

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК. 2016. № 4

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2016. № 4

Журнал основан в 1956 г.

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации № 394 от 18 мая 2009 г.

*Входит в Перечень научных изданий Республики Беларусь
для опубликования результатов диссертационных исследований, включен в базу данных
Российского индекса научного цитирования (РИНЦ).*

Редакционная коллегия:

М. Е. Никифоров, академик-секретарь Отделения биологических наук Национальной академии наук Беларуси,
академик, доктор биологических наук (*главный редактор*),

И. Д. Вологовский, академик, доктор биологических наук (*заместитель главного редактора*),

В. И. Парфенов, академик, доктор биологических наук (*заместитель главного редактора*),

В. Г. Колосовская (*ведущий редактор журнала*),

А. Н. Евтушенко, доктор биологических наук,

А. В. Кильчевский, член-корреспондент, доктор биологических наук,

Э. И. Коломиец, член-корреспондент, доктор биологических наук,

Н. А. Ламаи, академик, доктор биологических наук,

А. Г. Лобанок, академик, доктор биологических наук,

В. Е. Падутов, член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук,

В. Н. Решетников, академик, доктор биологических наук,

В. В. Титок, член-корреспондент, доктор биологических наук,

Л. В. Хотылева, академик, доктор биологических наук,

С. Н. Черенкевич, академик, доктор биологических наук,
Н. В. Шалыго, член-корреспондент, доктор биологических наук,
В. М. Шкуматов, член-корреспондент, доктор биологических наук

Редакционный совет:

- В. Ф. Багинский**, член-корреспондент НАН Беларуси, доктор сельскохозяйственных наук
(Республика Беларусь),
А. Баршевский, академик Академии наук Латвии, доктор биологии, профессор (Латвия),
Я. Б. Блюм, академик НАН Украины, доктор биологических наук, профессор (Украина),
В. В. Валетов, доктор биологических наук, профессор (Республика Беларусь),
В. Е. Гайдук, доктор биологических наук, профессор (Республика Беларусь),
Ю. Ю. Дгебуадзе, академик Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор
(Российская Федерация),
Н. А. Колчанов, академик Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор
(Российская Федерация),
В. В. Кузнецов, член-корреспондент Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор
(Российская Федерация),
В. Олех-Пяэцка, кандидат биологических наук, профессор (Польша),
О. Н. Пугачев, член-корреспондент Российской академии наук, доктор биологических наук
(Российская Федерация),
А. И. Рапопорт, член-корреспондент Академии наук Латвии, доктор биологических наук, профессор (Латвия),
И. А. Тихонович, академик Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор
(Российская Федерация),
В. В. Швартау, член-корреспондент НАН Украины, доктор биологических наук, профессор (Украина)

Адрес редакции:

*ул. Академическая, 1, к. 119, 220072, г. Минск, Республика Беларусь.
Тел.: + 375 17 284-19-19; e-mail: biolvesti@mail.ru
vestibiol.belnauka.by*

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.

Серия биологических наук. 2016. № 4

Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *В. Г. Колосовская*

Компьютерная верстка *Ю. А. Агейчик*

Подписано в печать 20.10.2016. Выход в свет 28.10.2016. Формат 60×84 ¹/₈. Бумага офсетная.

Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 90 экз. Заказ 209.

Цена номера: индивидуальная подписка – 10,28 руб., ведомственная подписка – 25,21 руб.

Издатель и полиграфическое исполнение:

Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/18 от 02.08.2013. ЛП № 02330/455 от 30.12.2013. Ул. Ф. Скорины, 40, 220141, г. Минск, Республика Беларусь

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука»,
Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук, 2016

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

BIOLOGICAL SERIES. 2016. N 4

The Journal was founded in 1956

Periodicity is 4 issues per annum

Founder is the National Academy of Sciences of Belarus

The journal is registered on May 18, 2009 by the Ministry of Information of the Republic of Belarus in the State Registry of Mass Media, reg. No. 394

The Journal is included in The List of Journals for Publication of the Results of Dissertation Research in the Republic of Belarus and in the database of Russian Science Citation Index (RSCI)

