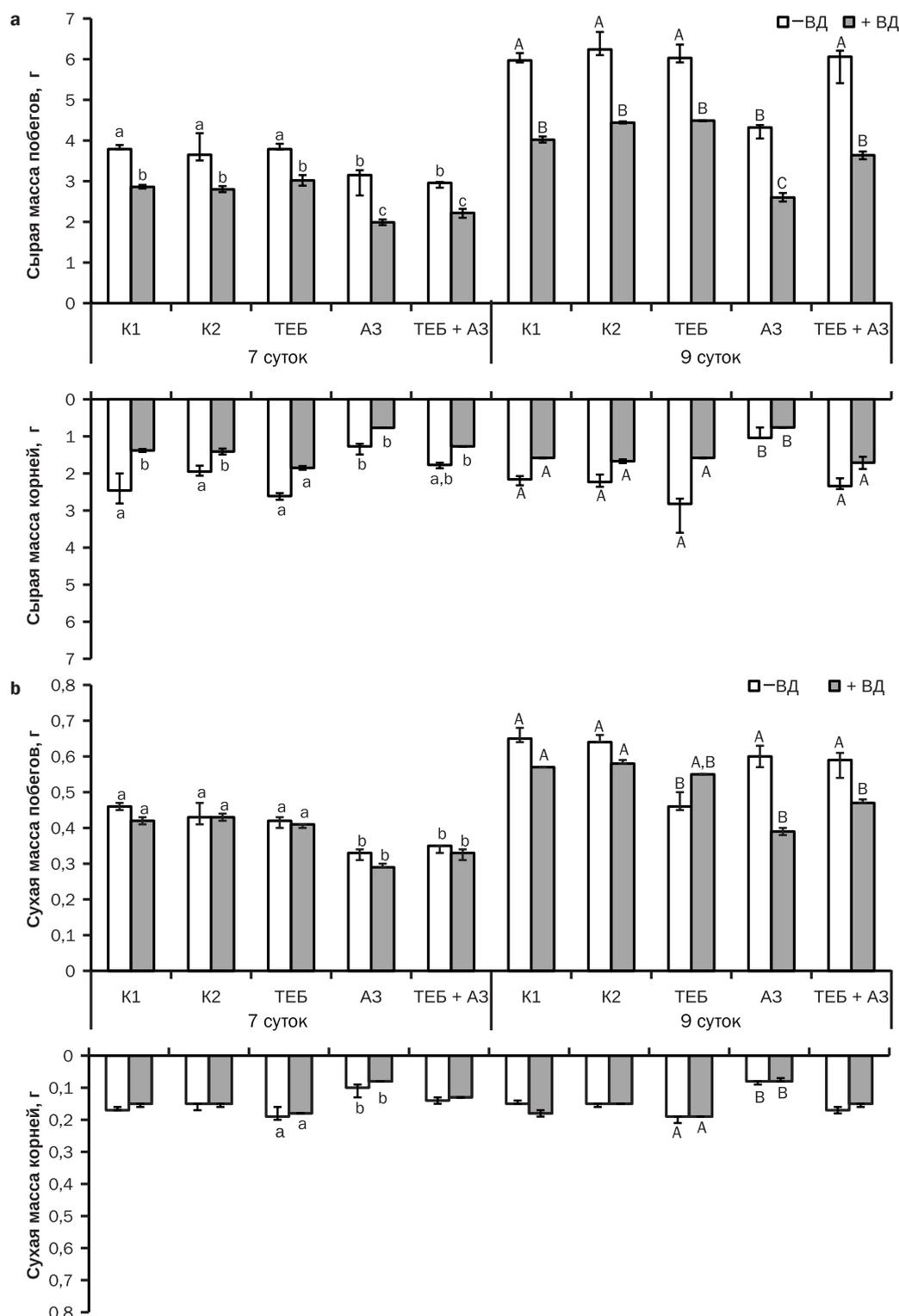


Рис. 4. Влияние фунгицидов и водного дефицита (ВД) на сырую (а) и сухую (б) биомассу побегов и корней проростков озимой пшеницы в возрасте 7 и 9 суток. Сырая и сухая биомасса включают вес 50 проростков. Проростки в возрасте 5 суток переносили на питательный раствор, содержащий 20% ПЭГ 6000, и подвергали стрессу в течение 48 и 96 часов (анализ проводили на 7-е и 9-е сутки роста соответственно). Обозначения те же, что и на рис. 1. Данные представлены в виде медианы [25%; 75%], $n = 3-5$. Разными буквами показаны статистически значимые различия при $P \leq 0,05$ (метод Данна)

Fig. 4. Effect of fungicides and water deficit (ВД) on the wet (a) and dry (b) biomass of shoots and roots of winter wheat seedlings on the 7th and 9th days of growth. Wet and dry biomass include the weight of 50 seedlings. Seedlings at the age of 5 days were transferred to a nutrient solution containing 20% PEG 6000 and subjected to stress for 48 and 96 hours (analysis was carried out on days 7 and 9 of growth, respectively). The designations are the same as in Fig. 1. Data are presented as Me [25%; 75%], $n = 3-5$. Different letters show statistically significant differences at $P \leq 0.05$ (Dunn's method)

фотосинтетических пигментов было выявлено в полевых опытах на яровой пшенице после обработки трехкомпонентным препаратом «Солигор, КЭ», содержащим в том числе тебуконазол, вследствие чего деятельность фотосинтетического аппарата сохранялась дольше [27]. Защитный эффект азоксистробина на фотосинтетическую активность и антиоксидантную способность наблюдали на листовых дисках чая при осмотическом стрессе, вызванном ПЭГ 6000 [17]. Тем не менее в нашей работе не выявлено защитного действия азоксистробина, в отличие от тебуконазола, на растения озимой пшеницы при водном дефиците, создаваемом ПЭГ 6000.

Стимуляция развития корневой системы под действием тебуконазола может быть одним из путей повышения устойчивости озимой пшеницы к дефициту влаги в почве как в период всходов, так и после перезимовки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о существенных различиях в действии тебуконазола и азоксистробина на рост побегов и корней проростков озимой пшеницы как в отсутствии стресса, так и в условиях водного дефицита, создаваемого 20%-м ПЭГ 6000. Тебуконазол в концентрации 2 мг/50 г семян оказывает защитный эффект на растения в условиях

водного дефицита, что прослеживается по развитию корневой системы. Азоксистробин в концентрации 4 мг/50 г семян ингибирует рост побегов и особенно рост корней, не оказывая защитного действия на растения при выращивании на ПЭГ 6000, и даже усиливает отрицательное действие водного дефицита, что проявляется в уменьшении длины побегов. При совместном применении тебуконазола с азоксистробином при обработке семян частично снижается отрицательное действие последнего на рост побегов и корней как в условиях нормальной водообеспеченности, так и при водном стрессе.

Применение тебуконазола при обработке семян озимой пшеницы способствует лучшему росту корней, что проявляется и в условиях водного дефицита и способствует снижению отрицательного воздействия стрессового фактора на корневую систему. Благодаря своему физиологическому эффекту тебуконазол можно рассматривать в качестве перспективного компонента при создании комплексных многофункциональных препаратов для предпосевной подготовки семян, направленной на защиту растений от болезней, вредителей и повышение их устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды, в частности к водному дефициту.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Hof N. Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001. Vol. 45, no. 11. P. 2987–2990. DOI: 10.1128/AAC.45.11.2987-2990.2001.
2. Davis T.D., Steffens G.L., Sankhla N. Triazole plant growth regulators // *Horticultural Reviews*. 1988. Vol. 10. P. 63–105. DOI: 10.1002/9781118060834.ch3.
3. Побежимова Т.П., Корсукова А.В., Дорофеев Н.В., Грабельных О.И. Физиологические эффекты действия на растения фунгицидов триазольной природы // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2019. Т. 9. N 3. С. 461–476. DOI: 10.21285/2227-2925-2019-9-3-461-476. EDN: VLYINU.
4. Щербаков П.А. Ламадор: отличный старт и успешный финиш сельскохозяйственного сезона // *Защита и карантин растений*. 2010. N 3. С. 76–77. EDN: KZXZDX.
5. Грабельных О.И., Полякова Е.А., Корсукова А.В., Забанова Н.С., Бережная Е.В., Любушкина И.В. [и др.]. Разнонаправленные эффекты тебуконазол-содержащего протравителя семян «Бункер» на рост побегов и корней озимой пшеницы // *Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология*. 2020. Т. 34. С. 3–19. DOI: 10.26516/2073-3372.2020.34.3. EDN: PPGIZZ.
6. Gilley A., Fletcher R.A. Relative efficacy of paclobutrazol, propiconazole and tetraconazole as stress protectants in wheat seedlings // *Journal of Plant Growth Regulation*. 1997. Vol. 21. P. 169–175. DOI: 10.1023/A:1005804717016.
7. Rabert G.A., Rajasekar M., Manivannan P. Triazole-induced drought stress amelioration on growth, yield, and pigments composition of *Helianthus annuus* L. (sunflower) // *International Multidisciplinary Research Journal*. 2015. Vol. 5. P. 6–15.
8. Namjoyan S., Rajabi A., Sorooshzadeh A., AghaAlikhani M. The potential of tebuconazole for mitigating oxidative stress caused by limited irrigation and improving sugar yield and root quality traits in sugar beet // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2021. Vol. 162. P. 547–555. DOI: 10.1016/j.plaphy.2021.03.027.
9. Bartlett D.W., Clough J.M., Godwin J.R., Hall A.A., Hamer M., Parr-Dobrzanski B. The strobilurin fungicides // *Pest Management Science*. 2002. Vol. 58, no. 7. P. 649–662. DOI: 10.1002/ps.520.
10. Giuliani M.M., Carucci F., Nardella E., Francavilla M., Ricciardi L., Lotti C., Gatta G. Combined effects of deficit irrigation and strobilurin application on gas exchange, yield and water use efficiency in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) // *Scientia Horticulturae*. 2018. Vol. 233. P. 149–158. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.01.052.
11. Zhang Y.-J., Zhang X., Chen C.-J., Zhou M.-G., Wang H.-C. Effects of fungicides JS399-19, azoxystrobin, tebuconazole and carbendazim on the physiological and biochemical indices and grain yield of winter wheat // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2010. Vol. 98, no. 2. P. 151–157. DOI: 10.1016/j.pestbp.2010.04.007.
12. Liang S., Xu X., Lu Z. Effect of azoxystrobin fungicide on the physiological and biochemical indices and ginsenoside contents of ginseng leaves // *Journal of Ginseng Research*. 2018. Vol. 42, no. 2. P. 175–182. DOI: 10.1016/j.jgr.2017.02.004.
13. Бережная Е.В., Корсукова А.В., Федотова О.А., Дорофеев Н.В., Грабельных О.И. Особенности ростингибирующего эффекта фунгицида азоксистробина и его способность тормозить расход сахаров в проростках озимой пшеницы // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 4. С. 657–665. DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-4-657-665. EDN: VUVSXM.
14. Ali A.A.I., Desoky E.S.M., Rady M.M. Application of azoxystrobin fungicide improves drought tolerance in tomato, via enhancing physio-biochemical and anatomical

feature // International Letters of Natural Sciences. 2019. Vol. 76. P. 34–49. DOI: 10.56431/p-hg2stm.

15. Barányiová I., Klem K. Effect of application of growth regulators on the physiological and yield parameters of winter wheat under water deficit // Plant, Soil and Environment. 2016. Vol. 62, no. 3. P. 114–120. DOI: 10.17221/778/2015-PSE.

16. Filippou P., Antoniou C., Obata T., Van Der Kelen K., Harokopos V., Kanetis L., et al. Kresoxim-methyl primes *Medicago truncatula* plants against abiotic stress factors via altered reactive oxygen and nitrogen species signalling leading to downstream transcriptional and metabolic readjustment // Journal of Experimental Botany. 2016. Vol. 67, no. 5. P. 1259–1274. DOI: 10.1093/jxb/erv516.

17. Chiu Y.-C., Chen B.-J., Su Y.-S., Huang W.-D., Chen C.-C. A leaf disc assay for evaluating the response of tea (*Camellia sinensis*) to PEG-induced osmotic stress and protective effects of azoxystrobin against drought // Plants. 2021. Vol. 10, no. 3. P. 546. DOI: 10.3390/plants10030546.

18. Nason M.A., Farrar J., Bartlett D. Strobilurin fungicides induce changes in photosynthetic gas exchange that do not improve water use efficiency of plants grown under conditions of water stress // Pest Management Science. 2007. Vol. 63, no. 12. P. 1191–1200. DOI: 10.1002/ps.1443.

19. Байбакова Е.В., Нефедьева Е.Э. Изменения интенсивности дыхания проростков пшеницы под действием азоксистробина и регулятора роста // Вестник науки и образования. 2017. Т. 2. N 12. С. 29–32. EDN: ZXIXEL.

20. Санеева Е.А., Зорькина О.В., Нефедьева Е.Э. Исследование фитотоксического действия тебуконазола, флудиоксонила и препаратов на их основе на энергию прорастания и рост проростков пшеницы и горчицы белой // Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. 2022. Т. 14. N 5. С. 166–186. DOI: 10.12731/2658-6649-2022-14-5-166-186. EDN: DNFEMT.

21. Mohsin S.M., Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Parvin K., Fujita M. Exogenous tebuconazole and trifloxystrobin regulates reactive oxygen species metabolism toward mitigating

salt-induced damages in cucumber seedling // Plants. 2019. Vol. 8, no. 10. P. 428. DOI: 10.3390/plants8100428.

22. Mohsin S.M., Hasanuzzaman M., Nahar K., Hossain Md.S., Bhuyan M.H.M.B., Parvin K., Fujita M. Tebuconazole and trifloxystrobin regulate the physiology, antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems in conferring salt stress tolerance in *Triticum aestivum* L. // Physiology and Molecular Biology of Plants. 2020. Vol. 26. P. 1139–1154. DOI: 10.1007/s12298-020-00810-5.

23. Mohsin S.M., Hasanuzzaman M., Parvin K., Hossain Md.S., Fujita M. Protective role of tebuconazole and trifloxystrobin in wheat (*Triticum aestivum* L.) under cadmium stress via enhancement of antioxidant defense and glyoxalase systems // Physiology and Molecular Biology of Plants. 2021. Vol. 27, no. 5. P. 1043–1057. DOI: 10.1007/s12298-021-00983-7.

24. Bayoumi T.Y., Eid M.H., Metwali E.M. Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes // African Journal of Biotechnology. 2008. Vol. 7, no. 14. P. 2341–2352.

25. Lazukin A., Pinchuk M., Korsukova A., Nikiforov A., Romanov G., Stepanova O., Grabelnych O. Comparison of presowing wheat treatments by low-temperature plasma, electric field, cold hardening, and action of tebuconazole-based disinfectant // Applied Sciences. 2022. Vol. 12, no. 13. P. 6447. DOI: 10.3390/app12136447.

26. Побежимова Т.П., Корсукова А.В., Боровик О.А., Забанова Н.С., Дорофеев Н.В., Грабельных О.И. [и др.]. Влияние тебуконазола и тебуконазол-содержащего препарата «Бункер» на функционирование митохондрий озимой пшеницы // Биологические мембраны. 2020. Т. 37. N 3. С. 224–234. DOI: 10.31857/S0233475520020103. EDN: JAQLEF.

27. Зубко Н.Г., Долженко Т.В. Действие фунгицидов на содержание фотосинтетических пигментов в растениях пшеницы яровой // Аграрная наука. 2022. N 12. С. 110–118. DOI: 10.32634/0869-8155-2022-365-12-110-118. EDN: VHQCBI.

REFERENCES

1. Hof H. Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(11):2987-2990. DOI: 10.1128/AAC.45.11.2987-2990.2001.

2. Davis T.D., Steffens G.L., Sankhla N. Triazole plant growth regulators // Horticultural Reviews. 1988;10:63-105. DOI: 10.1002/9781118060834.ch3.

3. Pobezhimova T.P., Korsukova A.V., Dorofeev N.V., Grabelnych O.I. Physiological effects of triazole fungicides in plants. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(3):461-476. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2019-9-3-461-476. EDN: VLYINU.

4. Shcherbakov P.A. Lamador: excellent start and successful finish of an agricultural season. *Zashchita i karantin rastenii*. 2010;(3):76-77. (In Russian). EDN: KZXZDX.

5. Grabelnych O.I., Polyakova E.A., Korsukova A.V., Zabanova N.S., Berezhnaya E.V., Lyubushkina I.V., et al. Differently directional effects of tebuconazole-based disinfectant of seeds “Bunker” on the growth of winter wheat shoots and roots. *Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo*

universiteta. Seriya: Biologiya. Ekologiya = The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology. 2020. T. 34. С. 3–19. (In Russian). DOI: 10.26516/2073-3372.2020.34.3. EDN: PPGIZZ.

6. Gilley A., Fletcher R.A. Relative efficacy of paclobutrazol, propiconazole and tetraconazole as stress protectants in wheat seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation*. 1997;21:169-175. DOI: 10.1023/A:1005804717016.

7. Rabert G.A., Rajasekar M., Manivannan P. Triazole-induced drought stress amelioration on growth, yield, and pigments composition of *Helianthus annuus* L. (sunflower). *International Multidisciplinary Research Journal*. 2015;5:6-15.

8. Namjoyan S., Rajabi A., Sorooshzadeh A., AghaAlikhani M. The potential of tebuconazole for mitigating oxidative stress caused by limited irrigation and improving sugar yield and root quality traits in sugar beet. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2021;162:547-555. DOI: 10.1016/j.plaphy.2021.03.027.

9. Bartlett D.W., Clough J.M., Godwin J.R., Hall A.A., Hamer M., Parr-Dobrzanski B. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*. 2002;58(7):649-662. DOI: 10.1002/ps.520.

10. Giuliani M.M., Carucci F., Nardella E., Francavilla M., Ricciardi L., Lotti C., Gatta G. Combined effects of deficit irrigation and strobilurin application on gas exchange, yield and water use efficiency in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Scientia Horticulturae*. 2018;233:149-158. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.01.052.
11. Zhang Y.-J., Zhang X., Chen C.-J., Zhou M.-G., Wang H.-C. Effects of fungicides JS399-19, azoxystrobin, tebuconazole and carbendazim on the physiological and biochemical indices and grain yield of winter wheat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2010;98(2):151-157. DOI: 10.1016/j.pestbp.2010.04.007.
12. Liang S., Xu X., Lu Z. Effect of azoxystrobin fungicide on the physiological and biochemical indices and ginsenoside contents of ginseng leaves. *Journal of Ginseng Research*. 2018;42(2):175-182. DOI: 10.1016/j.jgr.2017.02.004.
13. Berezhnaya E.V., Korsukova A.V., Fedotova O.A., Dorofeev N.V., Grabelnykh O.I. Growth-inhibiting effect of azoxystrobin and its ability to inhibit sugar consumption in winter wheat sprouts and roots. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):657-665. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-4-657-665. EDN: VUVSXM.
14. Ali A.A.I., Desoky E.S.M., Rady M.M. Application of azoxystrobin fungicide improves drought tolerance in tomato, via enhancing physio-biochemical and anatomical feature. *International Letters of Natural Sciences*. 2019;76:34-49. DOI: 10.56431/p-hg2stm.
15. Barányiová I., Klem K. Effect of application of growth regulators on the physiological and yield parameters of winter wheat under water deficit. *Plant, Soil and Environment*. 2016;62(3):114-120. DOI: 10.17221/778/2015-PSE.
16. Filippou P., Antoniou C., Obata T., Van Der Kelen K., Harokopos V., Kanetis L., et al. Kresoxim-methyl primes *Medicago truncatula* plants against abiotic stress factors via altered reactive oxygen and nitrogen species signalling leading to downstream transcriptional and metabolic readjustment. *Journal of Experimental Botany*. 2016;67(5):1259-1274. DOI: 10.1093/jxb/erv516.
17. Chiu Y.-C., Chen B.-J., Su Y.-S., Huang W.-D., Chen C.-C. A leaf disc assay for evaluating the response of tea (*Camellia sinensis*) to PEG-induced osmotic stress and protective effects of azoxystrobin against drought. *Plants*. 2021;10(3):546. DOI: 10.3390/plants10030546.
18. Nason M.A., Farrar J., Bartlett D. Strobilurin fungicides induce changes in photosynthetic gas exchange that do not improve water use efficiency of plants grown under conditions of water stress. *Pest Management Science*. 2007;63(12):1191-1200. DOI: 10.1002/ps.1443.
19. Baybakova E.V., Nefedieva E.E. Changes in the intensity of wheat respiration under the action of azoxystrobin and growth regulator. *Vestnik nauki i obrazovaniya*. 2017;2(12):29-32. (In Russian). EDN: ZXIXEL.
20. Saneeva E.A., Zorkina O.V., Nefed'eva E.E. Research of the phytotoxic effect of tebuconazole, prothioconazole, fludioxonil and based on them products on the germination power and growth of seedlings of wheat and white mustard. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. 2022;14(5):166-186. (In Russian). DOI: 10.12731/2658-6649-2022-14-5-166-186. EDN: DNFEMT.
21. Mohsin S.M., Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Parvin K., Fujita M. Exogenous tebuconazole and trifloxystrobin regulates reactive oxygen species metabolism toward mitigating salt-induced damages in cucumber seedling. *Plants*. 2019;8(10):428. DOI: 10.3390/plants8100428.
22. Mohsin S.M., Hasanuzzaman M., Nahar K., Hossain Md.S., Bhuyan M.H.M.B., Parvin K., Fujita M. Tebuconazole and trifloxystrobin regulate the physiology, antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems in conferring salt stress tolerance in *Triticum aestivum* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2020;26:1139-1154. DOI: 10.1007/s12298-020-00810-5.
23. Mohsin S.M., Hasanuzzaman M., Parvin K., Hossain Md.S., Fujita M. Protective role of tebuconazole and trifloxystrobin in wheat (*Triticum aestivum* L.) under cadmium stress via enhancement of antioxidant defense and glyoxalase systems. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2021;27(5):1043-1057. DOI: 10.1007/s12298-021-00983-7.
24. Bayoumi T.Y., Eid M.H., Metwali E.M. Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. *African Journal of Biotechnology*. 2008;7(14):2341-2352.
25. Lazukin A., Pinchuk M., Korsukova A., Nikiforov A., Romanov G., Stepanova O., Grabelnykh O. Comparison of presowing wheat treatments by low-temperature plasma, electric field, cold hardening, and action of tebuconazole-based disinfectant. *Applied Sciences*. 2022;12(13):6447. DOI: 10.3390/app12136447.
26. Pobezhimova T.P., Korsukova A.V., Borovik O.A., Zabanova N.S., Dorofeev N.V., Grabelnykh O.I., et al. The influence of tebuconazole and tebuconazole-based disinfectant "Bunker" on the functioning of winter wheat mitochondria. *Biologicheskie membrany*. 2020;37(3):224-234. (In Russian). DOI: 10.31857/S0233475520020103. EDN: JAQLEF.
27. Zubko N.G., Dolzhenko T.V. The effect of fungicides on the content of photosynthetic pigments in spring wheat plants. *Agrarnaya nauka = Agrarian science*. 2022;(12):110-118. (In Russian). DOI: 10.32634/0869-8155-2022-365-12-110-118. EDN: VHQCBI.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Побежимова Тамара Павловна,
д.б.н., доцент, главный научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
pobezhimova@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9581-0123>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Tamara P. Pobezhimova,
Dr. Sci. (Biology), Associate Professor,
Chief Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
pobezhimova@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9581-0123>

Бережная Екатерина Владиславовна,
ведущий инженер,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
ekaterina809@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4561-9600>

Полякова Елизавета Алексеевна,
аспирант, ведущий инженер,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
polyakova.elizaveta727@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4830-5888>

Корсукова Анна Викторовна,
к.б.н., младший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
avkorsukova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-8941-0772>

Забанова Наталья Сергеевна,
к.б.н., доцент,
старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
доцент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
pavnatser@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2296-2326>

Любушкина Ирина Викторовна,
к.б.н.,
научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
доцент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
ostrov1873@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6692-4482>

Степанов Алексей Владимирович,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
saw33@list.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0456-3690>

Ekaterina V. Berezhnaya,
Lead Engineer,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
ekaterina809@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4561-9600>

Elizaveta A. Polyakova,
Postgraduate Student, Lead Engineer,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
polyakova.elizaveta727@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4830-5888>

Anna V. Korsukova,
Cand. Sci. (Biology), Junior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
avkorsukova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-8941-0772>

Natalya S. Zabanova,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
Associate Professor,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
pavnatser@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2296-2326>

Irina V. Lyubushkina,
Cand. Sci. (Biology),
Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
Associate Professor,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
ostrov1873@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6692-4482>

Alexey V. Stepanov,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
saw33@list.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0456-3690>

Дорофеев Николай Владимирович,
к.б.н., заместитель директора
по прикладной и инновационной работе,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
nicdoro@gmail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0005-0134>

Грабельных Ольга Ивановна,
д.б.н., доцент,
главный научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
профессор,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
✉ grolga@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4220-6608>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 21.10.2023.
Одобрена после рецензирования 10.11.2023.
Принята к публикации 30.11.2023.