Editorial Board:

M. E. Nikiforov, Academician, Dr. Sci. (Biol.), (*Editor-in-Chief*),
I. D. Volotovskii, Academician, Dr. Sci. (Biol.), (*Associate Editor-in-Chief*),
V. I. Parfyonov, Academician, Dr. Sci. (Biol.) (*Associate Editor-in-Chief*),
V. G. Kolosovskaya (*Managing Editor*),

A. N. Evtushenkov, Dr. Sci. (Biol.),
A. V. Kilchevsky, Corresponding Member, Dr. Sci. (Biol.),
E. I. Kolomiets, Corresponding Member, Dr. Sci. (Biol.),
N. A. Laman, Academician, Dr. Sci. (Biol.),
A. G. Lobanok, Academician, Dr. Sci. (Biol.),
V. E. Padutov, Corresponding Member, Dr. Sci. (Biol.),
V. N. Reshetnikov, Academician, Dr. Sci. (Biol.),
V. V. Titok, Corresponding Member, Dr. Sci. (Biol.),
L. V. Khotyleva, Academician, Dr. Sci. (Biol.)
S. N. Cherenkevich, Academician, Dr. Sci. (Biol.),
N. V. Shalygo, Corresponding Member, Dr. Sci. (Biol.),
V. M. Shkumatov, Corresponding Member, Dr. Sci. (Biol.)

Editorial Council:

V. F. Baginski, Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, Doctor of Agricultural Sciences (Republic of Belarus),
A. Barsevskis, Academician of the Latvian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biol.), Professor (Latvia),
Ya. B. Blume, Academician of the National Academy of Sciences of Ukraine, Dr. Sci. (Biol.), Professor (Ukraine),
V. V. Valetov, Dr. Sci. (Biol.), Professor (Republic of Belarus),
V. E. Gayduk, Dr. Sci. (Biol.), Professor (Republic of Belarus),
Yu. Yu. Dgebuadze, Academician of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biol.), Professor (Russian Federation),
N. A. Kolchanov, Academician of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biol.), Professor (Russian Federation),

V. V. Kuznetsov, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biol.), Professor
(Russian Federation),
W. Olech-Piasecka, Ph. D., Professor (Poland),
O. N. Pugachev, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biol.) (Russian Federation),
A. I. Rapoport, Corresponding Member of Latvian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biol.), Professor (Latvia),
I. A. Tikhonovich, Academician of Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biol.), Professor (Russian Federation),
V. V. Schwartau, Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Ukraine, Dr. Sci. (Biol.),
Professor (Ukraine)

Address of the Editorial Office:
Akademicheskaya str., room 119, 220072, Minsk, Republic of Belarus.
Tel.: + 375 17 284-19-19; e-mail: biolvesti@mail.ru
vestibiol.belnauka.by

PROCEEDING OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.

Series of Biology. 2016. N 4

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*
Computer imposition *Y. A. Aheichyk*

It is sent of the press 20.10.2016. Appearance 28.10.2016. Format 60×84 1/8. Offset paper. The press digital.

Printed pages 14,88. Publisher's signatures 16,4. Circulation 90 copies. Order 209.

Number price: individual subscription – 10,28 byn., departmental subscription – 25,21 byn.

Publisher and printing execution:

Republican unitary enterprise "Publishing House "Belaruskaya Navuka"

Certificate on the state registration of the publisher, manufacturer, distributor of printing editions No. 1/18 dated August 2, 2013. License for the press No. 02330/455 dated December 30, 2013. Address: F. Scorina str., 40, 220141, Minsk, Republic of Belarus.

© RUE "Publishing House "Belaruskaya Navuka",
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series, 2016

ЗМЕСТ

Ламан Н. А., Кем К. Р., Судник А. Ф. Ростовые реакции проростков отдельных видов и сортов сельскохозяйственных растений на обработку семян глифосатом (N-фосфонометилглицином).....	7
Бородич Г. С. Динамика смены листьев у бородатых ирисов (<i>Bearded irises</i>) при интродукции.....	14
Вязов Е. В., Шалыго Н. В. Активность фотосинтетического аппарата и защитная система растений огурца (<i>Cucumis sativus</i> L.) при узкополосном освещении различного спектрального состава.....	19
Копылова Н. А., Ламан Н. А. Новый способ экстракции каротиноидов из соцветий золотарника канадского (<i>Solidago canadensis</i> L.) для создания препаратов с антиоксидантными свойствами.....	27
Олешук Е. Н., Гриц А. Н., Попов Е. Г., Янчевская Т. Г. Оценка стрессоустойчивости интродуцируемых сортов винограда (<i>Vitis</i>) по активности окислительно-восстановительных ферментов.....	33
Пучкова Т. А., Костеневич А. А., Гончарова И. А., Козинец А. И. Использование отработанного соломенного субстрата после культивирования гриба вешенка обыкновенная в кормлении молодняка крупного рогатого скота.....	42
Коломиец Э. И. Коллекция непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси ...	48
Курлович Т. В. Варьирование формы, размеров и массы плодов сортовой клюквы крупноплодной (<i>Oxycoccus macrocarpos</i> (Ait.) Pursh).....	53
Бакакина Ю. С. Анализ протеомного профиля плазмы крови при раке молочной железы.....	59
Венская Е. И., Скоробогатова А. С., Лукьяненко Л. М. Изменение физико-химических свойств липидов в мембранах лимфоцитов при действии амилоидных фибрилл <i>in vitro</i>	62
Дворник А. А., Дворник Ю. В. Динамика содержания ¹³⁷ Cs в поверхностном воздухе в пожароопасный сезон.....	66
Киселева Е. П., Езубец А. П., Михайлопуло К. И., Новик Г. И. Методология исследования динамики синтеза и секреции антигенов непатогенных микроорганизмов на примере <i>Lactococcus lactis</i>	72
Клишевич Н. Г., Самсонова А. С., Глушень Е. М. Углеводородоокисляющие ассоциативные культуры для деструкции тяжелой нефти.....	81
Прищепчик Ю. В. Влияние прайминга семян огурца 5-аминолевулиновой кислотой на энергию прорастания и развитие растений в условиях солевого стресса.....	85
Кондратьева В. В., Кабашникова Л. Ф., Савченко Г. Е. Защитное действие экзогенной β-аминомасляной кислоты на растения ячменя (<i>Hordeum vulgare</i> L.) при инфицировании <i>Bipolaris sorokiniana</i> Shoem.....	89
Леоник Ю. С., Голубева Е. Н., Кулагова Т. А. Влияние белка CH13L1 на кислородактивирующую способность фагоцитов.....	94
Савич В. В., Новик Г. И. Морфологические и физиолого-биохимические свойства бактерий рода <i>Pseudomonas</i> , выделенных из растительного материала.....	99
Фальковская У. В., Сидоренко А. В., Новик Г. И. Видовой состав возбудителей бактериозов топинамбура.....	103
Константинов А. В., Острикова М. Я. Влияние штаммов ризосферных псевдомонад на рост микрорезных растений березы пушистой (<i>Betula pubescens</i> Ehrh.) в разные сроки посадки.....	107
Винцек Е. В., Григорчик А. П. Питание бычка-гонца (<i>Neogobius gymnotrachelus</i>) и бычка-цуцика (<i>Proterorhinus marmoratus</i>) в реке Днепр (Беларусь).....	114

АГЛЯДЫ

Зинченко А. И. Аденозин как потенциальная мишень для биотерапии рака.....	118
--	-----