Nikolay V. Dorofeev,
Cand. Sci. (Biology), Vice-Director,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
nicdoro@gmail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0005-0134>

Olga I. Grabelnych,
Dr. Sci. (Biology), Associate Professor,
Chief Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
Professor,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
✉ grolga@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4220-6608>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

Information about the article

The article was submitted 21.10.2023.
Approved after reviewing 10.11.2023.
Accepted for publication 30.11.2023.

Научная статья
УДК 631.53.027.3
EDN: HLKRDG
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-602-610



Изменение всхожести, содержания протеина и клейковины в зерновках твердой и мягкой пшеницы после действия импульсного давления и длительного хранения

Я.И. Храмова*, Е.Э. Нефедьева✉*, С.Л. Белопухов**,
И.И. Дмитриевская**, В.Н. Храмова*

*Волгоградский государственный технический университет, г. Волгоград, Российская Федерация
**Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва, Российская Федерация

Аннотация. Целью представленного исследования являлось выявление особенностей старения зерновок твердой и мягкой пшеницы без обработки и после обработки их импульсным давлением, создаваемым ударной волной. Зерно обрабатывали импульсным давлением 11 и 29 МПа. Через один месяц и через три года зерновки были отсортированы на стекловидные и мучнистые. Всхожесть контрольных зерновок мягкой пшеницы после хранения снизилась, а после обработки импульсным давлением и хранения она превышала контроль. Всхожесть контрольных зерновок твердой пшеницы с мучнистым эндоспермом после хранения снизилась в большей степени, чем зерновок со стекловидным эндоспермом. Обработка импульсным давлением привела к снижению всхожести зерновок со стекловидным эндоспермом. В зерновках твердой пшеницы в контроле содержание протеина после длительного хранения не изменилось. Импульсное давление способствовало снижению содержания протеина при хранении. У зерновок мягкой пшеницы содержание протеина после хранения снизилось в зерновках с мучнистым эндоспермом. Обработка импульсным давлением способствовала лучшему сохранению протеина в этих зерновках. Таким образом, зерновки твердой пшеницы и зерновки мягкой пшеницы со стекловидным эндоспермом в меньшей степени были подвержены старению по сравнению с зерновками мягкой пшеницы и зерновками с мучнистым эндоспермом соответственно. Импульсное давление повреждало стекловидный эндосперм и ускоряло старение семян. Оно также способствовало длительному хранению зерновок мягкой пшеницы без существенной потери жизнеспособности. Возможно применение обработки зерна мягкой пшеницы для продления срока хранения.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, ближняя инфракрасная спектроскопия, протеин, клейковина, старение семян

Для цитирования: Храмова Я.И., Нефедьева Е.Э., Белопухов С.Л., Дмитриевская И.И., Храмова В.Н. Изменение всхожести, содержания протеина и клейковины в зерновках твердой и мягкой пшеницы после действия импульсного давления и длительного хранения // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 602–610. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-602-610. EDN: HLKRDG.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Changes in the germination and content of protein and gluten in the caryopses of hard and soft wheat under pulse pressure and prolonged storage conditions

Yaroslavna I. Khramova*, Elena E. Nefed'eva✉*, Sergey L. Belopukhov**,
Inna I. Dmitrevskaya**, Valentina N. Khramova*

*Volograd State Technical University, Volograd, Russian Federation

**Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russian Federation

© Храмова Я.И., Нефедьева Е.Э., Белопухов С.Л., Дмитриевская И.И., Храмова В.Н., 2023

Abstract. The study aims to identify the aging characteristics of hard and soft wheat caryopses without treatment and following treatment with pulse pressure created by a shock wave. The grain was treated with pulse pressures of 11 and 29 MPa. After one month and after three years, the caryopses were sorted into vitreous and floury types. The germination of control soft wheat caryopses decreased after storage, while after pulse pressure treatment and storage, it exceeded that of the control. The germination of control hard wheat caryopses with floury endosperm decreased after storage to a greater extent than that of caryopses with vitreous endosperm. Pulse pressure treatment reduced the germination of caryopses with vitreous endosperm. No change was observed in the protein content of control hard wheat caryopses following prolonged storage. In this case, pulse pressure contributed to the reduction in protein content during storage. The protein content of soft wheat caryopses with floury endosperm decreased after storage. In these caryopses, pulse pressure treatment contributed to better protein retention. Thus, the caryopses of hard wheat and soft wheat with vitreous endosperm were less susceptible to aging as compared to the caryopses of soft wheat and caryopses with floury endosperm, respectively. Pulse pressure damaged the vitreous endosperm, accelerating seed aging. It also contributed to the long-term storage of soft wheat caryopses without a significant loss of viability. Thus, it is possible to treat soft wheat grain to extend its shelf life.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, near-infrared spectroscopy, protein, gluten, seed aging

For citation: Khramova Ya.I., Nefed'eva E.E., Belopukhov S.L., Dmitrevskaya I.I., Khramova V.N. Changes in the germination and content of protein and gluten in the caryopses of hard and soft wheat under pulse pressure and prolonged storage conditions. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):602-610. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-602-610. EDN: HLKRDG.

ВВЕДЕНИЕ

При хранении семена подвергаются процессам старения, что снижает их жизнеспособность и вызывает ухудшение всхожести. Физиологическое ухудшение качества семян во время хранения тесно связано с прорастанием и последующим урожаем зерна [1]. Продолжительность хранения семян зависит от внутренних (наследственных, морфологических, физиологических) и внешних (зараженность патогенами, условия хранения) факторов [2].

Неспособность семян защититься от старения приводит к постепенному разложению хранящегося вещества, нарушению обмена веществ и энергии и в конечном итоге к потере всхожести [1]. Старение семян или их повреждение под действием перечисленных факторов часто объясняют переходом биополимеров из стеклообразного состояния в иные фазово-агрегатные состояния, гидролизом белков и углеводов, а также окислительными реакциями с участием кислорода воздуха и его активных форм [3, 4]. В воздушно-сухих семенах, находящихся в нежизнеспособном состоянии, преобладают неферментативные реакции, не требующие активности ферментов в присутствии большого количества воды [1, 5]. Для старения семян в процессе хранения характерны некоторые физиологические и биохимические изменения, в частности накопление токсичных метаболитов и ингибиторов роста [1].

Понижение жизнеспособности семян в ходе хранения часто связано с разрушением белков и углеводов. При оптимальных условиях хранения содержания этих веществ в семенах изменяется незначительно. При длительном хранении в семенах снижается содержание белка [2]. Денатурация белков семени нарушает обмен веществ при прорастании, в результате уменьшается всхожесть семян [6]. В старение семян вносят вклад гликозилирование белков в результате образования глюкозы – продукта неферментативного гидролиза крахмала [7] – и карбонилирование белков при участии активных форм кислорода [8]. Известно несколько путей карбонилирования белка, например, конъюгация с реак-

ционноспособными карбонильными формами и/или прямое окислительное воздействие, катализируемое металлом, на аминокислотные остатки. Дисфункциональные карбонилированные белки более склонны к деградации или образованию агрегатов, когда протеолитический механизм ингибируется, что наблюдается при старении. В результате искусственного старения в зерновках пшеницы было зафиксировано снижение общего содержания белка, углеводов, активности α -амилазы и высокая электропроводность [9].

Ценность зерна определяется количеством и качеством клейковины [10]. В литературе нет однозначных сведений об изменении количества клейковины и ее свойств в процессе хранения зерна [11].

Импульсное давление (ИД), создаваемое ударной волной, может оказывать конструктивное или разрушительное воздействие в зависимости от типа испытуемого материала, физических и химических характеристик образца, приложенного давления и температуры [12]. Обработка семян растений с применением ударной волны позволяет увеличить всхожесть семян, активировать рост проростков [12] и повысить урожай растений [13, 14], а также продлить срок хранения семян [4, 15].

ИД 11 МПа способствует повышению устойчивости растений и урожая на 15–25% за счет активизации физиологических процессов; динамика роста и других физиологических показателей не изменяется. ИД 29 МПа приводит к состоянию стресса, вызывает изменения в структуре партии семян, изменяет динамику роста, способствует оттоку запасных веществ в семена и плоды, в результате чего урожай возрастает в 2–3 раза [14].

Целью проведенной работы было выявление изменения содержания протеина, клейковины и индекса деформации клейковины (ИДК) зерновок твердой и мягкой пшеницы в процессе хранения без обработки и после обработки ИД, создаваемым ударной волной.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования служили два сорта пшеницы. Сорт яровой мягкой пшеницы Саратовская 73 создан в Федеральном аграрном научном центре Юго-Востока.

Разновидность – Graecum. Зерно данного сорта белое, крупное, яйцевидной формы. Бороздка зерна по ширине средняя, неглубокая. Сорт среднепоздний, вегетационный период – 87 дней. Зерновая продуктивность по сравнению со стандартом является высокой, качество зерна высокое. Максимальная урожайность отмечена на уровне 47,4 ц/га.

Сорт яровой твердой пшеницы Саратовская золотистая также создан в Федеральном аграрном научном центре Юго-Востока. Разновидность – Leucurum. Зерно крупное, белое, полуудлиненной формы с довольно глубокой бороздкой, основание зерна голое, окраска его белая с выраженным янтарным оттенком, по консистенции эндосперма зерно стекловидное. Сорт средне-спелый, высокоурожайный. Максимальная урожайность в производственных условиях достигает 35–40 ц/га.

Для обработки семян использовали ударную волну, фронт которой представляет собой область резкого скачка давления, плотности и температуры, распространяющуюся со сверхзвуковой скоростью. ИД возникает при прохождении ударной волны в среде. Оно представляет собой мгновенное сжатие, продолжающееся 14–25 мкс. Семена обрабатывали ИД 11 и 29 МПа, создаваемым ударной волной, распространяющейся в водной среде [13]. ИД на фронте ударной волны рассчитывали по формуле

$$P = 53,3 \times (Q^{1/3}/R)^{1,13},$$

где P – давление, МПа; Q – масса заряда взрывчатого вещества, кг; R – расстояние от центра взрыва до поверхности семян, м. На фронте ударной волны резко возрастают давление, плотность и температура среды [13].

Обработку семян проводили в устройстве, схема которого показана на рисунке. На дне стального контейнера (1) размещали кассету из пористого материала с сетчатой крышкой (2), внутри которой находились семена массой до 500 г (3). Контейнер заполняли водой (4) и в толще воды на глубине 7–13 см размещали заряд водостойкого взрывчатого вещества (5) с массой Q на расстоянии R от поверхности семян в соответствии с формулой. Осуществляли детонацию заряда электродетонатором (7). После проведенных операций семена извлекали из кассет. Семена контрольной партии погружали в воду на время, в течение которого проводили обработку экспериментальных партий. Все семена в одинаковых условиях сушили до воздушно-сухого состояния при температуре 20 °С. Семена, прошедшие обработку, хранили в упаковке из бумаги или ткани в сухом темном месте при комнатной температуре.

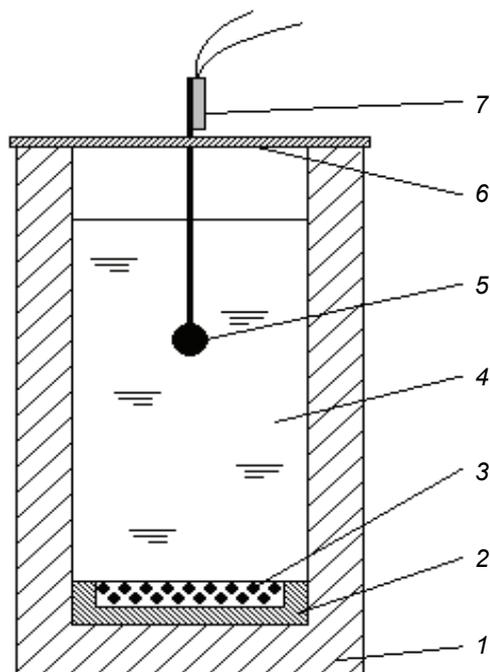


Схема устройства для обработки семян импульсным давлением

Diagram of a device for processing seeds by impulse pressure

Через один месяц (2018 г.) и через три года (2021 г.) после обработки зерновки были отсортированы на дифаноскопе на стекловидные (партия С) и мучнистые (партия М). В каждой партии при помощи анализатора Spectra Star 2600 XT-R, работающего в ближней инфракрасной области спектра, определяли содержание протеина, клейковины, а также ИДК (ГОСТ ISO 12099-2017). Анализы выполняли в учебно-научном центре коллективного пользования «Сервисная лаборатория комплексного анализа химических соединений» Российского государственного аграрного университета – МСХА им. К.А. Тимирязева. Эксперименты проводили в трехкратной повторности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Были обнаружены изменения всхожести зерновок пшеницы непосредственно после обработки ИД [14], а также после хранения в течение трех лет. Результаты исследования приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, по исходной всхожести контрольные зерновки яровой мягкой пшеницы соот-

Таблица 1. Влияние обработки импульсным давлением и хранения на всхожесть пшеницы, %

Table 1. Effect of impulse pressure treatment and storage on wheat germination, %

Год	Контроль		Импульсное давление 11 МПа		Импульсное давление 29 МПа	
	Партия М	Партия С	Партия М	Партия С	Партия М	Партия С
Яровая мягкая пшеница Саратовская 73						
2018	95,5±0,5	93,5±0,5	89,0±1,0*	88,5±1,5*	74,5±4,5*	73,0±3,0*
2021	20,0±6,7	26,6±0,5	56,8±3,3*	50,0±10,0	66,7±13,3*	90,0±10,0*
Яровая твердая пшеница Саратовская золотистая						
2018	94,0±1,0	97,5±0,5	96,5±0,5	86,5±2,5*	82,0±3,0*	63±2,0*
2021	53,4±13,3	76,7±10,0	63,3±3,3	70,0±10,0	20,0±12,7	20,0±6,7*

Примечание. $M \pm m$; $n = 4$; * – P_{05} .

ветствовали классу РС-ЭС-ОС (свыше 92%) по ГОСТ 52325-2005. После хранения всхожесть контрольных зерновок упала в 4,8 и 3,5 раза у зерна с мучнистым и стекловидным эндоспермом соответственно. Обработка ИД снизила всхожесть зерновок обоого типа, причем степень влияния ИД зависела от его величины. Через три года после воздействия ИД 11 МПа всхожесть зерновок с мучнистым эндоспермом превышала контрольные значения в 2,8 раза. Под действием ИД 29 МПа всхожесть также значительно превышала контроль, а у стекловидных зерновок возросла даже по сравнению с всхожестью через месяц после обработки. По исходной всхожести контрольные зерновки яровой твердой пшеницы (см. табл. 1) соответствовали классу РС-ЭС-ОС (свыше 90%) по ГОСТ 52325-2002. После трехлетнего хранения всхожесть контрольных зерновок с мучнистым эндоспермом была ниже на 30,4%, чем у зерновок со стекловидным эндоспермом. Обработка ИД 11 МПа не способствовала изменению всхожести зерновок с мучнистым эндоспермом, но привела к небольшому снижению всхожести зерновок со стекловидным эндоспермом. ИД 29 МПа способствовало снижению всхожести, особенно у зерновок со стекловидным эндоспермом (на 35,4%). Через три года после обработки ИД 11 МПа всхожесть зерновок твердой пшеницы с мучнистым и стекловидным эндоспермом существенно не отличалась от контроля. Под действием ИД 29 МПа всхожесть резко упала (в 3,8 раза у зерновок со стекловидным эндоспермом).

Изменения всхожести могут быть связаны с изменением содержания запасных веществ в зерновках пшеницы. Обнаружены различия в содержании протеина в зерновках пшеницы двух сортов (табл. 2). В частности, в зерновках твердой пшеницы изначально (2018 г.) содержание протеина в мучнистых и стекловидных зерновках не отличалось и составляло около 12%. В зерновках мягкой пшеницы изначально содержание протеина в мучнистых и стекловидных зерновках было несколько меньше, чем в зерновках твердой пшеницы. Обработка ИД 11 МПа (2018 г.) не оказала статистически значимого влияния на содержание протеина в зерновках пшеницы обоих сортов. ИД 29 МПа (2018 г.) не повлияло на содержание протеина в зерновках мягкой пшеницы, но способствовало снижению протеина в зерновках твердой пшеницы. Это явление могло быть связано с хрупкостью стекловидного эндосперма и дроблением биополимеров при прохождении ударной волны высокого давления.

Белки подвержены неферментативному гидролизу в процессе хранения семян. При хранении происходят

термодинамически разрешенные реакции, которые протекают с выделением энергии. В частности, в семенах это могут быть реакции распада (гидролиза) запасных веществ. Содержание протеина через три года хранения изменилось (см. табл. 2). Зерновки твердой и мягкой пшеницы реагировали на ИД и последующее хранение по-разному.

В зерновках твердой пшеницы сорта Саратовская золотистая (см. табл. 2) в контроле содержание протеина после трех лет хранения не изменилось как в мучнистых, так и в стекловидных зерновках. Плотная структура эндосперма и преобладание стекловидного состояния биополимеров противодействовало диффузии газов и воды и, как следствие, неферментативному гидролизу. ИД 11 МПа способствовало снижению содержания протеина на 11,5 и 20,0% в мучнистых и стекловидных зерновках пшеницы соответственно за три года хранения. Стекловидное состояние эндосперма характеризуется хрупкостью; рост микротрещин, возникших при обработке зерновок ИД, продолжался в течение срока хранения. Отмечено снижение стекловидности зерна твердой пшеницы после обработки ИД [4]. Эти факторы могли способствовать разрыхлению эндосперма и ускорению реакций неферментативного гидролиза протеина. ИД 29 МПа оказало противоположное действие – непосредственно после обработки в результате мощного сдвигового и компактизирующего воздействия, разрывающего молекулы биополимеров, снизилось содержание протеина, определяемое по количеству пептидных связей. В ходе дальнейшего хранения содержание протеина не изменилось. Ранее было показано, что снижение стекловидности зерна твердой пшеницы после обработки ИД и хранения привело к ухудшению качества зерна и проростков при хранении [4].

У мягкой пшеницы сорта Саратовская 73 (см. табл. 2) содержание протеина в контроле после трех лет хранения снизилось на 24 и 16% в зерновках с мучнистым и стекловидным эндоспермом соответственно. Наши данные соответствуют литературным данным о том, что стекловидное состояние препятствует распаду белка и, следовательно, продляет жизнь семян [3]. Содержание протеина в меньшей степени изменилось у зерновок твердой пшеницы по сравнению с зерновками мягкой пшеницы, у зерновок со стекловидным эндоспермом по сравнению с зерновками с мучнистым эндоспермом. Обработка ИД 11 и 29 МПа способствовала лучшему сохранению протеина в зерновках с мучнистым эндоспермом; в зерновках со стекловидным эндоспермом после обработки ИД разрушение протеина было выражено в большей степени по сравнению с контролем. Муч-

Таблица 2. Влияние обработки импульсным давлением и хранения на содержание протеина в зерновках пшеницы, %

Table 2. Effect of impulse pressure treatment and storage on the protein content in wheat grains, %

Год	Контроль		Импульсное давление 11 МПа		Импульсное давление 29 МПа	
	Партия М	Партия С	Партия М	Партия С	Партия М	Партия С
Яровая мягкая пшеница Саратовская 73						
2018	9,17±0,24	11,93±0,31	9,79±0,28*	11,98±0,34	9,50±0,27*	11,90±0,36*
2021	7,01±0,18	10,04±0,25	8,67±0,23*	8,11±0,2*	9,43±0,26*	9,15±0,22*
Яровая твердая пшеница Саратовская золотистая						
2018	12,41±0,33	12,78±0,34	12,20±0,32	13,03±0,35	11,21±0,30	11,06±0,29*
2021	12,65±0,32	12,52±0,3	10,77±0,27*	10,37±0,25*	10,64±0,27*	10,57±0,26*

Примечание. М±m; n = 3; * – P₀₅.

нистая структура компактизировалась под действием ИД, на что указывает линейное увеличение содержания стекловидного вещества в семенах мягкой пшеницы [4].

Обработка зерна мягкой пшеницы ИД увеличила их всхожесть, рост и качество проростков после длительного хранения. ИД увеличивало стекловидность эндосперма семян. Улучшение было обусловлено переходом семян из аномального состояния в нормальное, что было более выражено после действия ИД 11 МПа [4]. В партии семян выделяют фракции, отличающиеся по качеству: фракцию I – сильные семена, фракцию II – ослабленные семена и фракцию III – мертвые семена [7]. Семена этих фракций отличаются по влажности, содержанию растворимых сахаров и другим признакам. Семена фракции I формируют нормальные проростки, имеющие (у пшеницы) не менее двух нормально развитых корешков размером более длины семени и росток размером не менее половины его длины с просматривающимися первичными листочками, занимающими не менее половины длины колеоптиля. Семена фракции II формируют аномальные проростки, имеющие одно из следующих нарушений в развитии: зародышевых корешков нет, их меньше установленной нормы либо они короткие, прекратившие рост, слабые, закрученные, водянистые; колеоптиль пустой, имеет трещину, короче листьев, деформированный, отсутствует; первичные листочки занимают меньше половины колеоптиля или обесцвечены, раздроблены или расщеплены, веретенообразные, водянистые.

В процессе хранения происходит перемещение семян из фракции I во фракцию II. У семян фракции II отмечено увеличение содержания глюкозы по сравнению с семенами фракции I. Уменьшение уровня глюкозы за счет аминокарбонильной реакции, сопровождающей естественное старение при хранении, в семенах фракции II переводит их в категорию «улучшенных» семян с более высокой всхожестью. Это явление способствует временному увеличению всхожести семян в ходе старения [7].

Обработка зерна мягкой пшеницы ИД увеличила их всхожесть, рост и качество проростков после длительного хранения. ИД увеличивало стекловидность

эндосперма семян. Вероятно, это было обусловлено переходом семян из фракции I во фракцию II, что было более выражено после действия ИД 11 МПа [4].

Клейковина представляет собой комплекс белков, содержащий также углеводы, липиды и минеральные вещества. Клейковинные белки формируются путем агрегации отдельных молекул белка с помощью водородных, дисульфидных, ионных (электростатических) связей [10]. В процессе созревания в зерне и муке изменяются количество и качество клейковины, благодаря этому процессу она приобретает высокие качественные показатели¹. Показано, что массовая доля клейковины в течение хранения до одного года имела тенденцию к увеличению [12], а через два года наблюдалось снижение количества и качества клейковины¹.

Из данных табл. 3 видно, что содержание клейковины и динамика его изменения в зерновках твердой и мягкой пшеницы отличаются.

Исходное содержание клейковины (см. табл. 3, 2018 г.) в контрольных зерновках твердой пшеницы сорта Саратовская золотистая с мучнистым эндоспермом и в зерновках со стекловидным эндоспермом не различалось. Обработка ИД 11 МПа способствовала увеличению содержания клейковины в зерновках с мучнистым эндоспермом на 8% и снижению содержания клейковины в зерновках со стекловидным эндоспермом на 10%. Данное явление можно объяснить компактизацией мучнистого вещества и разломом биополимеров в стекловидном состоянии. Обработка ИД 29 МПа не способствовала существенному увеличению содержания клейковины в зерновках с мучнистым эндоспермом (8%), но привела к увеличению содержания клейковины в зерновках со стекловидным эндоспермом на 15%. Поскольку клейковина представляет собой комплекс веществ, а при интенсивной механической обработке зерна для получения пшеничной муки клейковина укрепляется¹, такое явление может быть связано с происходящими процессами сжатия под действием ИД.

В процессе хранения содержание клейковины (см. табл. 3, 2021 г.) в контрольных зерновках твердой пшеницы с мучнистым эндоспермом снизилось на 7%,

Таблица 3. Влияние обработки импульсным давлением и хранения на содержание клейковины, %, а также индекс деформации клейковины в зерновках пшеницы

Table 3. Effect of impulse pressure treatment and storage on gluten content, %, and gluten deformation index in wheat grains

Год	Контроль		Импульсное давление 11 МПа		Импульсное давление 29 МПа	
	Партия М	Партия С	Партия М	Партия С	Партия М	Партия С
Яровая мягкая пшеница Саратовская 73						
2018	13,90±0,34	18,58±0,48	13,16±0,33	15,94±0,40*	14,35±0,35	19,59±0,49
2021	10,76±0,27	13,72±0,35	15,58±0,41*	13,49±0,34	14,53±0,37*	15,35±0,39*
Индекс деформации клейковины						
2021	78,83±2,10	79,01±2,09	82,5±2,20	81,92±2,18	67,59±1,96*	78,83±2,11
Яровая твердая пшеница Саратовская золотистая						
2018	19,20±0,48	19,78±0,50	20,76±0,53	17,88±0,46*	19,79±0,49	22,77±0,58*
2021	17,81±0,43	13,80±0,33	15,26±0,38*	14,08±0,36	15,48±0,38*	13,96±0,36
Индекс деформации клейковины						
2021	79,08±2,11	81,94±2,18	81,1±2,15	81,76±2,18	79,34±2,13	80,65±2,18

Примечание. $M \pm m$; $n = 3$; * – P_{05} .

¹Кошаев А.Г., Дмитренко С.Н., Жолобова И.С. Биохимия сельскохозяйственной продукции: учеб. пособие для вузов. СПб.: Лань, 2018. 388 с.

в зерновках со стекловидным эндоспермом – на 30%. После обработки ИД и хранения содержание клейковины в зерновках с мучнистым эндоспермом было ниже, чем в соответствующих зерновках в контроле, а в зерновках со стекловидным эндоспермом соответствовало контролю. Отсутствовала корреляция между динамикой изменения содержания белка и клейковины в зерновках твердой пшеницы рассматриваемого сорта.

Исходное содержание клейковины (см. табл. 3, 2018 г.) в контрольных зерновках мягкой пшеницы сорта Саратовская 73 с мучнистым эндоспермом было на 25% ниже, чем в зерновках со стекловидным эндоспермом. После обработки ИД 11 МПа содержание клейковины в зерновках с мучнистым эндоспермом не изменилось, а в зерновках со стекловидным эндоспермом оно снизилось на 14,2%. Указанное явление может быть обусловлено расколами биополимеров, находящихся в стекловидном состоянии. После обработки ИД 29 МПа содержание клейковины в зерновках с мучнистым и стекловидным эндоспермом существенно не изменилось.

Известно, что растворимые сахара оказывают влияние на свойства клейковины. Экстрагируемый водой арабиноксилан может улучшить характеристики клейковины, в частности вязкоупругость клейковины при нагревании [16]. Накопление растворимых продуктов неферментативного гидролиза полисахаридов в процессе старения [7] может оказать влияние на свойства клейковины зерна. Свойства клейковины зависят от особенностей ее состава, структуры, способа обработки, pH, температуры, присутствия углеводов, липидов и т. д. [17].

ИДК зерновок пшеницы обоих сортов после трехлетнего хранения (см. табл. 3) существенно не изменялся. Единственным исключением являлось снижение ИДК у зерновок мягкой пшеницы с мучнистым эндоспермом, обработанных ИД 29 МПа.

Причины изменений свойств биополимеров зерновок связаны как со старением, так и с эффектами, возникающими после прохождения ударной волны в твердом веществе семени. Последствия прохождения ударной волны через вещество могут быть следующими: раздробление материала, разрушение кристаллической решетки, распад сложных веществ на более простые, полимеризация мономеров. Известно, что после прохождения ударных волн аминокислоты превращаются в полипептиды. Полимеры, в свою очередь, могут частично распадаться до олигомеров и мономеров, вулканизироваться (некоторые каучуки), претерпевать структурные изменения, уменьшение растворимости и изменение цвета². Давление ускоряет реакции, идущие с уменьшением объема. При прохождении ударной волны в твердом теле возникают напряжения и сдвиговые деформации, время развития которых составляет 0,1 мкс, что меньше времени прохождения ударной волны (14–25 мкс). Вещества претерпевают физико-химические превращения, вследствие которых их свойства после прохождения ударной волны значительно отличаются от изначальных свойств при нормальных условиях [18].

Семена в воздушно-сухом состоянии не осуществляют ферментативные и репарационные превращения, так как находятся в состоянии гипо- и криптобиоза (вынужденного или физиологического покоя). Физические воздействия не могут непосредственно повлиять на их жизнедеятельность, но оставляют скрытые повреждения, которые реализуются при жизнедеятельном состоянии семян [14]. При обработке ИД в семени образуются повреждения, которые продолжают развиваться в дальнейшем при хранении. Эти эффекты могут быть связаны с дроблением, появлением трещин, которые будут продолжать увеличиваться в процессе хранения, или фазовыми переходами полимеров [19]. Возможно также смещение химического равновесия неферментативных превращений, идущих с уменьшением влажности.

Ударные волны, возникающие при обмолоте зерна, проходят последовательно через каждый слой клеток оболочки и уходят через ткани эндосперма к геометрическому центру зерна. Также последовательно происходит релаксация упругих тканей оболочки. При этом пластичные ткани остаются деформированными, а упругие возвращаются в первоначальное положение. В пределах одного слоя клеток релаксация упругих тканей в различных точках поверхности контакта по-разному растягивается во времени, что связано с разной степенью приближения к границе упругости [20].

Биополимеры в семенах присутствуют в кристаллическом и аморфном фазово-агрегатных состояниях³. Формами аморфного состояния являются вязкотекучее, эластичное и стеклообразное состояния. Соотношение веществ в стеклообразном и прочих состояниях определяет стекловидность эндосперма, которая, в свою очередь, характеризуется прочностью связи крахмала и белка. Стекловидное зерно более устойчиво к механическим воздействиям, но характеризуется хрупкостью. Релаксационные переходы из одного аморфного состояния в другое зависят от температуры и давления³. В частности, испытывая объемное сжатие с давлением стеклования, полимер переходит в стеклообразное состояние. Величина давления стеклования зависит от скорости воздействия и температуры³. Минимальное время релаксации составляет $10^{-2} \dots 10^{-3}$ мкс, что существенно меньше времени прохождения ударной волны. Стеклообразные полимеры имеют бесконечно большие времена релаксации, что затрудняет их переход в другие состояния в ударной волне, но не препятствует формированию трещин. Известно, что переход биополимеров в стеклообразное состояние продляет время хранения семян без потери жизнеспособности [3], поскольку при нормальных условиях переход из стеклообразного состояния в другие фазово-агрегатные состояния происходит крайне медленно. Следовательно, оказывая влияние на параметры стеклообразного состояния биополимеров семян путем обработки ИД, мы способствуем изменениям биополимеров и параметров выхода из состояния покоя. В результате развивается последствие ИД у зерновок.

²Ахметов Н.С. Общая и неорганическая химия: учебник для вузов. СПб.: Лань, 2014. 744 с.

³Кулезнев В.Н., Шершнева В.А. Химия и физика полимеров: учебник для вузов. СПб.: Лань, 2022. 368 с.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Зерновки сортов твердой и мягкой пшеницы реагировали на ИД и длительное хранение по-разному. Зерновки твердой пшеницы и зерновки твердой и мягкой пшеницы со стекловидным эндоспермом были подвержены старению в меньшей степени, чем зерновки мягкой пшеницы и зерновки с мучнистым эндоспермом соответственно, что выражалось в лучшем сохранении всхожести и более высоком содержании протеина после хранения. Вероятно, компактирование биополимеров зерна в ударной волне способствовало замедлению реакций старения, связанных с диффузией паров воды

и кислорода и разрушением протеина, и продлеvalo жизнеспособность зерновок. С другой стороны, возможно, ИД способствовало образованию микроповреждений и ускоряло старение и распад протеина в хрупком стекловидном эндосперме. В то же время ИД способствовало сохранению всхожести и содержания протеина в зерновках мягкой пшеницы, особенно с мучнистым эндоспермом. Можно рекомендовать применение обработки зерновок мягкой пшеницы для продления срока хранения, в том числе для хранения ценного и коллекционного зерна.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Lv Y., Zhang S., Wang J., Hu Y. Quantitative proteomic analysis of wheat seeds during artificial ageing and priming using the isobaric tandem mass tag labeling // PLoS ONE. 2016. Vol. 11, no. 9. P. e0162851. DOI: 10.1371/journal.pone.0162851.
2. Мамедова С.А., Бабаева М.А. Оценка стрессоустойчивости генотипов синтетической пшеницы японского происхождения // Успехи современного естествознания. 2022. N 2. С. 14–19. DOI: 10.17513/use.37772. EDN: GWKLM1.
3. Bernal-Lugo I., Leopold A.C. Changes in soluble carbohydrates during seed storage // Plant Physiology. 1992. Vol. 98, no. 3. P. 1207–1210. DOI: 10.1104/pp.98.3.1207.
4. Nefedieva E.E., Khramova Ya.I., Khramova V.N., Gorlov I.F., Lysak V.I., Slozhenkina M.I. Dependence of germination of wheat grains after the treatment by impulse pressure and long-term storage on the vitreousness of endosperm // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2021. Vol. 677. P. 032078. DOI: 10.1088/1755-1315/677/3/032078.
5. Shvachko N.A., Khlestkina E.K. Molecular genetic bases of seed resistance to oxidative stress during storage // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020. Т. 24. N 5. С. 451–458. DOI: 10.18699/VJ20.47-0. EDN: FRHСМО.
6. Митрофанова О.П., Хакимова А.Г. Новые генетические ресурсы в селекции пшеницы на увеличение содержания белка в зерне // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. Т. 20. N 4. С. 545–554. DOI: 10.18699/VJ16.177. EDN: WMUFYV.
7. Veselovsky V.A. Veselova T.V. Lipid peroxidation, carbohydrate hydrolysis, and Amadori-Maillard reaction at early stages of dry seed aging // Russian Journal of Plant Physiology. 2012. Vol. 59, no. 6. P. 811–817. DOI: 10.1134/S1021443712030181.
8. Ciacka K., Tyminiński M., Gniazdowska A., Krasuska U. Carbonylation of proteins – an element of plant ageing // Planta. 2020. Vol. 252. P. 12. DOI: 10.1007/s00425-020-03414-1.
9. Patil K.G., Karjule A., Patel D.A., Sasidharan N. Effect of accelerated ageing on viability and longevity of wheat (*Triticum aestivum*) seed // Indian Journal of Agricultural Sciences. 2019. Vol. 89, no. 6. P. 920–928. DOI: 10.56093/ijas.v89i6.90760.
10. Нецветаев В.П., Бондаренко Л.С., Рыжкова Т.А. Новый подход к оценке пшеницы качества зерна мягкой // Достижения науки и техники АПК. 2012. N 9. С. 24–27. EDN: РСYGOX.
11. Гурьева К.Б., Хаба Н.А., Корнева О.С., Тарасова Е.А., Белецкий С.А. Мониторинг белкового комплекса пшеницы при долгосрочном хранении // Инновационные технологии производства и хранения материальных ценностей для государственных нужд: международный научный сборник: открытое приложение к информационному сборнику «Теория и практика длительного хранения». М., 2020. Вып. 14. С. 91–104. EDN: ZRBRWI.
12. Ramesh R., Vidhya V., Khan F.L.A., Alnasrawi A.M., Alkahtani J., Elshikh M.S., et al. Shockwave treated seed germination and physiological growth of *Vigna mungo* (L) in red soil environment // Physiological and Molecular Plant Pathology. 2022. Vol. 117. P. 101747. DOI: 10.1016/j.pmp.2021.101747.
13. Павлова В.А., Лысак В.И., Нефедьева Е.Э., Булгакова Е.В., Шайхiev И.Г. Влияние параметров ударно-волнового нагружения на состояние биополимеров и поглощение воды семенами гречихи // Вестник технологического университета. 2015. Т. 18. N 10. С. 79–84. EDN: UCBPBP.
14. Нефедьева Е.Э., Лысак В.И. Импульсное давление как фактор регуляции роста, развития и продуктивности растений // Радиационные технологии в сельском хозяйстве и пищевой промышленности: состояние и перспективы: материалы Междунар. науч.-практ. конф. (г. Обнинск, 26–28 сентября 2018 г.). Обнинск: Изд-во ВНИИРАЭ, 2018. С. 296–298. EDN: YXVFYТ.
15. Пат. № 175463, Российская Федерация, МПК А01 С1/06. Устройство для обработки семян, подлежащих хранению / Е.Э. Нефедьева, А.Б. Голованчиков, В.А. Павлова, В.И. Лысак, С.В. Кузьмин, В.А. Балашов. Заявл. 06.06.2017; опубл. 06.1.2017. Бюл. № 34.
16. Zhao X., Hou C., Tian M., Zhou Yu., Yang R., Wang X., et al. Effect of water-extractable arabinoxylan with different molecular weight on the heat-induced aggregation behavior of gluten // Food Hydrocolloids. 2020. Vol. 99. P. 105318. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2019.105318.
17. Колпакова В.В., Студенникова О.Ю. Гидратационная способность и физико-химические свойства белков пшеничной клейковины // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2009. N 2-3. С. 5–8. EDN: KXBPOV.
18. Середкин Н.Н., Хищенко К.В. Расчет ударных адиабат смесей при высоких давлениях // Лазерные, плазменные исследования и технологии – ЛАПЛАЗ-2021: сб. науч. тр. VII Междунар. конф. (г. Москва, 23–26 марта 2021 г.). М.: Изд-во МИФИ, 2021. С. 454–455. EDN: YSTIQP.
19. Храмова Я.И., Дмитриевская И.И., Белопухов С.Л., Нефедьева Е.Э., Храмова В.Н. Влияние импульсного давления на стекловидность, влажность и всхожесть зер-

новок пшеницы при хранении // Агрофизика. 2023. N 1. С. 15–23. DOI: 10.25695/AGRPH.2023.01.03. EDN: XZTEEI.

20. Бахарев Д.Н. Прикладные аспекты волновой

теории удара в теоретических исследованиях обмолота початков кукурузы // Инновации в АПК: проблемы и перспективы. 2020. N 2. С. 9–16. EDN: KYPPZF.

REFERENCES

1. Lv Y., Zhang S., Wang J., Hu Y. Quantitative proteomic analysis of wheat seeds during artificial ageing and priming using the isobaric tandem mass tag labeling. *PLoS ONE*. 2016;11(9):e0162851. DOI: 10.1371/journal.pone.0162851.

2. Mamedova S.A., Babayeva M.A. Assessment of stress resistance of Japanese origin genotypes of synthetic wheat. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya = Advances in current natural sciences*. 2022;2:14-19. (In Russian). DOI: 10.17513/use.37772. EDN: GWKLM1.

3. Bernal-Lugo I., Leopold A.C. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. *Plant Physiology*. 1992;98(3):1207-1210. DOI: 10.1104/pp.98.3.1207.

4. Nefedieva E.E., Khramova Ya.I., Khramova V.N., Gorlov I.F., Lysak V.I., Slozhenkina M.I. Dependence of germination of wheat grains after the treatment by impulse pressure and long-term storage on the vitreousness of endosperm. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2021;677:032078. DOI: 10.1088/1755-1315/677/3/032078.

5. Shvachko N.A., Khlestkina E.K. Molecular genetic bases of seed resistance to oxidative stress during storage. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):451-458. DOI: 10.18699/VJ20.47-o. EDN: FRHCMO.

6. Mitrofanova O.P., Khakimova A.G. New genetic resources in wheat breeding for an increased grain protein content. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(4):545-554. (In Russian). DOI: 10.18699/VJ16.177. EDN: WMUFYV.

7. Veselovsky V.A., Veselova T.V. Lipid peroxidation, carbohydrate hydrolysis, and Amadori-Maillard reaction at early stages of dry seed aging. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2012;59(6):811-817. DOI: 10.1134/S1021443712030181.

8. Ciacka K., Tymiński M., Gniazdowska A., Krasuska U. Carbonylation of proteins – an element of plant ageing. *Planta*. 2020;252:12. DOI: 10.1007/s00425-020-03414-1.

9. Patil K.G., Karjule A., Patel D.A., Sasidharan N. Effect of accelerated ageing on viability and longevity of wheat (*Triticum aestivum*) seed. *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 2019;89(6):920-928. DOI: 10.56093/ijas.v89i6.90760.

10. Netsvetaev V.P., Bondarenko L.S., Akinshina O.V. Innovative approach to the assessment of wheat grain quality. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2012;9:24-27. (In Russian). EDN: PCYGOX.

11. Guryeva K.B., Khaba N.A., Korneva O.S., Tarasova E.A., Beletskiy S.L. Heat protein complex monitoring for long-term storage. In: *Innovatsionnye tekhnologii proizvodstva i khraneniya material'nykh tsennostei dlya gosudarstvennykh nuzhd: mezhdunarodnyi nauchnyi sbornik: otkrytoe prilozhenie k informatsionnomu sborniku «Teoriya i praktika dlitel'nogo khraneniya» = Innovative technologies for possessing and storage of material values for state needs: International scientific collection: open appendix to the information collection "Theory and practice*

of long-term storage". Moscow; 2020, vol. 14, p. 91–104. (In Russian). EDN: ZRBRW1.

12. Ramesh R., Vidhya V., Khan F.L.A., Alnasrawi A.M., Alkahtani J., Elshikh M.S., et al. Shockwave treated seed germination and physiological growth of *Vigna mungo* (L) in red soil environment. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2022;117:101747. DOI: 10.1016/j.pmp.2021.101747.

13. Pavlova V.A., Lysak V.I., Nefed'eva E.E., Bulgakova E.V., Shaikhiev I.G. Influence of shock-wave loading parameters on the state of biopolymers and water absorption by buckwheat seeds. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta = Herald of Technological University*. 2015;18(10):79-84. (In Russian). EDN: UCBBPP.