CONTENTS

Laman N. A., Kem K. R., Sudnik A. F. Growth responses of seedlings of certain species and crop varieties in treatment glyphosate (N-phosphono-methylglycine).....	7
Borodich G. S. Dynamics of change of leaves in bearded irises (<i>Bearded irises</i>) in the introduction	14
Viazau Y. V., Shalygo N. V. Photosynthetic apparatus and defense system of cucumber (<i>Cucumis sativus</i> L.) plants under led lighting of different spectral composition.....	19
Kopylova N. A., Laman N. A. New method for carotenoid extraction from <i>Solidago canadensis</i> blossoms as a basis for the creation of drugs with antioxidant properties.....	27
Oleshuk E. N., Griz A. N., Popoff E. H., Yanchevskaya T. G. Express-assessment of introduced <i>Vitis</i> species' stress resistance using Red/Ox-markers	33
Puchkova T. A., Kastsianevich A. A., Goncharova I. A., Kozinets A. I. Using waste straw substrate after oyster mushroom cultivation for feeding of young cattle.....	42
Kolomiets E. I. Collection of non-pathogenic microorganisms of the Institute of Microbiology of NAS of Belarus.....	48
Kurlovich T. V. The variation of shape, size and mass of the fruits of varietal large cranberry (<i>Oxycoccus macrocarpos</i> (Ait.) Pursh)	53
Bakakina Y. S. Proteome analysis of blood plasma of breast cancer patients	59
Venskaya E. I., Skorobogatova A. S., Lukyanenko L. M. The effect of amyloid fibrils on the changes of physical and chemical properties of membrane lipids of lymphocytes <i>in vitro</i>	62
Dvornik A., Dvornik Y. Dynamics of ¹³⁷ Cs activity in the surface air in the fire season	66
Kiseleva E., Ezybets A., Mikhailopulo K., Novik G. Methodological approach to the study of the dynamic of antigens synthesis and secretion by nonpathogenic organisms on the example of <i>Lactococcus lactis</i>	72
Klishevich N. G., Samsonova A. S., Glushen E. M. Hydrocarbon-oxidizing associative microbial cultures eliminating heavy oil	81
Prischepchik Y. V. Influence of cucumber seed priming with 5-aminolevulinic acid on seed vigor and plant development under salt stress	85
Kondratjeva V. V., Kabashnikova L. F., Savchenko G. E. Protective action of β -aminobutyric acid on barley plants (<i>Hordeum vulgare</i> L.) infected by <i>Bipolaris sorokiniana</i> Shoem	89
Leonik Y., Golubeva E., Kulahava T. Protein CHI3L1 effect on phagocytes oxygen activating ability	94
Savich V., Novik G. Morphological, physiological and biochemical properties of bacteria of the genus <i>Pseudomonas</i> isolated from plant material	99
Falkouskaya U. V., Sidarenka A. V., Novik G. I. Taxonomic composition of the jerusalem artichoke bacteriosis agents	103
Konstantinov A. V., Ostrikoval M. Ya. The influence of treatment with rhizospheric strains of <i>Pseudomonas</i> on growth and development of birch (<i>Betula pubescens</i> Ehrh.) regenerants at different times landing.....	107
Vintsek E. V., Grigorichik A. P. Diet of tubenose goby (<i>Neogobius gymnotrachelus</i>) and racer goby (<i>Proterorhinus marmoratus</i>) in the river Dnieper (Belarus).....	114

REVIEWS

Zinchenko A. I. Adenosine as a potential target for cancer biotherapy.....	118
---	-----

Н. А. Ламан, К. Р. Кем, А. Ф. Судник

*Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

РОСТОВЫЕ РЕАКЦИИ ПРОРОСТКОВ ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ И СОРТОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ НА ОБРАБОТКУ СЕМЯН ГЛИФОСАТОМ (N-ФОСФОНОМЕТИЛГЛИЦИНОМ)

Изучены физиологические эффекты малых доз глифосата на проростках трех различных сельскохозяйственных культур – ярового ячменя, льна-долгунца и озимого рапса. Установлена зависимость доза–эффект для каждой исследуемой культуры в широком диапазоне концентраций N-фосфонометилглицина. Выявлена видовая и сортовая специфичность ростовых реакций на инкрустацию семян глифосатом.

Ключевые слова: ячмень, лен-долгунец, рапс, глифосат, N-фосфонометилглицин, инкрустация, гормезис, доза–эффект, рост, ингибирование, стимуляция.