14. Nefed'eva E.E., Lysak V.I. Impulse pressure as a factor of regulation of growth, development and productivity of plants. In: *Radiatsionnye tekhnologii v sel'skom khozyaistve i pishchevoi promyshlen-nosti: sostoyanie i perspektivy: materialy Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. = Radiation technologies in agriculture and food industry: current state and prospects: proceedings of the International research and practice conference*. 26–28 September 2018, Obninsk. Obninsk: Russian Institute of Radiology and Agroecology; 2018, p. 296-298. (In Russian). EDN: YXVFYT.

15. Nefed'eva E.E., Golovanchikov A.B., Pavlova V.A., Lysak V.I., Kuz'min S.V., Balashov V.A. *Device for seeds processing to be stored*. Patent RF, no. 175463; 2017. (In Russian).

16. Zhao X., Hou C., Tian M., Zhou Yu., Yang R., Wang X., et al. Effect of water-extractable arabinoxylan with different molecular weight on the heat-induced aggregation behavior of gluten. *Food Hydrocolloids*. 2020;99:105318. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2019.105318.

17. Kolpakova V.V., Studennikova O.Yu. Hydration capacity and physico-chemical properties of wheat gluten proteins. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Pishchevaya tekhnologiya = Izvestiya vuzov. Food technology*. 2009;2-3:5-8. (In Russian). EDN: KXBPOV.

18. Seredkin N.N., Khishchenko K.V. Calculation of shock adiabats of mixtures at high pressures. In: *Lazernye, plazmennye issledovaniya i tekhnologii – LAPLAZ-2021: sb. nauch. tr. VII Mezhdunar. konf. = Laser, plasma research and technology LAPLAZ-2021: Proceedings of the 7th International symposium*. 23–26 March 2021, Moscow. Moscow: Moscow Engineering Physics Institute; 2021, p. 454-455. (In Russian). EDN: YSTIQP.

19. Khramova Ya.I., Dmitrevskaya I.I., Belopukhov S.L., Nefed'eva E.E., Khramova V.N. Influence of impulse pressure on vitreousness, moisture content and germination of wheat grains during storage. *Agrofizika = Agro-physica*. 2023;1:15-23. (In Russian). DOI: 10.25695/AGRPH.2023.01.03. EDN: XZTEEI.

20. Baharev D.N. Applied aspects of the impact wave theory in theoretical studies of corn cobs threshing. *Innovatsii v APK: problemy i perspektivy = Innovations in Agricultural Complex: problems and perspectives*. 2020;2:9-16. (In Russian). EDN: KYPPZF.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Храмова Ярославна Игоревна,
аспирант,
Волгоградский государственный
технический университет,
400005, г. Волгоград, пр. Ленина, 28,
Российская Федерация,
yaroslavnacocosmos@icloud.com
<https://orcid.org/0000-0003-2194-461X>

Нефедьева Елена Эдуардовна,
д.б.н., доцент, профессор,
Волгоградский государственный
технический университет,
400005, г. Волгоград, пр. Ленина, 28,
Российская Федерация,
✉ nefedieva@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4782-3835>

Белопухов Сергей Леонидович,
д.с.-х.н., профессор, профессор,
Российский государственный аграрный
университет – МСХА им. К.А. Тимирязева,
127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49,
Российская Федерация,
sbelopuhov@rgau-msha.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4473-4466>

Дмитревская Инна Ивановна,
д.с.-х.н., доцент, заведующий кафедрой,
Российский государственный аграрный
университет – МСХА им. К.А. Тимирязева,
127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49,
Российская Федерация,
i.dmitrevskaya@rgau-msha.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7497-2393>

Храмова Валентина Николаевна,
д.б.н., профессор,
профессор, декан,
Волгоградский государственный
технический университет,
400005, г. Волгоград, пр. Ленина, 28,
Российская Федерация,
hramova_vn@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7630-7672>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 19.01.2023.
Одобрена после рецензирования 17.10.2023.
Принята к публикации 31.10.2023.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yaroslavna I. Khramova,
Postgraduate Student,
Volgograd State Technical University,
28, Lenin Ave., Volgograd, 400005,
Russian Federation,
yaroslavnacocosmos@icloud.com
<https://orcid.org/0000-0003-2194-461X>

Elena E. Nefed'eva,
Dr. Sci. (Biology), Associate Professor, Professor,
Volgograd State Technical University,
28, Lenin Ave., Volgograd, 400005,
Russian Federation,
✉ nefedieva@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4782-3835>

Sergey L. Belopukhov,
Dr. Sci. (Agriculture), Professor, Professor,
Russian State Agrarian University –
Moscow Timiryazev Agricultural Academy,
49, Timiryazev St., Moscow, 127550,
Russian Federation,
sbelopuhov@rgau-msha.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4473-4466>

Inna I. Dmitrevskaya,
Dr. Sci. (Agriculture), Associate Professor,
Head of the Department,
Russian State Agrarian University –
Moscow Timiryazev Agricultural Academy,
49, Timiryazev St., Moscow, 127550,
Russian Federation,
i.dmitrevskaya@rgau-msha.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7497-2393>

Valentina N. Khramova,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Professor, Dean,
Volgograd State Technical University
28, Lenin Ave., Volgograd, 400005,
Russian Federation,
hramova_vn@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7630-7672>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

Information about the article

The article was submitted 19.01.2023.
Approved after reviewing 17.10.2023.
Accepted for publication 31.10.2023.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 663.316

EDN: FFIUJW

DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-611-620



Биохимический состав фруктового сусла из мелкоплодных сортов яблони Южного Прибайкалья

Н.П. Супрун*✉, Г.С. Гусакова*, Н.С. Аникина**, Е.А. Слатья**

*Иркутский национальный исследовательский технический университет,
г. Иркутск, Российская Федерация

**Всероссийский национальный научно-исследовательский институт
виноградарства и виноделия «Магарач» РАН, г. Ялта, Российская Федерация

Аннотация. В большинстве климатических зон Российской Федерации имеются обширные площади насаждений яблони, которая является основным сырьем для производства сидров и плодовой алкогольной продукции. Технологический потенциал новых сортов яблони в производстве плодовой алкогольной продукции мало изучен. Целью настоящей работы стало исследование химического состава, в том числе фракционного состава сахаров и органических кислот, фруктового сусла, получаемого из мелкоплодных сортов яблони Южного Прибайкалья, и выделение наиболее подходящих сортов для производства сидров. Биохимический состав сусла определяли общепринятыми методами согласно государственным стандартам. Мелкоплодные полукультурки, выращиваемые в Южном Прибайкалье, характеризуются вариабельностью по содержанию экстрактивных веществ. В разные годы плоды одного сорта накапливают разное количество растворенных сухих веществ (12,5–14,5%), основная доля которых приходится на сахара (109,3–135,3 г/дм³). Среди сахаров преобладает содержание фруктозы (более 50%), второе место по количеству занимает глюкоза. Доля дисахаридов в составе сахаров в плодах разных сортов варьирует от 9,1 до 21,5%. Концентрация органических кислот в изученных сортах составляет от 7,2 до 13,0 г/дм³. В числе обнаруженных органических кислот – до 83,4% яблочной, до 6,7% лимонной, до 6,4% молочной, до 2,5% янтарной кислоты, а также следовые количества винной и уксусной кислот. Количество фенольных соединений в образцах изменяется от 522,5 до 1704,6 мг/дм³. Изученные полукультурки классифицированы как «кислый» и «горько-кислый» типы сидровых сортов яблони.

Ключевые слова: яблоки, мелкоплодные сорта, полукультурки, фруктовое сусло, биохимический состав

Для цитирования: Супрун Н.П., Гусакова Г.С., Аникина Н.С., Слатья Е.А. Биохимический состав фруктового сусла из мелкоплодных сортов яблони Южного Прибайкалья // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 611–620. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-611-620. EDN: FFIUJW.

PHYSICO-CHEMICAL BIOLOGY

Original article

Biochemical composition of fruit must from small-fruit apple varieties grown in the Southern Baikal Region

Natalya P. Suprun*✉, Galina S. Gusakova*, Nadezhda S. Anikina**,

Evgenii A. Slastyay**

*Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

**All-Russian National Research Institute of Vinegrowing and Winemaking, “Magarach” RAS, Yalta, Russian Federation

Abstract. Most climatic zones of the Russian Federation include vast apple plantations that serve as the primary source of raw materials for the production of cider and fruit alcoholic beverages. The technological potential of new apple varieties in the production of fruit alcoholic beverages is understudied. The present study aims to examine the chemical composition (including the fractional composition of sugars and organic acids) of fruit must from small-fruit apple varieties grown in the Southern Baikal region and to identify the most suitable varieties for cider production.

© Супрун Н.П., Гусакова Г.С., Аникина Н.С., Слатья Е.А., 2023

The biochemical composition of must was determined via conventional methods as per state standards. Small-fruit semi-cultivars grown in the Southern Baikal Region are characterized by variability in the content of extractive substances. In different years, the fruit of the same variety accumulates different amounts of dissolved solids (12.5–14.5%), primarily sugars (109.3–135.3 g/dm³). Among sugars, fructose is the most abundant (over 50%), followed by glucose. The proportion of disaccharides in the composition of sugars in the fruits of different varieties ranges from 9.1 to 21.5%. The concentration of organic acids in the studied varieties ranges from 7.2 to 13.0 g/dm³. The detected organic acids include malic acid (up to 83.4%), citric acid (up to 6.7%), lactic acid (up to 6.4%), succinic acid (up to 2.5%), as well as trace amounts of tartaric and acetic acids. The amount of phenolic compounds in the specimens varies from 522.5 to 1704.6 mg/dm³. The studied semi-cultivars were classified as sharp and bittersharp cider apple varieties.

Keywords: apples, small-fruit varieties, semi-cultivars, fruit must, biochemical composition

For citation: Suprun N.P., Gusakova G.S., Anikina N.S., Slastya E.A. Biochemical composition of fruit must from small-fruit apple varieties grown in the Southern Baikal Region. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):611-620. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-611-620. EDN: FFIUJW.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным Европейской ассоциации сидра и фруктовых вин (фр.: AICV – L'Association des Industries des Cidres et Vins de fruits de l'UE), в 2022 г. Россия заняла 9-е место по темпу увеличения объема производства сидра, который составил 8,26%¹. В настоящее время в России и во всем мире наблюдается переориентация интереса потребителя к категории натуральных слабоалкогольных напитков, в частности к сидрам, что связано с популяризацией правильного питания и здорового образа жизни [1]. Продажи сидра в России с февраля 2022 по февраль 2023 г. выросли на 29%, и основной вклад в это внесли локальные бренды².

Основным сырьем в производстве плодовой алкогольной продукции и сидров в России [2], Беларуси [3], странах Балтии [4] и Западной Европы [5, 6] являются плоды яблони. Несмотря на то что большая часть регионов России богата сырьем для производства напитков высокого качества, около 90% отечественной плодовой алкогольной продукции и сидров производится из восстановленных концентрированных соков по традиционным технологиям. В связи с этим отечественная продукция значительно уступает зарубежной, получаемой из сока прямого отжима, по органолептическим, биохимическим показателям и устойчивости к помутнениям при хранении [7, 8].

В Англии, Ирландии, Франции, Германии, Австрии, Бельгии, Испании, Италии и Соединенных Штатах Америки для производства сидров высокого качества выращивают специальные «технические» сорта яблони, отличающиеся органолептическими и физико-химическими характеристиками: массовой концентрацией сахаров, органических кислот и фенольных соединений [5, 9, 10]. Концентрация сахаров в плодах является определяющим показателем потенциальной объемной доли этилового спирта в готовой продукции, фенольные вещества формируют вяжущий вкус и являются предшественниками ароматических компонентов сидров, а органические кислоты усиливают вяжущий вкус и создают его полноту [11]. В ряде европейских стран

концентрация полифенолов в сырье для производства сидров нормируется (значением не более 250 мг/дм³), поскольку высокие концентрации этих веществ могут придавать грубость вкусу готовой продукции [4].

Европейская ассоциация сидра и фруктовых вин выделяет четыре основные категории сидровых сортов яблони: кислые, горько-кислые, горько-сладкие и сладкие [12]. Несмотря на то что традиционная классификация сидровых сортов яблони восходит к ранним работам Б.Т.П. Баркера [13, 14], датируемым первой половиной прошлого столетия, исследования сортов, пригодных для производства плодовой алкогольной продукции, не теряют своей актуальности. Более того, зарубежные исследовательские центры и институты активно работают над повышением урожайности и устойчивости сидровых сортов яблони к стрессовым факторам [7, 15, 16], а также над испытанием новых сортов в производстве сидров и плодовой алкогольной продукции [17].

В нашей стране яблони специальных сидровых сортов до последнего времени не выращивались [18]. Сегодня же ученые разных регионов России активно занимаются технологической оценкой пригодности современных сортов яблони, в том числе районированных сортов, в производстве сидров и других продуктов питания [18, 19]. Многие авторы отмечают, что большинство сортов, культивируемых в южных и центральных регионах нашей страны, накапливает достаточное количество сахаров и титруемых кислот, при этом ассортимент «горьких» сортов (с высоким содержанием фенольных соединений) в разы меньше [19–21]. В регионах с суровыми климатическими условиями, напротив, большинство сортов отличается повышенным содержанием титруемых кислот и фенольных соединений [22–25]. Безусловно, специфика химического состава плодов яблони в первую очередь определяется сортовой особенностью, однако она также сильно зависит от климатической зоны произрастания, количества солнечных дней, объема выпавших осадков, типа почвы и др. В этой связи научный и практический интерес представляют исследования вариативности химического состава

¹European cider trends 2022 // Aicv.org. Режим доступа: https://aicv.org/files/attachments/.504/AICV_Cider_Trends_2022.pdf (дата обращения: 26.09.2023).

²Эксперты рассказали о причинах резкого роста продаж сидра // Rg.ru. Режим доступа: <https://rg.ru/2023/04/03/eksperty-rasskazali-o-prichinah-rezkogo-rosta-prodazh-sidra.html?ysclid=Inibb9xh67774818234> (дата обращения: 10.10.2023).

сортов яблони, выращиваемых в регионах, и определение направления их переработки.

Целью проведенной работы являлось исследование химического состава, в том числе фракционного состава сахаров и органических кислот, фруктового сусла из мелкоплодных сортов яблони Южного Прибайкалья и выделение наиболее подходящих сортов для производства сидров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были исследованы соки прямого отжима (фруктовое сусло) из плодов яблони-полукультурки (яблок) 8 помологических сортов отечественной селекции, среди которых 3 сорта летнего (Краса Бурятии, Доктор Куновский, Красная гроздь), 4 сорта осеннего (Красноярский сеянец, Красноярский снегирек, Фонарик, Уральское наливное) и 1 сорт зимнего (Лада) сроков созревания. Отбор плодов проводили в фазе технологической зрелости на коллекционных участках крестьянского (фермерского) хозяйства «Иркутский садовод» в районе товарищества собственников недвижимости «Молодёжное» Иркутской области (район Южного Прибайкалья).

Плоды яблони измельчали в лабораторной шнековой дробилке, мезгу сульфировали и обрабатывали композицией ферментных препаратов пектолитического и целлюлолитического действия «Фруктоцим П6-Л» (0,005 см/кг) и «Целлолюкс-А» (3 г/кг) в течение 1 часа при температуре 40 °С. Условия обработки мезги были выбраны на основании результатов ранее проведенных исследований [26]. Соки отжимали с помощью вертикального гидравлического корзиночного пресса, медленно наращивая давление до максимального значения 0,8 МПа. После прекращения выделения сока давление сбрасывали до нуля, мезгу ворошили и повторяли процесс отжима. Свежеотжатые соки отстаивали при температуре 10 °С, затем снимали с осадка.

Определение органолептических и физико-химических показателей полученных образцов выполняли по действующим на территории Российской Федерации государственным стандартам. Определение органолептических показателей фруктового сусла выполняли комиссией в количестве 8 человек, прошедших специальную подготовку в соответствии с ГОСТ ISO 3972-2014³. Для количественного выражения органолептических свойств фруктового сусла была использована 10-балльная шкала оценки основных критериев вкуса (сладость, кислотность, горечь, терпкость, грубость и мягкость) соков. Критерии оценивали по шкале от 1 до 10 баллов,

затем рассчитывали средний балл. В соках определяли: содержание растворимых сухих веществ – рефрактометрическим методом по ГОСТ ISO 2173-2013⁴; массовую концентрацию общего экстракта – весовым методом по ГОСТ 32000-2012⁵; суммы сахаров – перманганатным методом по ГОСТ 8756.13-87⁶; титруемых кислот – методом титрования по ГОСТ ISO 750-2013⁷; фенольных соединений – колориметрическим методом с применением реактива Фолина – Чокальтеу [27]. Массовую концентрацию сахаров (глюкозы, фруктозы, сахарозы) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе LC-20 Prominace (Shimadzu, Япония) с аналитической колонкой Supelcogel C610H (Sigma-Aldrich, Япония) по СТО 01580301.002-2016⁸ [28]; массовую концентрацию органических кислот (яблочной, лимонной, молочной, янтарной, винной и уксусной) – методом высокоэффективной жидкостной хроматографии по СТО 01580301.001-2016⁹ [28]. Сахарно-кислотный индекс определяли отношением процентного содержания сахара и кислоты в соках.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Применяя композицию ферментных препаратов «Фруктоцим П6-Л» и «Целлолюкс-А» для обработки мезги при получении сусла, наблюдали быстрое осветление образцов уже после 4 часов отстаивания в холоде (10 °С). Полученные образцы фруктового сусла отличались янтарным цветом разной степени насыщенности, что согласуется с результатами изучения химического состава сусла, в частности содержанием фенольных соединений в сортах.

Химический состав плодов непостоянен и зависит как от сортовых особенностей, так и от целого ряда эндогенных факторов [24, 25]. Диапазоны варьирования величины экстрактивных веществ в образцах фруктового сусла, полученных из плодов яблони урожая разных лет (2018–2022 гг.), представлены в табл. 1.

Как видно из представленных данных, в разные годы содержание экстрактивных веществ в некоторых сортах отличалось волатильностью. Содержание растворимых сухих веществ в соках варьировало от 12,5 до 14,5%. Количество сахаров, которые на 70–80% формируют содержание растворимых сухих веществ [20, 24], составило 109,3–135,3 г/дм³. Максимально высокие концентрации растворимых сухих веществ (13,9–14,5%), общего экстракта (146,6–152,5 г/дм³), а также сахаров установлены в полукультурках Краса Бурятии, Фонарик и Лада.

³ГОСТ 32000-2012. Продукция алкогольная и сырье для ее производства. Метод определения массовой концентрации приведенного экстракта. М.: Стандартинформ, 2014.

⁴ГОСТ ISO 2173-2013. Продукты переработки фруктов и овощей. Рефрактометрический метод определения растворимых сухих веществ. М.: Стандартинформ, 2019.

⁵ГОСТ 32000-2012. Продукция алкогольная и сырье для ее производства. Метод определения массовой концентрации приведенного экстракта. М.: Стандартинформ, 2014.

⁶ГОСТ 8756.13-87. Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения сахаров. М.: Стандартинформ, 2010.

⁷ГОСТ ISO 750-2013. Продукты переработки фруктов и овощей. Определение титруемой кислотности. М.: Стандартинформ, 2019.

⁸СТО 01580301.002-2016. Соки, сусло, вина виноградные и плодовые, напитки слабоалкогольные. Определение массовой концентрации глюкозы, фруктозы и сахарозы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Ялта, 2016.

⁹СТО 01580301.001-2016. Соки, сусло, вина виноградные и плодовые, напитки слабоалкогольные. Определение массовой концентрации органических кислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Ялта, 2016.

Изученные сорта отличались относительно высоким общим содержанием кислот (в пересчете на яблочную кислоту), которое в разных сортах и урожаях разных лет колебалось от 7,2 до 13,0 г/дм³. Сортами с минимальной концентрацией титруемых кислот являлись полукультурки Красная гроздь (8,4 г/дм³) и Фонарик (7,8 г/дм³). Максимальная концентрация титруемых кислот наблюдалась в сортах Доктор Куновский (11,2 г/дм³) и Красноярский снежирек (11,4 г/дм³).

Полученные результаты испытаний подтверждают выводы других авторов о том, что основным фактором, влияющим на уровень фенольных соединений в плодах, является сорт [24, 25]. Величина фенольных соединений в соках из разных сортов яблони варьирует в довольно широком диапазоне, но в соках из плодов одного сорта урожаях разных лет она проявляется как стабильный показатель. Сортами с наибольшим содержанием фенольных соединений являются Краса Бурятии (1630,0 мг/дм³), Красная гроздь (1704,6 мг/дм³), Красноярский сеянец (1488,6 мг/дм³) и Красноярский снежирек (1690,0 мг/дм³), а сортами с наименьшей концентрацией фенольных веществ – Доктор Куновский (около 539,7 мг/дм³) и Лада (около 522,5 мг/дм³).

Известно, что общее содержание полифенолов, а также их профиль в разных структурных частях (стеблях, семенах, кожце и мякоти) яблока значительно различается [29]. Установлено, что наибольшее количество полифенолов сконцентрировано в стеблях (плодоножке), вдвое меньше их в семенах и еще меньше в мякоти плодов [30, 31]. Соответственно, при выделении сока из плодов в него переходит лишь небольшая часть фенольных соединений яблока. Учитывая вышеупомянутые сведения авторов и оценивая полученные результаты собственного исследования (массовую концентрацию сахаров, органических кислот, фенольных

веществ и дегустационный анализ вкуса образцов (рис. 1)), изученные мелкоплодные полукультурки можно отнести к «горько-кислому» и «кислому» типам сидровых сортов яблони.

С точки зрения производства сидра предпочтительнее, чтобы сахарокислотный индекс суслу соответствовал значениям от 10 до 15 ед. при концентрации сахаров более 9% и содержании органических кислот 6–9 г/дм³ [32]. Величина сахарокислотного индекса в сортах в разные годы исследования широко варьировала (табл. 2).

Обработанные за годы исследования данные свидетельствуют о том, что соотношения сахаров и органических кислот в соках изученных сортов яблони соответствуют рекомендуемым значениям или близки к ним. Таким образом, из плодов рассмотренных сортов яблони в отдельные годы можно получать сортовое фруктовое суслу или использовать купажи сортов для производства сидров. Для получения фруктового суслу высокого качества без корректировки сахаристости и кислотности рекомендованы плоды сортов Красноярский сеянец, Красная гроздь, Краса Бурятии, Лада, Уральское наливное и Фонарик.

Фракционный состав сахаров в образцах фруктового суслу, полученных из плодов исследованных сортов урожая 2022 г., состоял в основном из моносахаров (фруктозы и глюкозы) и значительно меньшего количества дисахаридов (рис. 2).

Среди моносахаров в образцах отмечено преобладающее содержание фруктозы (более 50%), второе место по количеству занимает глюкоза. Доля дисахаридов в составе сахаров в пересчете на сахарозу в разных сортах варьирует от 9,1 до 21,5%, что является характерной особенностью яблочного сока [33].

Степень проявления кислого вкуса зависит прежде всего от активной кислотности, но разница в ощущении

Таблица 1. Варьирование содержания экстрактивных веществ в образцах фруктового суслу из яблок урожаях 2018–2022 гг.

Table 1. Extractives content in apple must obtained from harvests 2018 – 2022

Номер образца	Название сорта	Растворимые сухие вещества, %	Массовая концентрация			
			общего экстракта, г/дм ³	суммы сахаров, г/дм ³	титруемых кислот, г/дм ³	фенольных веществ, мг/дм ³
1	Краса Бурятии	13,8–14,5	147,7–152,2	124,3–129,1	9,6–11,8	1534,5–1776,6
		14,2	150,3	127,3	10,4	1630,0
2	Доктор Куновский	11,4–13,3	119,0–138,8	97,5–116,7	10,1–11,6	489,1–602,3
		12,5	131,1	109,3	11,2	539,7
3	Красная гроздь	13,5–14,1	142,1–148,8	119,2–125,3	7,2–10,7	1578,9–1783,6
		13,9	146,9	123,5	8,4	1704,6
4	Красноярский сеянец	13,1–17,2	137,7–172,8	123,3–160,5	9,7–11,8	1247,6–1751,4
		13,5	142,1	135,3	10,4	1488,6
5	Красноярский снежирек	12,6–13,8	132,2–142,1	109,6–118,8	10,5–12,2	1649,7–1755,0
		13,2	137,3	114,6	11,4	1690,0
6	Фонарик	14,2–14,7	149,9–154,4	127,1–133,0	7,3–8,2	938,3–1075,5
		14,5	152,5	130,4	7,8	999,9
7	Уральское наливное	11,6–14,0	121,2–147,7	99,3–124,3	8,8–13,0	941,1–1027,0
		13,0	137,8	115,0	9,5	1027,6
8	Лада	13,7–15,5	144,4–161,0	120,6–146,4	8,6–11,1	493,7–565,2
		13,9	146,6	132,3	10,0	522,5

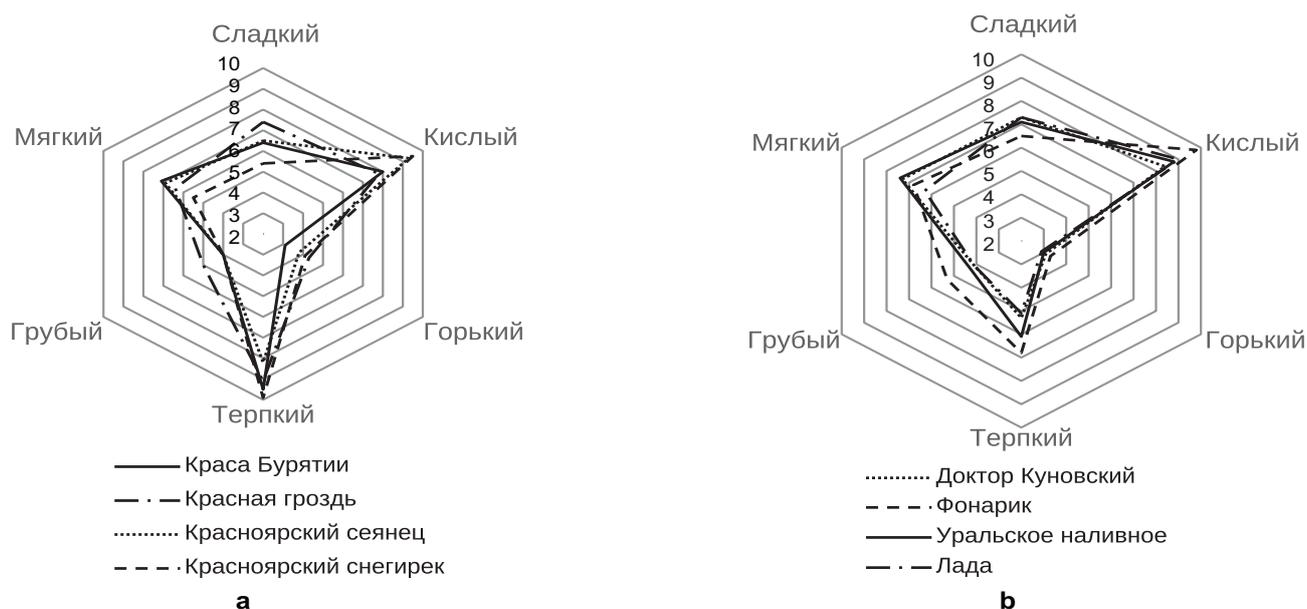


Рис. 1. Профилограммы вкуса образцов фруктового сула: а – сорта «горько-кислого» типа; б – сорта «кислого» типа
Fig. 1. Taste profiles of apples must: a – “bitter-sour” type varieties; b – “sour” type varieties

кислого вкуса связана с различиями состава органических кислот. Состав органических кислот в соках изученных сортов яблони представлен в табл. 3.

Для образцов характерна преобладающая величина яблочной кислоты – в среднем 83,4%. Это основная кислота плодов яблони, которая образуется из гексоз в процессе дыхания растительной клетки, а также в результате распада декстринов, крахмала и других полисахаридов при созревании [34], концентрация же ее зависит от генетических особенностей сорта [35] и агротехнических условий культивирования [36]. Максимальная концентрация яблочной кислоты обнаружена в соках полукультурок Красноярский снегирек (10,58 г/дм³) и Красноярский сеянец (10,12 г/дм³).

В существенно меньшем количестве в образцах сула идентифицированы остальные органические кислоты. Доля лимонной и молочной в общей массе органических кислот в сортах в среднем составила по 6–7% каждой. Максимальная массовая концентрация лимонной кислоты обнаружена в соке полукультурки летнего срока созревания Доктор Куновский (0,96 г/дм³), а минимальная – в сорте Фонарик (0,45 г/дм³). Высокое содержание молочной кислоты наблюдалось в сортах

Доктор Куновский (0,86 г/дм³), Уральское наливное (0,81 г/дм³) и Лада (1,26 г/дм³).

Содержание биологически активной янтарной кислоты в образцах составило около 2,4% (от 0,11 до 0,59 г/дм³). В следовых количествах обнаружена винная кислота (до 0,10 г/дм³). В образцах из полукультурок Краса Бурятии и Доктор Куновский винная кислота не обнаружена, что, по всей видимости, обусловлено сортоспецифичностью. Уксусная кислота, являющаяся промежуточным продуктом метаболизма плодов яблони при созревании [21], найдена в незначительном количестве (до 0,08 г/дм³) в сортах Краса Бурятии, Красная гроздь, Красноярский сеянец и Фонарик.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных испытаний можно сделать следующие выводы.

Изученные мелкоплодные сорта яблони, культивируемые в Южном Прибайкалье, характеризуются вариабельностью по содержанию экстрактивных веществ. В разные годы в плодах отмечается накопление различного количества растворенных сухих веществ (12,5–14,5%), основная доля которых приходится на сахара (109,3–135,3 г/дм³).

Таблица 2. Величина сахарокислотного индекса образцов фруктового сула из яблук урожаев 2018–2022 гг.

Table 2. Gluco-acidimetric indexes in apple must obtained from harvests 2018 – 2022

Номер образца	Название сорта	Значение сахарокислотного индекса, ед.				Среднее значение
		2018 г.	2019 г.	2021 г.	2022 г.	
1	Краса Бурятии	-	19,5	16,6	14,6	16,9
2	Доктор Куновский	-	9,6	9,7	10,0	9,8
3	Красная гроздь	17,2	17,4	13,9	11,7	15,1
4	Красноярский сеянец	11,8	10,4	16,1	14,2	13,1
5	Красноярский снегирек	10,1	-	10,5	9,7	10,1
6	Фонарик	-	18,1	15,4	17,0	16,9
7	Уральское наливное	12,8	11,3	-	9,6	11,2
8	Лада	13,9	11,6	14,6	13,2	13,3

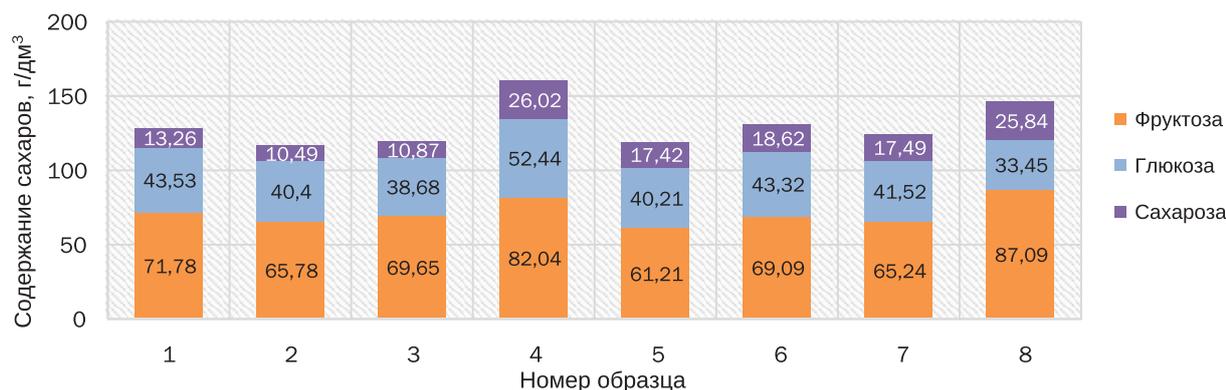


Рис. 2. Компонентный состав сахаров в образцах фруктового сусла из яблок урожая 2022 г.

Fig. 2. Component composition of sugars in apple must obtained in 2022

Таблица 3. Компонентный состав органических кислот в образцах фруктового сусла из яблок урожая 2022 г.

Table 3. Organic acids content in apple must obtained in 2022

Номер образца	Название сорта	Массовая концентрация органических кислот, г/дм ³					
		яблочная	лимонная	молочная	янтарная	винная	уксусная
1	Краса Бурятии	5,33	0,55	0,48	0,12	0,00	0,08
2	Доктор Куновский	9,63	0,96	0,86	0,18	0,00	0,00
3	Красная гроздь	5,87	0,59	0,53	0,11	0,05	0,08
4	Красноярский сеянец	10,12	0,73	0,58	0,19	0,08	0,08
5	Красноярский снегирек	10,58	0,76	0,58	0,20	0,08	0,00
6	Фонарик	6,20	0,45	0,40	0,13	0,05	0,05
7	Уральское наливное	7,25	0,54	0,81	0,19	0,05	0,00
8	Лада	8,61	0,51	1,26	0,59	0,10	0,00

Примечание. Расхождение между значениями трех параллельных измерений не превышало 5%.

Концентрация органических кислот в изученных сортах варьирует от 7,2 до 13,0 г/дм³, а количество фенольных соединений – от 522,5 до 1704,6 мг/дм³. Изученные сорта яблони Доктор Куновский, Фонарик, Уральское наливное и Лада классифицированы как «кислый» тип, а сорта Краса Бурятии, Красная гроздь, Красноярский сеянец и Красноярский снегирек – как «горько-кислый» тип сидровых сортов яблони вследствие высокого содержания фенольных веществ и органических кислот.

Изучение фракционного состава сахаров в соках показало преобладающее содержание фруктозы (более 50%), второе место по количеству занимает глюкоза.

Доля дисахаридов в составе сахаров в пересчете на сахарозу в разных сортах варьирует от 9,1 до 21,5%. Среди органических кислот в образцах обнаружено до 83,4% яблочной, до 6,7% лимонной, до 6,4% молочной, до 2,5% янтарной кислоты, а также следовые количества винной и уксусной кислот.

Таким образом, для получения фруктового сусла без корректировки сахаристости и кислотности можно рекомендовать плоды сортов яблони Красноярский сеянец, Красная гроздь, Краса Бурятии, Лада, Уральское наливное и Фонарик.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Tsoupras A., Moran D., Lordan R., Zabetakis I. Functional properties of the fermented alcoholic beverages: apple cider and beer // Functional foods and their implications for health promotion / eds I. Zabetakis, A.B. Tsoupras, R. Lordan, D.P. Ramji. Academic Press, 2023. P. 319–339. DOI: 10.1016/B978-0-12-823811-0.00013-4.
2. Бабаева М.В., Кулаков В.Г., Иванов А.В. Анализ отрасли плодово-ягодного виноделия на территории РФ // Агропромышленный комплекс: состояние, проблемы, перспективы: сб. статей XV Междунар. науч.-практ. конф. Пенза: Изд-во ПГАУ, 2020. С.184–186. EDN: FLHNDK.
3. Алексанян К.А., Ткачук Л.А. Технология производства

- фруктово-ягодных натуральных вин: монография. Минск: Беларуская навука, 2012. 305 с.
4. Ćakar U., Petrović A., Pejin B., Ćakar M., Živković M., Vajs V., et al. Fruit as a substrate for a wine: a case study of selected berry and drupe fruit wines // Scientia Horticulturae. 2019. Vol. 244. P. 42–49. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.09.020.
 5. Pando Bedriñana R., Picinelli Lobo A., Rodríguez Madrera R., Suárez Valles B. Characteristics of ice juices and ciders made by cryo-extraction with different cider apple varieties and yeast strains // Food Chemistry. 2020. Vol. 310. P. 125831. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125831.

6. Swami S.B., Thakor N.J., Divate A.D. Fruit wine production: a review // *Journal of Food Research and Technology*. 2014. Vol. 2, no. 3. P. 93–100.
7. Calugar P.C., Coldea T.E., Salantă L.C., Pop C.R., Pasqualone A., Burja-Udrea C., et al. An overview of the factors influencing apple cider sensory and microbial quality from raw materials to emerging processing technologies // *Processes*. 2021. Vol. 9, no. 3. P. 502. DOI: 10.3390/pr9030502.
8. Агеева Н.М., Ульяновская Е.В., Ширшова А.А., Тихонова А.Н., Храпов А.А., Чернуцкая Е.А. Физико-химические показатели сидров различных производителей // *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2023. N 79 (1). С. 242–252. DOI: 10.30679/2219-5335-2023-1-79-242-252. EDN: KARHGN.
9. Ostrom M.R., Conner D.S., Tambet H., Smith K.S., Serrine J.R., Howard P.H., et al. Apple grower research and extension needs for craft cider // *American Society for Horticultural Science*. 2022. Vol. 32, no. 2. P. 147–157. DOI: 10.21273/HORTTECH04827-21.
10. Weide J.V., van Nocker S., Gottschalk C. Meta-analysis of apple (*Malus × domestica* Borkh.) fruit and juice quality traits for potential use in hard cider production // *Plants, People, Planet*. 2022. Vol. 4, no. 5. P. 463–475. DOI: 10.1002/ppp3.10262.
11. Bortolini D.G., Benvenuti L., Demiate I.M., Nogueira A., Alberti A., Ferreira Zielinski A.A. A new approach to the use of apple pomace in cider making for the recovery of phenolic compounds // *LWT*. 2020. Vol. 126. P. 109316. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109316.
12. Włodarska K., Pawlak-Lemańska K., Górecki T., Sikorska E. Classification of commercial apple juices based on multivariate analysis of their chemical profiles // *International Journal of Food Properties*. 2017. Vol. 20, no. 8. P. 1773–1785. DOI: 10.1080/10942912.2016.1219367.
13. Barker B.T.P. The production of cider fruit on bush trees – vintage quality trials // *Annual Report of the Long Ashton Research Station*. 1943. P. 124–135.
14. Lea A.G.H., Drilleau J.-F. *Cidermaking* // *Fermented Beverage Production* / eds A.G.H. Lea, J.R. Piggott. New York: Springer New York, 2003. P. 59–87. DOI: 10.1007/978-1-4615-0187-9_4.
15. Delgado Á. García-Fernández B., Gómez-Cortecero A., Dapena E. Susceptibility of cider apple accessions to European canker – comparison between evaluations in field planted trees and rapid screening tests // *Plants*. 2022. Vol. 11, no. 9. P. 1145. DOI: 10.3390/plants11091145.
16. Lahaye M., Thoulouze L., Calatraba M., Gauclain T., Falourd X., Le-Quere J.-M., et al. A multimodal and multiscale investigation of factors affecting the juice yield of cider apples // *Food Chemistry*. 2023. Vol. 420. P. 135649. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.135649.
17. Van Lanen A.L. *The Washington apple: orchards and the development of industrial agriculture*. Norman: University of Oklahoma Press, 2022. Vol. 7. 286 p.
18. Кузьмина Е.И., Егорова О.С., Акбулатова Д.Р. Сидры в России и за рубежом. Сырье // *Пищевая промышленность*. 2022. N 12. С. 87–91. DOI: 10.52653/PPI.2022.12.12.018. EDN: OZBVNH.
19. Левгерова Н.С., Салина Е.С., Сидорова И.А., Седов Е.Н., Янчук Т.В. Технологические показатели плодов гибридных подвоев яблони и перспективы их использования в производстве сидра // *Современное садоводство*. 2021. N 3. С. 1–10. DOI: 10.52415/23126701_2021_0301. EDN: LJENTG.
20. Причко Т.Г., Чалая Л.Д. Технические и биохимические особенности плодов новых перспективных сортов яблони как сырья для переработки // *Научные труды Государственного научного учреждения Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского института садоводства и виноградарства Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2014. Т. 5. С. 190–195. EDN: SHVJEZ.
21. Ширшова А.А., Агеева Н.М., Бирюкова С.А. Исследование химического состава яблок различных сортов, произрастающих в хозяйствах Краснодарского края // *Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий*. 2020. Т. 82. N 2. С. 131–136. DOI: 10.20914/2310-1202-2020-2-131-136. EDN: ANBFGV.
22. Кох Д.А., Типсина Н.Н., Кох Ж.А. Способы переработки мелкоплодных яблок в пюре // *Вестник КрасГАУ*. 2016. N 3. С. 67–73. EDN: VQWAGT.
23. Кох Д.А. Исследование химического состава сока из плодов мелкоплодных яблонь, произрастающих на территории Красноярского края // *Ползуновский вестник*. 2021. N 3. С. 30–34. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2021.03.004. EDN: KTMQED.
24. Наумова Н.Л., Лукин А.А., Слепнёва Т.Н., Велисевич Е.А. Биохимический состав плодов яблонь районированных сортов, произрастающих в разных агроценозах // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2023. Т. 13. N 2. С. 255–262. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-2-255-262. EDN: FPSKAN.
25. Макаренко С.А. Сравнительная оценка биохимии плодов яблони алтайских сортов как источника питательных и биологически активных веществ // *Химия растительного сырья*. 2021. N 3. С. 245–252. DOI: 10.14258/jcprm.2021039177. EDN: VDTBUT.
26. Супрун Н.П., Гусакова Г.С., Раченко М.А. Ферментативный катализ яблочной мезги // *Химия растительного сырья*. 2023. N 1. С. 307–312. DOI: 10.14258/jcprm.20230111067. EDN: CFMZFK.
27. *Методы технохимического контроля в виноделии* / под ред. В.Г. Гержиковой. Симферополь: Таврида, 2002. 260 с.
28. Аникина Н.С., Гержикова В.Г., Гниломедова Н.В., Погорелов Д.Ю. *Методология идентификации подлинности вин*. Симферополь: Дайпи, 2017. 151 с. EDN: ZGMTHP.
29. Бурак Л.Ч., Завалей А.П. Создания продуктов с высокой антиоксидантной активностью с помощью полифенольных веществ яблок. Обзор // *The Scientific Heritage*. 2022. N. 84-1. С. 28–40 DOI: 10.24412/9215-0365-2022-84-1-28-40. EDN: COBTZT.
30. Górnas P., Mišina I., Olšteine A., Krasnova I., Pugajeva I., Laciš G., et al. Phenolic compounds in different fruit parts of crab apple: dihydrochalcones as promising quality markers of industrial apple pomace by-products // *Industrial Crops and Products*. 2015. Vol. 74. P. 607–612. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.05.030.
31. Wojdyło A., Oszmiański J. Antioxidant activity modulated by polyphenol contents in apple and leaves during fruit development and ripening // *Antioxidants*. 2020. Vol. 9, no. 7. P. 567. DOI: 10.3390/antiox9070567.
32. Вечер А.С., Юрченко Л.А. Сидры и яблочные игристые вина (химия и технология). М.: *Пищевая промышленность*, 1976. 135 с.
33. Gnilomedova N.V., Anikina N.S., Gerzhikova V.G.

Profile of sugars in a grape-wine system as the identifying indicator of the authenticity of wine products // *Foods and Raw Materials*. 2018. Vol. 6, no. 1. P. 191–200. DOI: 10.21603/2308-4057-2018-1-191-200.

34. Хоконов А.Б., Хоконова М.Б. Изменения химического состава сока яблок при созревании и хранении // *Биология в сельском хозяйстве*. 2022. N 3. С. 32–34. EDN: RBTFJM.

35. Alberti A., Ferreira Zielinski A.A., Couto M.,

Judacewski P., Igarashi Mafra L., Nogueira A. Distribution of phenolic compounds and antioxidant capacity in apples tissues during ripening // *Journal of Food Science and Technology*. 2017. Vol. 54. P. 1511–1518. DOI: 10.1007/s13197-017-2582-z.

36. Wei J., Zhang Y., Yuan Y., Dai L., Yue T. Characteristic fruit wine production via reciprocal selection of juice and non-*Saccharomyces* species // *Food Microbiology*. 2019. Vol. 79. P. 66–74. DOI: 10.1016/j.fm.2018.11.008.

REFERENCES

1. Tsoupras A., Moran D., Lordan R., Zabetakis I. Functional properties of the fermented alcoholic beverages: apple cider and beer. In: Zabetakis I., Tsoupras A.B., Lordan R., Ramji D.P. (eds). *Functional foods and their implications for health promotion*. Academic Press; 2023, p. 319–339. DOI: 10.1016/B978-0-12-823811-0.00013-4.

2. Babaeva M.V., Kulakov V.G., Ivanov A.V. Analysis of the fruit and berry wines industry on the territory of the Russian Federation. In: *Agropromyshlennyy kompleks: sostoyanie, problemy, perspektivy: sb. statei XV Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. = Agro-industrial complex: state, problems, prospects: Proceedings of the 15th International scientific and practical conference*. Penza: Penza State Agrarian University; 2020, p.184–186. (In Russian). EDN: FLHNDK.

3. Aleksanyan K.A., Tkachuk L.A. *Technology for the production of fruit and berry natural wines*. Minsk: Belaruskaya navuka; 2012, 305 p. (In Russian).

4. Čakar U., Petrović A., Pejin B., Čakar M., Živković M., Vajs V., et al. Fruit as a substrate for a wine: a case study of selected berry and drupe fruit wines. *Scientia Horticulturae*. 2019;244:42–49. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.09.020.

5. Pando Bedriñana R., Picinelli Lobo A., Rodríguez Madrera R., Suárez Valles B. Characteristics of ice juices and ciders made by cryo-extraction with different cider apple varieties and yeast strains. *Food Chemistry*. 2020;310:125831. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125831.

6. Swami S.B., Thakor N.J., Divate A.D. Fruit wine production: a review. *Journal of Food Research and Technology*. 2014;2(3):93–100.

7. Calugar P.C., Coldea T.E., Salantă L.C., Pop C.R., Pasqualone A., Burja-Udrea C., et al. An overview of the factors influencing apple cider sensory and microbial quality from raw materials to emerging processing technologies. *Processes*. 2021;9(3):502. DOI: 10.3390/pr9030502.

8. Ageyeva N.M., Ulyanovskaya E.V., Shirshova A.A., Tikhonova A.N., Khrapov A.A., Chernutskaya E.A. Physico-chemical parameters of ciders of various manufacturers. *Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit growing and viticulture of South Russia*. 2023;79(1):242–252. (In Russian). DOI: 10.30679/2219-5335-2023-1-79-242-252. EDN: KARHGN.

9. Ostrom M.R., Conner D.S., Tambet H., Smith K.S., Serrine J.R., Howard P.H., et al. Apple grower research and extension needs for craft cider. *American Society for Horticultural Science*. 2022;32(2):147–157. DOI: 10.21273/HORTTECH04827-21.

10. Weide J.V., van Nocker S., Gottschalk C. Meta-analysis of apple (*Malus × domestica* Borkh.) fruit and juice quality traits for potential use in hard cider production. *Plants, People, Planet*. 2022;4(5):463–475. DOI: 10.1002/ppp3.10262.

11. Bortolini D.G., Benvenuti L., Demiate I.M., Nogueira A., Alberti A., Ferreira Zielinski A.A. A new approach to the use

of apple pomace in cider making for the recovery of phenolic compounds. *LWT*. 2020;126:109316. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109316.

12. Włodarska K., Pawlak-Lemańska K., Górecki T., Sikorska E. Classification of commercial apple juices based on multivariate analysis of their chemical profiles. *International Journal of Food Properties*. 2017;20(8):1773–1785. DOI: 10.1080/10942912.2016.1219367.

13. Barker B.T.P. The production of cider fruit on bush trees – vintage quality trials, In: *Annual Report of the Long Ashton Research Station*. 1943, p. 124–135.

14. Lea A.G.H., Drilleau J.-F. Cidermaking. In: Lea A.G.H., Piggott J.R. (eds). *Fermented Beverage Production*. New York: Springer New York; 2003, p. 59–87. DOI: 10.1007/978-1-4615-0187-9_4.

15. Delgado Á. García-Fernández B., Gómez-Cortecero A., Dapena E. Susceptibility of cider apple accessions to European canker – comparison between evaluations in field planted trees and rapid screening tests. *Plants*. 2022;11(9):1145. DOI: 10.3390/plants11091145.

16. Lahaye M., Thoulouze L., Calatraba M., Gauclain T., Falourd X., Le-Quere J.-M., et al. A multimodal and multiscale investigation of factors affecting the juice yield of cider apples. *Food Chemistry*. 2023;420:135649. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.135649.

17. Van Lanen A.L. *The Washington apple: orchards and the development of industrial agriculture*. Norman: University of Oklahoma Press; 2022, vol. 7, 286 p.

18. Kuz'mina E.I., Egorova O.S., Akbulatova D.R. Ciders in Russia and abroad. Raw material. *Pishchevaya promyshlennost' = Food Industry*. 2022;12:87–91. (In Russian). DOI: 10.52653/PPI.2022.12.12.018. EDN: OZBVNH.

19. Levgerova N.S., Salina E.S., Sidorova I.A., Sedov E.N., Yanchuk T.V. Technological indicators of the fruits of hybrid apple rootstocks and the prospects of their use in the production of cider. *Sovremennoe sadovodstvo = Contemporary horticulture*. 2021;3:1–10. DOI: 10.52415/23126701_2021_030. EDN: LJEHTG.

20. Prichko T.G., Chalaya L.D. Technical and biochemical features of fruits of new perspective apple-tree's varieties as the raw material for processing. *Nauchnye trudy Gosudarstvennogo nauchnogo uchrezhdeniya Severo-Kavkazskogo zonal'nogo nauchno-issledovatel'skogo instituta sadovodstva i vinogradarstva Rossijskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk*. 2014;5:190–195. (In Russian). EDN: SHVJEZ.

21. Shirshova A.A., Ageeva N.M., Birukova S.A. A study of the chemical composition of apples of various varieties growing on the farms of the Krasnodar Territory. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernykh tekhnologii = Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*.

2020;82(2):131-136. (In Russian). DOI: 10.20914/2310-1202-2020-2-131-136. EDN: ANBFGGB.

22. Koch D.A., Tipsina N.N., Koch Zh.A. The method of processing small-fruited apples in mash. *Vestnik KrasGAU = Bulletin of KrasGAU*. 2016;3:67-73. (In Russian). EDN: VQWAGT.

23. Koch D.A. Research of chemical composition of juice from fruits of small-fruited apple trees growing in territory of Krasnoyarsk Krai. *Polzunovskii vestnik*. 2021;3:30-34. (In Russian). DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2021.03.004. EDN: KTMQED.

24. Naumova N.L., Lukin A.A., Slepneva T.N., Velisevich E.A. Biochemical composition of zoned apple varieties growing in different agrocenoses. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(2):255-262. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-2-255-262. EDN: FPSKAN.

25. Makarenko S.A. Comparative assessment of the biochemistry of apple fruits of Altai varieties as a source of nutritious and biologically active substances. *Khimija rastitel'nogo syr'ja = Chemistry of plant raw material*. 2021;3:245-252. (In Russian). DOI: 10.14258/jcprm.2021039177. EDN: BDTBUT.

26. Suprun N.P., Gusakova G.S., Rachenko M.A. The apple pulp enzymatic catalysis. *Khimija rastitel'nogo syr'ja = Chemistry of plant raw material*. 2023;1:307-312. (In Russian). DOI: 10.14258/jcprm.20230111067. EDN: CFMZFK.

27. Gerzhikova V.G. *Methods of techno-chemical control in winemaking*. Simferopol: Tavrida; 2002, 260 p. (In Russian).

28. Anikina N.S., Gerzhikova V.G., Gnilomedova N.V., Pogorelov D.Yu. *Methodology for identifying wine authenticity*. Simferopol: Daipi; 2017, 151 p. (In Russian). EDN: ZGMTHP.

29. Burak L., Zavalei A. Creation of products with high antioxidant activity using apple polyphenolic substances.

Overview. *The Scientific Heritage*. 2022;84-1:28-40. (In Russian). DOI: 10.24412/9215-0365-2022-84-1-28-40. EDN: COBBTZ

30. Górnas P., Mišina I., Olšteine A., Krasnova I., Pugajeva I., Lacis G., et al. Phenolic compounds in different fruit parts of crab apple: dihydrochalcones as promising quality markers of industrial apple pomace by-products. *Industrial Crops and Products*. 2015;74:607-612. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.05.030.

31. Wojdyło A., Oszmiański J. Antioxidant activity modulated by polyphenol contents in apple and leaves during fruit development and ripening. *Antioxidants*. 2020;9(7):567. DOI: 10.3390/antiox9070567.

32. Vecher A.S., Yurchenko L.A. *Ciders and sparkling apple wines (chemistry and technology)*. Moscow: Pishchevaya promyshlennost'; 1976, 135 p. (In Russian).

33. Gnilomedova N.V., Anikina N.S., Gerzhikova V.G. Profile of sugars in a grape-wine system as the identifying indicator of the authenticity of wine products. *Foods and Raw Materials*. 2018;6(1):191-200. DOI: 10.21603/2308-4057-2018-1-191-200.

34. Khokonov A.B., Khokonova M.B. Changes in the chemical composition of apple juice during maturation and storage. *Biologiya v sel'skom khozyaistve = Biology in Agriculture*. 2022;3:32-34. (In Russian). EDN: RBTFJM.

35. Alberti A., Ferreira Zielinski A.A., Couto M., Judacewski P., Igarashi Mafra L., Nogueira A. Distribution of phenolic compounds and antioxidant capacity in apples tissues during ripening. *Journal of Food Science and Technology*. 2017;54:1511-1518. DOI: 10.1007/s13197-017-2582-z.

36. Wei J., Zhang Y., Yuan Y., Dai L., Yue T. Characteristic fruit wine production via reciprocal selection of juice and non-*Saccharomyces* species. *Food Microbiology*. 2019;79:66-74. DOI: 10.1016/j.fm.2018.11.008.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Супрун Наталья Петровна,

аспирант,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
✉ suprun_np@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6010-4221>

Гусакова Галина Семеновна,

к.с.-х.н., доцент,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
gusakova58@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9222-5295>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Natalya P. Suprun,

Postgraduate Student,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉ suprun_np@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6010-4221>

Galina S. Gusakova,

Cand. Sci. (Agriculture), Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
gusakova58@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9222-5295>

Аникина Надежда Станиславовна,
д.т.н., главный научный сотрудник,
заведующая лабораторией,
Всероссийский национальный
научно-исследовательский институт
виноградарства и виноделия «Магарач» РАН,
298600, Республика Крым, г. Ялта,
ул. Кирова, 31, Российская Федерация,
hv26@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5682-3426>

Nadezhda S. Anikina,
Dr. Sci. (Engineering), Chief Researcher,
Head of Laboratory,
All-Russian National Research Institute
of Vinegrouing and Winemaking, “Magarach” RAS”,
31, Kirov St., Yalta, 298600, Republic of Crimea,
Russian Federation,
hv26@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5682-3426>

Сластья Евгений Анатольевич,
к.б.н., научный сотрудник,
Всероссийский национальный
научно-исследовательский институт
виноградарства и виноделия «Магарач» РАН,
298600, Республика Крым, г. Ялта,
ул. Кирова, 31, Российская Федерация,
phyton.crimea@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-6750-9587>

Evgenii A. Slastyа,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
All-Russian National Research Institute
of Vinegrouing and Winemaking, “Magarach” RAS”,
31, Kirov St., Yalta, 298600, Republic of Crimea,
Russian Federation,
phyton.crimea@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-6750-9587>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 20.03.2023.
Одобрена после рецензирования 07.11.2023.
Принята к публикации 30.11.2023.

Information about the article

The article was submitted 20.03.2023.
Approved after reviewing 07.11.2023.
Accepted for publication 30.11.2023.

Научная статья

УДК 676.16

EDN: KSVUTY

DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-621-630



Химический состав волокна и костры лубяных культур и продуктов их щелочной делигнификации

А.А. Корчагина, Е.К. Гладышева, В.В. Будаева, Е.А. Скиба✉

Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, г. Бийск, Российская Федерация

Аннотация. Данная работа посвящена исследованию химического состава волокна и костры льна-долгунца и конопли, полученных в России в промышленных условиях, а также химического состава продуктов щелочной делигнификации перечисленных объектов. Щелочная делигнификация осуществлялась при атмосферном давлении 4%-м раствором гидроксида натрия, химический состав определялся «мокрыми» методами. Химический состав костры конопли российских производителей исследован впервые. Установлено, что в исследованных объектах массовая доля целлюлозы составляет от 42,3 до 66,1%, а после щелочной делигнификации выход продуктов достигает 47,0–50,0%. Выявлено сходство поведения волокна льна-долгунца и конопли при щелочной делигнификации: содержание целлюлозы увеличивается в 1,2–1,3 раза, содержание пентозанов снижается в 4,3–6,3 раза, а содержание лигнина практически не изменяется. Поведение костры льна-долгунца и конопли кардинально различается при щелочной делигнификации. Костра льна-долгунца устойчива к щелочной делигнификации: содержание целлюлозы увеличивается в 1,4 раза, содержание пентозанов снижается в 4,2 раза, содержание лигнина увеличивается в 1,4 раза, что обусловлено природой лигнина. Костра конопли легко поддается щелочной делигнификации: содержание целлюлозы увеличивается в 1,8 раза, содержание пентозанов снижается в 5,8 раза, содержание лигнина снижается в 2,2 раза; в продукте щелочной делигнификации содержится 87,3% целлюлозы, 5,4% пентозанов, 8,2% лигнина. Прогнозируется высокая перспективность использования костры конопли для химической и биотехнологической трансформации.

Ключевые слова: лен-долгунец, конопля, волокно, костра, щелочная делигнификация

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках госзадания Института проблем химико-энергетических технологий СО РАН (госрегистрация темы проекта 121061500030-3).

Для цитирования: Корчагина А.А., Гладышева Е.К., Будаева В.В., Скиба Е.А. Химический состав волокна и костры лубяных культур и продуктов их щелочной делигнификации // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 621–630. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-621-630. EDN: KSVUTY.

CHEMICAL TECHNOLOGY

Original article

Chemical composition of fiber and shive in bast-fiber crops and the products of their alkaline delignification

Anna A. Korchagina, Evgenia K. Gladysheva,

Vera V. Budaeva, Ekaterina A. Skiba✉

Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies SB RAS, Biysk, Russian Federation

Abstract. The present article examines the chemical composition of fiber and shive from fiber flax and hemp obtained in Russia under industrial conditions, as well as that of the products of their alkaline delignification. Alkaline delignification was carried out at atmospheric pressure with a 4% sodium hydroxide solution; the chemical composition was determined via wet analysis. The chemical composition of hemp shive from Russian producers was studied for the first time. In the studied objects, the mass fraction of cellulose was found to range from 42.3 to 66.1%, and after alkaline delignification, the yield of products reached 47.0–50.0%. The behavior of fiber flax and hemp fiber

© Корчагина А.А., Гладышева Е.К., Будаева В.В., Скиба Е.А., 2023

is similar during alkaline delignification: cellulose content increases by 1.2–1.3 times, pentosan content decreases by 4.3–6.3 times, and lignin content is virtually the same. The behavior of fiber flax and hemp shive is dramatically different during alkaline delignification. The shive of fiber flax is resistant to alkaline delignification: cellulose content increases by 1.4 times, pentosan content decreases by 4.2 times, and lignin content increases by 1.4 times, which is due to the nature of lignin. Hemp shive is easily alkaline delignified: cellulose content increases by 1.8 times; the content of pentosans decreases by 5.8 times, and lignin content decreases by 2.2 times; the product of alkaline delignification contains cellulose (87.3%), pentosans (5.4%), and lignin (8.2%). The use of hemp shive for chemical and biotechnological transformation is expected to have high prospects.

Keywords: fiber flax, hemp, fiber, shive, alkaline delignification

Funding. The Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project no. 121061500030-3) supported the work.

For citation: Korchagina A.A., Gladysheva E.K., Budaeva V.V., Skiba E.A. Chemical composition of fiber and shive in bast-fiber crops and the products of their alkaline delignification. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):621-630. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-621-630. EDN: KSVUTY.

ВВЕДЕНИЕ

В современных условиях экологически ориентированной индустрии использование биомассы легкового возобновляемого растительного сырья является одним из ключевых аспектов устойчивого экономического развития. Лигноцеллюлозная биомасса является наиболее распространенным ресурсом на земле и имеет ряд преимуществ: быструю возобновляемость, высокую производительность в промышленных масштабах, биоразлагаемость и всемирную доступность. Среди легкового возобновляемого растительного сырья особый интерес представляют две лубяные культуры, широко распространенные на евразийском континенте: лен-долгунец и конопля [1–4].

Лен-долгунец и конопля характеризуются коротким периодом вегетации: период прироста биомассы льна-долгунца составляет от 77 до 100 дней [5], а конопля – около 105 дней [2, 6]. Производительность льна-долгунца в мире в среднем составляет 5,6 т_{га}⁻¹ (в расчете на сухое вещество), в России – от 1,8 до 4,6 т_{га}⁻¹, при этом около 70–72% приходится на древесную часть (костру). Производительность конопля в среднем составляет 14,5 т_{га}⁻¹ (в расчете на сухое вещество), при этом 70–75% приходится на конопляную костру.

Лен и конопля подвергаются различным методам дегумирования (вымачивание, осмотическое и ферментативное дегумирование) с последующим отделением волокна от костры [7]. Массовая доля целлюлозы в волокне льна-долгунца составляет 62–79% [8, 9], а в волокне конопля – около 40–57% [10]. Массовая доля целлюлозы в костре обеих культур гораздо меньше: у льна-долгунца она равняется 31–37% [11, 12], у конопля – 33–37% [10].

Благодаря высокому содержанию в биомассе льна-долгунца и конопля основного компонента – целлюлозы, мировые исследователи интенсивно занимаются переработкой волокон обеих культур в востребованные и ценные продукты: целлюлозу [13–16], микрокристаллическую целлюлозу [17], наноцеллюлозу [18], метилцеллюлозу [19], натрий-карбоксиметилцеллюлозу [20], нитраты целлюлозы [21, 22], гидратцеллюлозное волокно [5] и регенерированные волокна [23], биоконсерваты и биопластики [1, 24]. Волокна льна и конопля являются хорошей альтернативой древесине для производства бумаги [25], могут использоваться в качестве сорбирующего

материала [26] и даже пищевых волокон [27]. Имеются сведения об использовании биомассы льна и конопля для производства биоэтанола и биогаза [4, 28, 29].

Переработка костры льна и конопля исследована слабо, но указанная задача очень важна, так как ее решение позволит повысить коэффициент использования лубяных культур. Из костры льна получают целлюлозу [10], микрокристаллическую целлюлозу [30], сорбенты [31], целлюлозосодержащие полуфабрикаты [14] и биоразлагаемую упаковку [32]. Костра конопля является недорогим сырьем для производства разлагаемых биоматериалов [33], костробетона [34], утеплителей и кирпичей [34, 35], сырьем для получения гуминово-фульватного комплекса [36], а также может использоваться в качестве дешевого мелиоранта [37].

Известно, что при переработке любого целлюлозосодержащего сырья критической стадией является его предобработка, направленная на извлечение отдельных компонентов (целлюлозы, гемицеллюлоз, лигнина и др.) из прочной лигноцеллюлозной матрицы. В данном исследовании для предобработки лубяных культур использован метод щелочной делигнификации, являющийся классическим методом для любого целлюлозосодержащего сырья [38, 39]. Нами накоплен богатый опыт переработки нетрадиционного целлюлозосодержащего сырья, т.е. не древесного и не лубяного, в продукты технической химии [40] и биоконверсии [41, 42]. Общей начальной технологической стадией этих процессов является щелочная делигнификация.

Целью настоящей работы служило исследование химического состава волокон и костры льна-долгунца и конопля двух российских производителей, а также продуктов щелочной делигнификации (ПЩД) лубяного сырья для сравнительной оценки возможности их использования в экономике страны. Приоритетным являлось исследование химического состава отходов переработки лубяных культур: коротковолокнистой фракции льна-долгунца, костры льна-долгунца и костры конопля, а также исследование поведения отходов переработки лубяных культур при щелочной делигнификации. Костра конопля российских производителей подробно исследована впервые.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Было использовано четыре объекта исследования: коротковолокнистая фракция и костра из льна-долгунца

(*Linum usitatissimum* L.), предоставленные АО «Бийская льняная компания» (г. Бийск, Алтайский край, Россия) и являющиеся отходами производства; волокно и костра из конопли (*Cannabis sativa* L.), предоставленные ООО «Мордовские пенькозаводы» (г. Инсар, Республика Мордовия, Россия). В таблице приведен химический состав объектов исследования и продуктов их ПЩД, определенный по общепринятым в мировой практике «мокрым» методам [41] на сертифицированном аналитическом оборудовании. Определение содержания целлюлозы проводилось методом Кюршнера, который основан на обработке исходных объектов исследования спиртовым раствором азотной кислоты и удалении лигнина, экстрактивных веществ и гемицеллюлоз. Определение содержания кислотонерастворимого лигнина проводилось путем обработки исходных объектов исследования концентрированными минеральными кислотами (серной и соляной). Определение содержания пентозанов основано на образовании фурфура из пентозанов, полученных при обработке исходных объектов исследования 13%-м раствором соляной кислоты при нагревании, и определении отогнанного фурфура спектрофотометрическим методом. Определение содержания золы проводилось путем сжигания исходных объектов исследования в фарфоровом тигле с последующим прокаливанием остатка в муфельной печи. Определение содержания жировосковой фракции (ЖВФ) проводилось путем многократного экстрагирования исходных объектов исследования хлористым метилом с последующим выпариванием экстракта, сушкой и взвешиванием нелетучего остатка [41].

Процесс щелочной делигнификации исходных объектов исследования (масса загрузки составила: для коротковолокнистой фракции льна-долгунца и волокна конопли – 100 г, для костры льна и конопли – 200 г)

проводили путем обработки раствором 4%-го гидроксида натрия при температуре от 90 до 96 °С и атмосферном давлении в течение 6 ч с последующим отжимом на вакуум-фильтре и промывкой до нейтральной реакции промывных вод [43]. Гидромодуль щелочной делигнификации составил 1:20. Степень извлечения компонента в твердую фазу рассчитана следующим образом:

$$S = \frac{M_{Д_{ПЩД}} \times \eta_{ПЩД}}{M_{Д_{исх}}},$$

где S – степень извлечения, %; $M_{Д_{ПЩД}}$ – массовая доля компонента в ПЩД, %; $M_{Д_{исх}}$ – массовая доля компонента в исходном объекте исследования, %; $\eta_{ПЩД}$ – выход ПЩД, %.

Работа выполнена с использованием приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнительный анализ химического состава исходных объектов исследования (см. таблицу), показал, что наибольшую массовую долю целлюлозы по Кюршнеру имеет волокно конопли (76,5%), а наименьшую – костра льна-долгунца (42,3%). Наибольшая массовая доля пентозанов содержится в костре конопли (22,8%), наименьшая – в волокне льна-долгунца (5,2%). Наибольшую массовую долю кислотонерастворимого лигнина содержит костра льна-долгунца (26,4%), наименьшую – волокно конопли (2,5%). Наибольшую массовую долю золы содержит волокно льна-долгунца (3,20%), наименьшую – костра конопли (2,3%), все исходные объекты исследования характеризуются низким содержанием ЖВФ, наибольшее же ее значение – 2,4% – наблюдается для костры льна-долгунца. Содержание целлюлозы в волокне льна (66,1%) меньше, чем в волокне конопли

Химический состав исходных объектов исследования и продуктов их щелочной делигнификации

Chemical composition of research objects and products of their alkaline delignification

Наименование образца	Выход, %	Массовая доля компонентов*, %				
		целлюлоза по Кюршнеру	кислотонерастворимый лигнин	пентозаны	зола	жировосковая фракция
Исходные объекты исследования						
Коротковолокнистая фракция льна-долгунца	–	66,1±0,5	10,7±0,5	5,2±0,5	3,20±0,05	1,67±0,05
Костра льна-долгунца	–	42,3±0,5	26,4±0,5	18,5±0,5	2,80±0,05	1,76±0,05
Волокно конопли	–	76,5±0,5	5,5±0,5	2,5±0,5	2,50±0,05	2,40±0,05
Костра конопли	–	47,3±0,5	17,7±0,5	22,8±0,5	2,30±0,05	0,46±0,05
Продукты щелочной делигнификации						
ПЩД из коротковолокнистой фракции льна-долгунца	50,0	89,0±0,5	9,7±0,5	1,2±0,5	0,10±0,05	1,30±0,05
ПЩД из костры льна-долгунца	47,0	59,0±0,5	36,7±0,5	3,2±0,5	0,70±0,05	1,40±0,05
ПЩД из волокна конопли	47,0	91,8±0,5	5,7±0,5	0,4±0,5	0,80±0,05	0,80±0,05
ПЩД из костры конопли	47,5	87,3±0,5	8,2±0,5	5,4±0,5	1,80±0,05	0,40±0,05
Степень извлечения компонента в твердую фазу, %						
Коротковолокнистая фракция льна-долгунца	–	67,4	45,3	11,5	1,6	38,9
Костра льна-долгунца	–	66,1	65,3	8,1	11,8	37,4
Волокно конопли	–	56,4	48,7	7,5	15,0	15,7
Костра конопли	–	87,7	22,0	11,3	37,2	41,3

Примечание. * – в пересчете на абсолютно сухое сырье.

(76,5%), что связано с использованием коротковолокнистой фракции льна-долгунца. В целом химический состав волокна и костры обеих лубяных культур похожи.

Химический состав волокна льна-долгунца, согласно различным литературным источникам, для длиноволокнистой фракции представлен следующим образом: целлюлоза – 62,0–79,0%, гемицеллюлозы – 11,0–20,6%, лигнин 2,0–5,0% [8, 9]. В нашей работе определено повышенное значение массовой доли лигнина, что связано с использованием коротковолокнистой фракции, являющейся отходом производства. В литературе для костры льна-долгунца приводятся следующие показатели: целлюлоза – 30,7–37,5%, лигнин – 32,8–33,1%, зола – 1,7% [11, 12]. Костра льна-долгунца, предоставленная АО «Бийская льняная компания», имеет повышенное содержание целлюлозы и пониженное содержание лигнина.

Химический состав волокна конопли, представленный в различных литературных источниках, составляет: целлюлозы – 40,0–57,5%, гемицеллюлоз – 5,1–20,0%, лигнина – 12,4–21,9%, золы – 2,6–7,6% [9, 10]. Волокно конопли, предоставленное ООО «Мордовские пенькозаводы», характеризуется высокой массовой долей целлюлозы и низкими значениями массовой доли лигнина и пентозанов, т.е. является высококачественным. В зарубежной литературе для костры конопли приводится следующий компонентный состав: целлюлоза – 32,6–37,3%, гемицеллюлозы – 25,0–28,0%, лигнин – 17,5–23,9% [10, 23]. Костра конопли из Республики Мордовии превосходит мировые аналоги: целлюлозы в ней больше, а гемицеллюлоз меньше.

Результаты определения массовой доли ЖВФ для всех четырех исходных объектов исследования и их ПЩД получены впервые.

Предварительная химическая обработка лубяных культур методом щелочной делигнификации обеспечивает высокий выход всех четырех ПЩД (47,0–50,0%). В результате анализа химического состава ПЩД было установлено, что предварительная обработка трех объектов исследования (коротковолокнистой фракции льна-долгунца, волокна и костры конопли) позволяет получить образцы ПЩД с массовой долей целлюлозы от 89,0 до 91,8%, т.е. наблюдается концентрирование целлюлозы в продуктах щелочной обработки. Исключение составил ПЩД костры льна-долгунца, в котором массовая доля целлюлозы составляет 59,0%, в этом же образце зафиксирована наибольшая массовая доля кислотонерастворимого лигнина – 36,7%. По сравнению с исходными объектами исследования массовая доля целлюлозы во всех полученных образцах ПЩД увеличивается в 1,2–1,8 раза, наблюдается снижение массовой доли пентозанов в 4,2–6,3 раза.

Анализ степени извлечения компонентов показал, что лидером среди четырех исходных объектов исследования является костра конопли со степенью извлечения целлюлозы в образце ПЩД 87,7%, в то время как диапазон степени извлечения для трех других объектов исследования составил 56,4–67,4%. При этом степень извлечения лигнина в твердую фазу для исследованных образцов составила 22,0–45,3%, исключением стал ПЩД костры льна-долгунца, для которого степень извлечения лигнина в твердую фазу составляет 65,3%.

Относительно степени извлечения пентозанов получен

узкий диапазон для всех четырех объектов – 7,5–11,5%, что подтверждает эффективность метода щелочной делигнификации для удаления пентозанов из любого целлюлозосодержащего сырья, в том числе лубяного [44, 45]. Весьма сложно объяснить широкий диапазон значений степени извлечения золы 1,6–37,2% – возможно, это явление связано с различной химической природой зольных компонентов, например, есть представление о легкости удаления кислотонерастворимых компонентов золы методом щелочной обработки, что наблюдалось для коротковолокнистой фракции льна-долгунца [38]. Диапазон степени извлечения ЖВФ также широк: он составляет 15,7–41,3%. Как правило, использование щелочной обработки сырья позволяет значительно удалить ЖВФ, но в данном случае наиболее успешной в этом отношении была обработка волокна конопли. При обработке гидроксидом натрия ЖВФ происходит гидролиз жировых компонентов и водорастворимые продукты удаляются из твердой фазы.

Механизм щелочной делигнификации заключается в деэтерификации (омылении) межмолекулярных сложноэфирных связей между гемицеллюлозами и лигнином [38]. В результате омыления происходит расщепление этих связей, гидролиз гемицеллюлоз, частичный гидролиз аморфной части микрофибрилл целлюлозы. Особенностью данного способа является частичное растворение лигнина в щелочном растворе [39]. По определению щелочная делигнификация должна приводить к снижению массовой доли лигнина в ПЩД, однако при воздействии на лубяные культуры это наблюдается не всегда.

Поведение волокна обеих лубяных культур при щелочной делигнификации имеет общие тенденции. В образцах ПЩД коротковолокнистой фракции льна-долгунца и волокна конопли массовые доли лигнина остаются практически на том же уровне 9,7 и 5,7% соответственно. Такое явление наблюдали и другие исследователи [44, 45]. Объяснить его можно тем, что щелочная обработка волокон с низким содержанием лигнина направлена в основном на удаление низкомолекулярных соединений и гемицеллюлоз, но не самого лигнина [44, 45]. Для эффективного удаления лигнина необходимо сочетать щелочную делигнификацию с другими видами обработки, например с обработкой сульфитом натрия [44].

Поведение костры льна-долгунца и конопли при щелочной делигнификации кардинально различается. При обработке костры льна-долгунца происходит увеличение массовой доли лигнина в образце ПЩД в 1,4 раза по сравнению с кострой. На первый взгляд это аномальное поведение для целлюлозосодержащего сырья. Тем не менее подобное явление исследователи наблюдали и ранее: отмечалось увеличение лигнина в 1,1 раза после предварительной обработки гидроксидом натрия при температуре 160 °С и давлении 0,2 МПа [46]. Предположительно увеличение массовой доли лигнина после щелочной делигнификации связано с особой структурой лигнина в костре льна-долгунца [44] и концентрированием лигнина за счет эффективного удаления пентозанов и других компонентов. Костра конопли в процессе делигнификации ведет себя как типичное недревесное целлюлозосодержащее сырье. В образце ПЩД костры конопли массовая доля лигнина составила 8,2%, т.е. наблюдается эффективное снижение содержания лигнина в 2,2 раза.

Нами были использованы мягкие условия щелочной делигнификации: 4%-й раствор гидроксида натрия и атмосферное давление. Предобработка всех объектов исследования проводилась в одинаковых режимах, хотя мы понимали, что для эффективной делигнификации волокна режимы должны быть более жесткими. Однако выделение целлюлозы из волокна льна-долгунца и конопли является хорошо проработанным в мире направлением – нас как специалистов в области переработки недревесного сырья больше интересовала костра и отходы льняного производства в виде коротковолокнистой фракции, которая не использовалась для выделения целлюлозы. В связи с этим одинаковые условия щелочной делигнификации для разных объектов исследования были использованы нами для выявления разницы природы сырья и результаты оказались полезными для понимания отличий механизма щелочной делигнификации волокнистого сырья по сравнению с кострой.

Сравнить результаты полученных экспериментальных данных с литературными данными оказалось достаточно сложной задачей, так как, несмотря на достаточно широкую распространенность щелочной обработки как для нативной биомассы льна и конопли, так и для выделенных отдельно волокна и костры этих культур, авторы не приводят полного химического состава ПЩД. Полученные продукты используются преимущественно в качестве компонента бумаги или входят в состав композитных материалов, поэтому исследователи уделяют внимание не химическому составу, а механическим характеристикам продуктов. Исходя из литературных данных о возможности применения продуктов щелочной обработки, можно прогнозировать успешность получения полуфабрикатов бумажно-картонного производства, фибриллированных и композитных материалов, в том числе таргетных, на основе образцов ПЩД волокна льна-долгунца и конопли [8, 9, 11, 16, 44, 47, 48].

Другим направлением является биотехнологическая переработка целлюлозосодержащего сырья с целью получения продуктов с высокой добавленной стоимостью [10]. Экспериментально подтверждена возможность получения биоэтанола с концентрацией 10,5 г/л из биомассы конопли, предварительно обработанной методом щелочной делигнификации (1,5–3,0%-й раствор гидроксида натрия) [3, 4]. Таким образом, проведенные исследования имеют высокий потенциал для дальнейшего практического применения. Волокно лубяных культур – это слишком ценное сырье для превращения его в продукты микробного синтеза, но для переработки костры это очень перспективное направление. Особенности химического состава костры

льна-долгунца (36,7% лигнина) исключают использование ПЩД из нее для переработки по биотехнологическому маршруту. Химический состав и высокий выход ПЩД костры конопли позволяют дать оптимистический прогноз для дальнейшей трансформации ПЩД в раствор редуцирующих сахаров методом ферментативного гидролиза и в продукты микробиологического синтеза, авторская технология которых хорошо отработана нами на шелухе овса и мискантусе сахароцветном. При этом успешно были синтезированы биоэтанол [41], бактериальная целлюлоза [42], молочная кислота [49], кормовой белок [50].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе исследования впервые проведен сравнительный анализ химического состава четырех объектов исследования: коротковолокнистой фракции и костры льна-долгунца, являющихся отходом производства АО «Бийская льняная компания», а также волокна и костры конопли производства ООО «Мордовские пенькозаводы». Установлено, что все исследованные объекты характеризуются высокой массовой долей целлюлозы от 42,3 до 66,1%. Впервые исследован полный химический состав костры конопли российского производителя и установлено, что образец превосходит мировые аналоги: в нем зафиксировано повышенное содержание целлюлозы (47,3%) и пониженное содержание пентозанов (22,8%), содержание же лигнина (17,7%) в костре конопли российского производителя соответствует мировым аналогам. Выход ПЩД перечисленных объектов исследования достигает 47,0–50,0%.

Выявлено сходство поведения волокна льна-долгунца и конопли при щелочной делигнификации: содержание целлюлозы увеличивается в 1,2–1,3 раза, содержание пентозанов снижается в 4,3–6,3 раза, а содержание лигнина практически не изменяется.

Поведение при щелочной делигнификации костры льна-долгунца и конопли принципиально различается. Костра льна-долгунца устойчива к щелочной делигнификации: содержание целлюлозы в ней увеличивается в 1,4 раза, содержание пентозанов снижается в 4,2 раза, содержание лигнина увеличивается в 1,4 раза, что обусловлено природой лигнина. Костра конопли легко поддается щелочной делигнификации: содержание целлюлозы увеличивается в 1,8 раза, содержание пентозанов снижается в 5,8 раза, содержание лигнина снижается в 2,2 раза. Прогнозируется высокая перспективность использования костры конопли для химической и биотехнологической трансформации.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ma H., Guna V., Raju T., Murthy A.N., Reddy N. Converting flax processing waste into value added biocomposites // *Industrial Crops and Products*. 2023. Vol. 195. P. 116434. DOI: 10.1016/j.indcrop.2023.116434.
2. Yano H., Fu W. Hemp: a sustainable plant with high industrial value in food processing // *Foods*. 2023. Vol. 12, no. 3. P. 651. DOI: 10.3390/foods12030651.
3. Wawro A., Batog J., Gieparda W. Chemical and enzymatic treatment of hemp biomass for bioethanol production // *Applied Sciences*. 2019. Vol. 9, no. 24. P. 5348. DOI: 10.3390/app9245348.
4. Wawro A., Batog J., Gieparda W. Polish varieties of industrial hemp and their utilisation in the efficient production of lignocellulosic ethanol // *Molecules*. 2021. Vol. 26, no. 21. P. 6467. DOI: 10.3390/molecules26216467.
5. Макаров И.С., Голова Л.К., Виноградов М.И., Егоров Ю.А., Куличихин В.Г., Михайлов Ю.М. Новое гидратцеллюлозное волокно из льняной целлюлозы // *Российский химический журнал*. 2020. Т. 64. N 1. С. 13–21. DOI: 10.6060/rcj.2020641.2. EDN: RDRPRG.
6. Дымникова Н.С., Ерохина Е.В., Морыганов А.П. Лубяные волокна – новые возможности для «зеленой» нанотехно-

- логии // Российский химический журнал. 2020. Т. 64. N 1. С. 22–31. DOI: 10.6060/rcj.2020641.3. EDN: ZEWAPE.
- 7.** Kozłowski R.M., Mackiewicz-Talarczyk M., Wielgusz K., Praczyk M., Allam A.M. Bast fibres: flax // Handbook of natural fibres. Vol. 1: Types, properties and factors affecting breeding and cultivation. Woodhead Publishing, 2020. P. 93–162. DOI: 10.1016/B978-0-12-818398-4.00006-2.
- 8.** Yan L., Chouh N., Jayaraman K. Flax fibre and its composites – a review // Composites Part B: Engineering. 2014. Vol. 56. P. 296–317. DOI: 10.1016/j.compositesb.2013.08.014.
- 9.** Khan S.H., Rahman M.Z., Haque M.R., Hoque M.E. Characterization and comparative evaluation of structural, chemical, thermal, mechanical, and morphological properties of plant fibers // Annual Plant: Sources of Fibres, Nanocellulose and Cellulosic Derivatives. Singapore: Springer, 2023. P. 1–45. DOI: 10.1007/978-981-99-2473-8_1.
- 10.** Ji A., Jia L., Kumar D., Yoo C.G. Recent advancements in biological conversion of industrial hemp for biofuel and value-added products // Fermentation. 2021. Vol. 7, no. 1. P. 6. DOI: 10.3390/fermentation7010006.
- 11.** Каретникова Н.В., Чендылова Л.В., Пен Р.З. Делигнификация льняной костры // Химия растительного сырья. 2018. N 1. С. 155–162. DOI: 10.14258/jcprm.2018012757. EDN: YRVTOE.
- 12.** Shaimerdenov Zh.N., Temirova I.Zh., Aldieva A.B., Iztayev A. Use of oilseed flax waste for production of technical cellulose // Ғылым және білім. 2020. No. 1-2 (58). P. 12–16.
- 13.** Azhar S.W., Xu F., Qiu Y. Evaluation and characterization of cellulose nanofibers from flaxseed fiber bundles // AATCC Journal of Research. 2021. Vol. 8, no. 4. P. 8–14. DOI: 10.14504/ajr.8.4.2
- 14.** Lialina N., Yudicheva O., Samoilenko A., Berezovskyi Yu., Moroz O., Bondar-Pidhurska O., et al. Evaluation of the quality of cellulose semi-finished products from technical hemp and the possibility of their further use // Fibres and Textiles. 2023. Vol. 30, no. 3. P. 48–54. DOI: 10.15240/tul/008/2023-3-006.
- 15.** Малюшевская А.П., Малюшевский П.П., Ющишина А.Н. Получение целлюлозы из льняного волокна с использованием электроразрядной объемной кавитации // Электронная обработка материалов. 2020. Т. 56. N 2. С. 49–54. DOI: 10.5281/zenodo.3747835.
- 16.** Валишина З.Т., Александров А.А., Хасанова К.В., Момзякова К.С., Дебердеев Т.Р., Дебердеев Р.Я. Оптимизация фазы делигнификации конопляного волокна // Вестник технологического университета. 2023. Т. 26. N 8. С. 47–51. DOI: 10.55421/1998-7072_2023_26_8_47. EDN: DNBWKW.
- 17.** Pen R.Z., Shapiro I.L. Microcrystalline peracetic cellulose from hemp // Practice Oriented Science: UAE – RUSSIA – INDIA: Materials of International University Scientific Forum (United Arab Emirates, 24 February 2023). United Arab Emirates, 2023. P. 61–66. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.115582.
- 18.** Aguado R., Tarrés Q., Mutjé P., Pèlach M.À., Delgado-Aguilar M. Non-covalently cationized nanocellulose from hemp: kinetics, key properties, and paper strengthening // Industrial Crops and Products. 2022. Vol. 188. Part A. P. 115582. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.115582.
- 19.** Ye D., Farriol X. Preparation and characterization of methylcelluloses from some annual plant pulps // Industrial Crops and Products. 2007. Vol. 26, no. 1. P. 54–62. DOI: 10.1016/j.indcrop.2007.01.004.
- 20.** Аксенчик К.В. Получение натрий-карбоксиметилцеллюлозы из льняной целлюлозы твердофазным способом в лабораторных условиях // Ползуновский вестник. 2018. N 2. С. 91–95. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2018.02.017. EDN: VADOBE.
- 21.** Городнев И.О., Иванова И.П., Ибрагимов Н.Г., Голубев А.Е. Изучение кинетики пластификации и надмолекулярной структуры нитратов целлюлозы, полученных из различного целлюлозосодержащего сырья // Российский химический журнал. 2017. Т. 61. N 4. С. 14–34. EDN: VNQLFS.
- 22.** Rizkiah R., Kencanawati K., Rosidin A., Wibowo L. Sintesis nitroselulosa dari serat rami (*Boechmerianivea*) menggunakan trietilamin // Jurnal Sains dan Teknik. 2021. Vol. 3, no. 1. P. 21–26. DOI: 10.37577/sainteks.v3i1.231.
- 23.** Lawson L., Degenstein L.M., Bates B., Chute W., King D., Dolez P.I. Cellulose textiles from hemp biomass: opportunities and challenges // Sustainability. 2022. Vol. 14, no. 22. P. 15337. DOI: 10.3390/su142215337.
- 24.** Mostafa N.A., Farag A.A., Abo-dief H.M., Tayeb A.M. Production of biodegradable plastic from agricultural wastes // Arabian Journal of Chemistry. 2018. Vol. 11, no. 4. P. 546–553. DOI: 10.1016/j.arabjc.2015.04.008.
- 25.** Plazonić I., Džimbeg-Malčić V., Bates I., Barbarić-Mikočević Ž. Effects of photo-oxidation on the properties of hemp office papers // International Journal of Technology. 2020. Vol. 11, no. 2. P. 215–224. DOI: 10.14716/ijtech.v11i2.3196.
- 26.** Akl M.A., El-Zeny A.S., Hashem M.A., El-Gharkawy E.-S.R.H., Mostafa A.G. Flax fiber based semicarbazide biosorbent for removal of Cr(VI) and Alizarin Red S dye from wastewater // Scientific Reports. 2023. Vol. 13. P. 8267. DOI: 10.1038/s41598-023-34523-y.
- 27.** Golshenas P. The usage of flax as biodiesel and biomass // The Canadian Science Fair Journal. 2023. Vol. 5, no. 1. Available from: <https://csfjournal.com/volume-5-issue-4-1/2023/1/12/the-usage-of-flax-as-biodiesel-and-biomass> (accessed: 20.09.2023).
- 28.** Batog J., Wawro A., Gieparda W., Bujnowicz K., Foksowicz-Flaczyk J., Rojewski S., et al. Effective use of flax biomass in biorefining processes // Applied Sciences. 2023. Vol. 13, no. 13. P. 7359. DOI: 10.3390/app13137359.
- 29.** Asquer C., Melis E., Scano E.A., Carboni G. Opportunities for green energy through emerging crops: biogas valorization of *Cannabis sativa* L. residues // Climate. 2019. Vol. 7, no. 12. P. 142. DOI: 10.3390/cli7120142.
- 30.** Bocek A.M., Shevchuk I.L., Lavrent'ev V.N. Fabrication of microcrystalline and powdered cellulose from short flax fiber and flax straw // Russian Journal of Applied Chemistry. 2003. Vol. 76. P. 1679–1682. DOI: 10.1023/B:RJAC.0000015737.07117.12.
- 31.** Пучков Е.М., Галкин А.В., Ущাপовский И.В. Технология производства сорбентов из костры масличного льна // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2019. Т. 20. N 5. С. 517–525. DOI: 10.30766/2072-9081.2019.20.5.517-525. EDN: HXBOZL.
- 32.** Badretdinova I., Kasatkina N., Khrameshin A., Spiridonov A., Litvinyuk A. Universal eco-friendly biodegradable packaging for storage and transportation of food and industrial goods based on shives of bast plants // E3S Web of Conferences. 2023. Vol. 380. P. 01014. DOI: 10.1051/e3sconf/202338001014.
- 33.** Скворцова Н.К., Матыс Е.Г., Филимонова Л.А., Валиуллина Е.Р. Поиск способов решения проблем пере-

работки отходов: биоразлагаемые материалы из конопли // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Экономика и право. 2021. N 11. С. 90–99. DOI: 10.37882/2223-2974.2021.11.31. EDN: MVLHQO.

34. Жарких О.А. О перспективах глубокой переработки коноплепродукции // Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства. 2021. N 23. С. 184–187. EDN: RDKSUU.

35. Исламутов Д.Р., Бикбаева Г.Г. Состояние и перспективы развития коноплеводства // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. 2020. N 4. С. 36–40. DOI: 10.31563/1684-7628-2020-56-4-36-40. EDN: UQQQVA.

36. Белопухов С.Л., Хамидреза Б., Байбеков Р.Ф. Влияние гуминово-фульватного комплекса на рост, развитие и качество продукции базилика (*Ocimum basilicum* L.) // Молочнохозяйственный вестник. 2020. N 2. С. 31–40. EDN: CSNTST.

37. Белопухов С.Л., Барыкина Ю.А., Федяев В.В., Жарких О.А., Дмитриевская И.И. Мелиоранты из отходов льняного комплекса // Природообустройство. 2019. N 2. С. 28–34. DOI: 10.34677/1997-6011/2019-2-28-34. EDN: VNGCFN.

38. Kim J.S., Lee Y.Y., Kim T.H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass // Bioresource Technology. 2016. Vol. 199. P. 42–48. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.085.

39. Karimi K., Taherzadeh M.J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: composition, imaging, and crystallinity // Bioresource Technology. 2016. Vol. 200. P. 1008–1018. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.11.022.

40. Shavyrkina N.A., Budaeva V.V., Skiba E.A., Gismatulina Y.A., Sakovich G.V. Review of current prospects for using *miscanthus*-based polymers // Polymers. 2023. Vol. 15, no. 14. P. 3097. DOI: 10.3390/polym15143097.

41. Ovchinnikova E.V., Mironova G.F., Banzaraktseva S.P., Skiba E.A., Budaeva V.V., Kovgan M.A., et al. Bioprocessing of oat hulls to ethylene: Impact of dilute HNO₃- or NaOH-pretreatment on process efficiency and sustainability // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. 2021. Vol. 9, no. 49. P. 16588–16596. DOI: 10.1021/acssuschemeng.1c05112.

42. Skiba E.A., Gladysheva E.K., Golubev D.S., Budaeva V.V., Aleshina L.A., Sakovich G.V., Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii*

in nutrient media derived from *Miscanthus* biomass // Carbohydrate Polymers. 2021. Vol. 252. P. 117178. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117178.

43. Kashcheyeva E.I., Gismatulina Y.A., Budaeva V.V. Pretreatments of non-woody cellulosic feedstocks for bacterial cellulose synthesis // Polymers. 2019. Vol. 11, no. 10. P. 1645. DOI: 10.3390/polym11101645.

44. Liu M., Thygesen A., Summerscales J., Meyer A.S. Targeted pre-treatment of hemp bast fibres for optimal performance in biocomposite materials: a review // Industrial Crops and Products. 2017. Vol. 108. P. 660–683. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.07.027.

45. Shadhin M., Rahman M., Jayaraman R., Chen Y., Mann D., Zhong W. Natural biomass & waste biomass fibers – structures, environmental footprints, sustainability, degumming methods, & surface modifications // Industrial Crops and Products. 2023. Vol. 204. Part A. P. 117252. DOI: 10.1016/j.indcrop.2023.117252.

46. Tarabanko V.E., Vigul D.O., Kaygorodov K.L., Kosivtsov Yu., Tarabanko N., Chelbina Yu.V. Influence of mass transfer and acid prehydrolysis on the process of flax shives catalytic oxidation into vanillin and pulp // Biomass Conversion and Biorefinery. 2022. DOI: 10.1007/s13399-022-02366-8.

47. Baksi S., Saha D., Saha S., Sarkar U., Basu D., Kuniyal J.C. Pre-treatment of lignocellulosic biomass: review of various physico-chemical and biological methods influencing the extent of biomass depolymerization // International Journal of Environmental Science and Technology. 2023. Vol. 20. P. 13895–13922. DOI: 10.1007/s13762-023-04838-4.

48. Богданова О.Ф., Домбровська О.П., Бабіч С.С., Домбровський А.Г. Визначення можливості одержання волокнистих напівфабрикатів з ненаркотичних конопель // Вісник Херсонського національного технічного університету. 2018. N 1. С. 67–74.

49. Шавыркина Н.А., Скиба Е.А. Получение молочной кислоты из шелухи овса // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 1. С. 99–106. DOI: 10.21285/2227-2925-2021-11-1-99-106. EDN: NRZZIE.

50. Скиба Е.А. Биосинтез кормовых дрожжей на средах, полученных из плодовых оболочек овса // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2016. Т. 6. N 3. С. 140–142. DOI: 10.21285/2227-2925-2016-6-3-140-142. EDN: WZQKFV.

REFERENCES

1. Ma H., Guna V., Raju T., Murthy A.N., Reddy N. Converting flax processing waste into value added biocomposites. *Industrial Crops and Products*. 2023;195:116434. DOI: 10.1016/j.indcrop.2023.116434.

2. Yano H., Fu H. Hemp: a sustainable plant with high industrial value in food processing. *Foods*. 2023;12(3):651. DOI: 10.3390/foods12030651.

3. Wawro A., Batog J., Gieparda W. Chemical and enzymatic treatment of hemp biomass for bioethanol production. *Applied Sciences*. 2019;9(24):5348. DOI: 10.3390/app9245348.

4. Wawro A., Batog J., Gieparda W. Polish varieties of industrial hemp and their utilisation in the efficient production of lignocellulosic ethanol. *Molecules*. 2021;26(21):6467. DOI: 10.3390/molecules26216467.

5. Makarov I., Golova L., Vinogradov M., Egorov Y.,

Kulichikhin V., Mikhailov Y. New flax cellulose hydrate cellulose fiber. *Rossiiskii khimicheskii zhurnal*. 2020;64(1):13-21. (In Russian). DOI: 10.6060/rcj.2020641.2. EDN: RDRPRG.

6. Dymnikova N.S., Erohina E.V., Moryganov A.P. Bast fibers – new opportunities for “green” nanotechnology. *Rossiiskii khimicheskii zhurnal*. 2020;64(1):22-31. (In Russian). DOI: 10.6060/rcj.2020641.3. EDN: ZEWAPE.

7. Kozłowski R.M., Mackiewicz-Talarczyk M., Wielgusz K., Praczyk M., Allam A.M. Bast fibres: flax. In: *Handbook of natural fibres. Vol. 1: Types, properties and factors affecting breeding and cultivation*. Woodhead Publishing; 2020, p. 93-162. DOI: 10.1016/B978-0-12-818398-4.00006-2.

8. Yan L., Chouw N., Jayaraman K. Flax fibre and its composites – a review. *Composites Part B: Engineering*. 2014;56:296-317. DOI: 10.1016/j.compositesb.2013.08.014.

9. Khan S.H., Rahman M.Z., Haque M.R., Hoque M.E. Characterization and comparative evaluation of structural, chemical, thermal, mechanical, and morphological properties of plant fibers. In: *Annual Plant: Sources of Fibres, Nanocellulose and Cellulosic Derivatives*. Singapore: Springer; 2023, p. 1-45. DOI: 10.1007/978-981-99-2473-8_1.
10. Ji A., Jia L., Kumar D., Yoo C.G. Recent advancements in biological conversion of industrial hemp for biofuel and value-added products. *Fermentation*. 2021;7(1):6. DOI: 10.3390/fermentation7010006.
11. Karetnikova N.V., Chendylova L.V., Pen R.Z. Delignification of flax shive. *Khimija rastitel'nogo syr'ja = Chemistry of plant raw material*. 2018;1:155-162. (In Russian). DOI: 10.14258/jcprm.2018012757. EDN: YRVTOE
12. Shaimerdenov Zh.N., Temirova I.Zh., Aldieva A.B., Iztayev A. Use of oilseed flax waste for production of technical cellulose. *Nauka i obrazovanie = Science and Education*. 2020;1-2:12-16.
13. Azhar S.W., Xu F., Qiu Y. Evaluation and characterization of cellulose nanofibers from flaxseed fiber bundles. *AATCC Journal of Research*. 2021;8(4):8-14. DOI: 10.14504/ajr.8.4.2
14. Lialina N., Yudicheva O., Samoilenko A., Berezovskiy Yu., Moroz O., Bondar-Pidhurska O., et al. Evaluation of the quality of cellulose semi-finished products from technical hemp and the possibility of their further use. *Fibres and Textiles*. 2023;30(3):48-54. DOI: 10.15240/tul/008/2023-3-006.
15. Malyushevskaya A.P., Malyushevskii P.P., Yushchishina A.N. Production of cellulose from flax fiber using electric-discharge volumetric cavitation. *Elektronnaya obrabotka materialov*. 2020;56(2):49-54. (In Russian). DOI: 10.5281/zenodo.3747835.
16. Valishina Z.T., Alexandrov A.A., Khasanova K.V., Momzyakova K.S., Deberdeev T.R., Deberdeev R.Ya. Optimization of the delignification phase of hemp fiber. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta = Herald of Technological University*. 2023;26(8):47-51. (In Russian). DOI: 10.55421/1998-7072_2023_26_8_47. EDN: DNBWKW.
17. Pen R.Z., Shapiro I.L. Microcrystalline peracetic cellulose from hemp. *Practice Oriented Science: UAE – RUSSIA – INDIA: Materials of International University Scientific Forum*. 24 February 2023, United Arab Emirates. United Arab Emirates; 2023, p. 61-66. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.115582.
18. Aguado R., Tarrés Q., Mutjé P., Pèlach M.À., Delgado-Aguilar M. Non-covalently cationized nanocellulose from hemp: kinetics, key properties, and paper strengthening. *Industrial Crops and Products*. 2022;188(A):115582. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.115582.
19. Ye D., Farriol X. Preparation and characterization of methylcelluloses from some annual plant pulps. *Industrial Crops and Products*. 2007;26(1):54-62. DOI: 10.1016/j.indcrop.2007.01.004.
20. Aksenichik K.V. Preparation of sodium carboxymethylcellulose from flaxseed cellulose by solid-phase method in laboratory conditions. *Polzunovskii vestnik*. 2018;2:91-95. (In Russian). DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2018.02.017. EDN: VADOB.
21. Gorodnyev I.O., Ivanova I.P., Ibragimov N.G., Golubev A.E. Studying of kinetics of plasticization and supermolecular structure of the nitrate celluloses received from cellulose-containing raw materials. *Rossiiskii khimicheskii zhurnal*. 2017;61(4):14-34. (In Russian). EDN: VNQLFS.
22. Rizkiah R., Kencanawati K., Rosidin A., Wibowo L. Synthesis nitrocellulose from hempen using triethylamine (*Boechmerianivea*). *Jurnal Sains dan Teknik*. 2021;3(1):21-26. (In Indonesian). DOI: 10.37577/sainteks.v3i1.231.
23. Lawson L., Degenstein L.M., Bates B., Chute W., King D., Dolez P.I. Cellulose textiles from hemp biomass: opportunities and challenges. *Sustainability*. 2022;14(22):15337. DOI: 10.3390/su142215337.
24. Mostafa N.A., Farag A.A., Abo-dief H.M., Tayeb A.M. Production of biodegradable plastic from agricultural wastes. *Arabian Journal of Chemistry*. 2018;11(4):546-553. DOI: 10.1016/j.arabjc.2015.04.008.
25. Plazonić I., Džimbeg-Malčić V., Bates I., Barbarić-Mikočević Ž. Effects of photo-oxidation on the properties of hemp office papers. *International Journal of Technology*. 2020;11(2):215-224. DOI: 10.14716/ijtech.v11i2.3196.
26. Akl M.A., El-Zeny A.S., Hashem M.A., El-Gharkawy E.-S.R.H., Mostafa A.G. Flax fiber based semicarbazide biosorbent for removal of Cr(VI) and Alizarin Red S dye from wastewater. *Scientific Reports*. 2023;13:8267. DOI: 10.1038/s41598-023-34523-y.
27. Golshenas P. The usage of flax as biodiesel and biomass. *The Canadian Science Fair Journal*. 2023;5(1). Available from: <https://csfjournal.com/volume-5-issue-4-1/2023/1/12/the-usage-of-flax-as-biodiesel-and-biomass> [Accessed 20th September 2023].
28. Batog J., Wawro A., Gieparda W., Bujnowicz K., Foksowicz-Flaczyk J., Rojewski S., et al. Effective use of flax biomass in biorefining processes. *Applied Sciences*. 2023;13(13):7359. DOI: 10.3390/app13137359.
29. Asquer C., Melis E., Scano E.A., Carboni G. Opportunities for green energy through emerging crops: biogas valorization of *Cannabis sativa* L. residues. *Climate*. 2019;7(12):142. DOI: 10.3390/cli7120142.
30. Boček A.M., Shevchuk I.L., Lavrent'ev V.N. Fabrication of microcrystalline and powdered cellulose from short flax fiber and flax straw. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2003;76:1679-1682. DOI: 10.1023/B:RJAC.0000015737.07117.12.
31. Puchkov E.M., Galkin A.V., Ushchapovsky I.V. The technology of producing sorbents from linseed flax shive. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka = Agricultural Science Euro-North-East*. 2019;20(5):517-525. (In Russian). DOI: 10.30766/2072-9081.2019.20.5.517-525. EDN: HXBOZL.
32. Badretdinova I., Kasatkina N., Khrameshin A., Spiridonov A., Litvinyuk A. Universal eco-friendly biodegradable packaging for storage and transportation of food and industrial goods based on shives of bast plants. *E3S Web of Conferences*. 2023;380:01014. DOI: 10.1051/e3sconf/202338001014.
33. Skvortsova N.K., Matys E.G., Filimonova L.A., Valiullina E.R. Finding ways to solve problems of waste recycling: biodegradable hemp materials. *Sovremennaya nauka: aktual'nye problemy teorii i praktiki. Seriya: Ekonomika i parvo = Modern Science: Actual Problems of Theory & Practice. Economics and Law*. 2021;11:90-99. (In Russian). DOI: 10.37882/2223-2974.2021.11.31. EDN: MVLHQO.
34. Zharkikh O.A. On the prospects for deep processing of hemp products. *Aktual'nye voprosy sovershenstvovaniya tekhnologii proizvodstva i pererabotki produktsii sel'skogo khozyaistva*. 2021;23:184-187. (In Russian). EDN: RDKSUU.

35. Islamgulov D., Bikbaeva G. State and prospects of hemp farming. *Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2020;4:36-40. (In Russian). DOI: 10.31563/1684-7628-2020-56-4-36-40. EDN: UQQQBA.
36. Belopukhov S.L., Hamidreza B., Baybekov R.F. Influence of the humic-fulvate complex on growth, development and quality of basil production (*Ocimum basilicum* L.). *Molochnokhozyaistvennyi vestnik*. 2020;2:31-40. (In Russian). EDN: CSNTST.
37. Belopukhov S.L., Barykina Ju.A., Fediaev V.V., Zharkih O.A., Dmitrievskaya I.I. Ameliorants from the flax complex waste. *Prirodoobustroistvo = Environmental Engineering*. 2019;2:28-34. (In Russian). DOI: 10.34677/1997-6011/2019-2-28-34. EDN: VNGCFN.
38. Kim J.S., Lee Y.Y., Kim T.H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2016;199:42-48. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.085.
39. Karimi K., Taherzadeh M.J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: composition, imaging, and crystallinity. *Bioresource Technology*. 2016;200:1008-1018. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.11.022.
40. Shavyrkina N.A., Budaeva V.V., Skiba E.A., Gismatulina Y.A., Sakovich G.V. Review of current prospects for using *miscanthus*-based polymers. *Polymers*. 2023;15(14):3097. DOI: 10.3390/polym15143097.
41. Ovchinnikova E.V., Mironova G.F., Banzarakt-saeva S.P., Skiba E.A., Budaeva V.V., Kovgan M.A., et al. Bioprocessing of oat hulls to ethylene: Impact of dilute HNO₃- or NaOH-pretreatment on process efficiency and sustainability. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2021;9(49):16588-16596. DOI: 10.1021/acssuschemeng.1c05112.
42. Skiba E.A., Gladysheva E.K., Golubev D.S., Budaeva V.V., Aleshina L.A., Sakovich G.V., Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* in nutrient media derived from *Miscanthus* biomass. *Carbohydrate Polymers*. 2021;252:117178. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117178.
43. Kashcheyeva E.I., Gismatulina Y.A., Budaeva V.V. Pretreatments of non-woody cellulosic feedstocks for bacterial cellulose synthesis. *Polymers*. 2019;11(10):1645. DOI: 10.3390/polym11101645.
44. Liu M., Thygesen A., Summerscales J., Meyer A.S. Targeted pre-treatment of hemp bast fibres for optimal performance in biocomposite materials: a review. *Industrial Crops and Products*. 2017;108:660-683. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.07.027.
45. Shadhin M., Rahman M., Jayaraman R., Chen Y., Mann D., Zhong W. Natural biomass & waste biomass fibers – structures, environmental footprints, sustainability, degumming methods, & surface modifications. *Industrial Crops and Products*. 2023;204(A):117252. DOI: 10.1016/j.indcrop.2023.117252.
46. Tarabanko V.E., Vigul D.O., Kaygorodov K.L., Kosivtsov Yu., Tarabanko N., Chelbina Yu.V. Influence of mass transfer and acid prehydrolysis on the process of flax shives catalytic oxidation into vanillin and pulp. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2022. DOI: 10.1007/s13399-022-02366-8.
47. Baksi S., Saha D., Saha S., Sarkar U., Basu D., Kuniyal J.C. Pre-treatment of lignocellulosic biomass: review of various physico-chemical and biological methods influencing the extent of biomass depolymerization. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2023;20:13895-13922. DOI: 10.1007/s13762-023-04838-4.
48. Bogdanova O., Dombrovskaya O., Babich S., Dombrovskiy A. Determination of the possibility of obtaining fiber semi-finished products from drug-free hemp. *Vestnik Khersonskogo natsional'nogo tekhnicheskogo universiteta = Visnyk of Kherson National Technical University*. 2018;1:67-74. (In Ukrainian).
49. Shavyrkina N.A., Skiba E.A. Obtaining lactic acid from oat husks. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotehnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):99-106. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2021-11-1-99-106. EDN: NRZZIE.
50. Skiba E.A. Biosynthesis of fodder yeasts in broths derived from oat hulls. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotehnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2016;6(3):140-142. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2016-6-3-140-142. EDN: WZQKVF.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Корчагина Анна Александровна,

к.т.н., научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
yakusheva89_21.ru@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3633-2392>

Гладышева Евгения Константиновна,

к.т.н., научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
evg-gladysheva@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6567-9662>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anna A. Korchagina,

Cand. Sci. (Engineering), Researcher,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
yakusheva89_21.ru@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3633-2392>

Evgenia K. Gladysheva,

Cand. Sci. (Engineering), Researcher,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
evg-gladysheva@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6567-9662>

Будаева Вера Владимировна,
к.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
budaeva@ipcet.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1628-0815>

Скиба Екатерина Анатольевна,
д.т.н., доцент, ведущий научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
✉ eas08988@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8897-347X>

Vera V. Budaeva,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Leading Researcher,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
budaeva@ipcet.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1628-0815>

Ekaterina A. Skiba,
Dr. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Leading Researcher,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
✉ eas08988@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8897-347X>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 26.10.2023.
Одобрена после рецензирования 16.11.2023.
Принята к публикации 30.11.2023.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

Information about the article

The article was submitted 26.10.2023.
Approved after reviewing 16.11.2023.
Accepted for publication 30.11.2023.

Уважаемые читатели!

Приглашаем Вас к активному творческому сотрудничеству по научным направлениям:

- Химические науки
- Физико-химическая биология
- Химическая технология

Журнал «Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология» включен в перечень рецензируемых научных изданий (Перечень ВАК) и следующие базы данных: Russian Science Citation Index (RSCI), Web of Science (ESCI), Chemical Abstracts Service (CAS), EBSCO Publishing Databases, European Reference Index for the Humanities and the Social Sciences (ERIH PLUS), ВИНИТИ РАН, система Российского индекса научного цитирования, представлен в электронной библиотеке «Cyberleninka», Directory of Open Access Journals (DOAJ) и описан в Ulrich's Periodicals Directory.

Публикациям журнала присваивается DOI (Digital object identifier).

Редколлегия

Dear readers!

We would like to invite you to creative cooperation in the fields:

- Chemical Sciences
- Physical-Chemical and General Biology
- Chemical Technology

The Journal «Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya» is included in the list of journals which are regarded as academic publications by the State Commission for Academic Degrees and Titles (VAK). The Journal also is indexing in Russian Science Citation Index (RSCI), Web of Science (ESCI), Chemical Abstracts Service (CAS), EBSCO Publishing Databases, European Reference Index for the Humanities and the Social Sciences (ERIH PLUS), VINITI Database (Referativnyi Zhurnal), Russian Science Citation Index, included in the digital scientific library Cyberleninka, Directory of Open Access Journals (DOAJ) and is described in Ulrich's Periodicals Directory.

Publications are assigned a DOI (Digital object identifier).

Editorial Board

**ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
ПРИКЛАДНАЯ ХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Том 13 N 4 (47) 2023

12+

**PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
APPLIED CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY**

Volume 13 No. 4 (47) 2023

Редактор Ф.А. Посысоева

Перевод на английский язык:

А.В. Квеглис, David Mossor (PhD), Е.А. Привалова

Верстка Т.С. Жевлакова

Дата выхода в свет 29.12.2023. Формат 60 x 90 / 8.
Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 21,75.
Тираж 500 экз. Зак. 145. Поз. плана 5н.

Отпечатано в типографии издательства
ФГБОУ ВО «ИРНИТУ»

Адрес типографии:

664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 81/12А

Издание распространяется бесплатно

ФГБОУ ВО «ИРНИТУ»,

664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83