N. A. Laman, K. R. Kem, A. F. Sudnik

*V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus*

GROWTH RESPONSES OF SEEDLINGS OF CERTAIN SPECIES AND CROP VARIETIES IN TREATMENT GLYPHOSATE (N-PHOSPHONO-METHYLGLYCINE)

Physiological effects of low doses of glyphosate are studied on the seedlings of three different crops – spring barley, flax and winter rape. The dose-response dependence is found for each culture in a wide range of concentrations of N-phosphonomethylglycine. Specific and varietal specificity of growth responses to incrustation of seed by glyphosate is identified.

Keywords: barley, flax, rape, glyphosate, N-phosphonomethylglycine, incrustation, hormesis, dose–response, growth, inhibition, stimulation.

Введение. Одним из основных постулатов классической токсикологии утверждается, что взаимодействие химического вещества и обрабатываемого биологического объекта по принципу доза–эффект предполагает однонаправленное усиление наблюдаемых показателей метаболических процессов, физиологических функций и морфологической структуры биологической системы (клетки, органы, ткани, организм) при повышении действующих доз и концентраций [1, 2].

В то же время начиная с конца 1960-х годов шло интенсивное накопление экспериментальных данных, которые послужили основой для формирования нового самостоятельного направления современной токсикологии. Речь идет о гормезисе (hormesis), представляющем собой двухфазовое действие химических веществ (ксенобиотиков, лекарств, природных ядов), которые в малых дозах вызывают стимуляцию изучаемых биологических показателей, тогда как большие их дозы ингибируют эти показатели.

Разработка концепции гормезиса связана в первую очередь с именем одного из ее основателей – профессора Массачусетского университета Edward James Calabrese [3, 4]. На основе анализа многочисленных данных научной литературы Калабриз и сотр. пришли к выводу, что гормезис – это генерализованный воспроизводимый феномен, который является фундаментальным обобщенным отражением зависимости доза–ответная реакция.

Многочисленными последователями концепции гормезиса констатируется настоятельная необходимость проведения всесторонних исследований этого феномена как общебиологического явления и обоснования использования его в практической деятельности.

Интенсивное развитие такие исследования (а именно по выявлению стимулирующего эффекта сублетальных доз 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты на ряде овощных культур [5]) получили в 1980-е годы. В работе [6] 13 из 16 исследованных гербицидов стимулировали рост корней и побегов овса.

Пристальное внимание в последнее десятилетие привлекли гербицидные препараты на основе N-фосфонометилглицина (глифосата), широко используемые в настоящее время. Впервые глифосат синтезирован и тестирован как гербицид в 1970 г. сотрудниками фирмы Монсанто [7]. В 1974 г. в продажу поступила его первая препаративная форма под названием Раундап, включающая изопропиламинную соль глифосата. Через 20 лет после истечения срока действия патента фирмы Монсанто на рынке появилось огромное количество дженериков, действующим веществом которых является глифосат. Однако особенно большие объемы производства и использования глифосатов связаны с созданием, начиная с 1996 г., генно-инженерными методами устойчивых к глифосату форм сои, кукурузы, хлопчатника и других культур. В это же время в ряде лабораторий мира у N-фосфонометилглицина выявлен эффект гормезиса [8]. Так, бразильские исследователи зафиксировали воспроизводимое в экспериментах с эвкалиптом стимулирующее действие глифосата в дозе 16 г/га на рост саженцев этой древесной породы [9].

Имеющиеся в англоязычной научной литературе материалы показывают, что эффект мягкого химического стресса (5–10 % от применяемой для уничтожения сорной растительности дозы) при обработке глифосатом может достигать от 5 до 100 % по сравнению с вариантом без обработки. Например, в опытах с яровым ячменем обработка растений глифосатом в начале фазы колошения в дозах от 1,6 до 12 г/га статистически достоверно повышала два года подряд урожай зерна на 12 % [10].

Вместе с тем успешное использование в практических целях явления гормезиса у глифосата и других пестицидов требует решения ряда фундаментальных вопросов: 1) выявления механизмов стимуляции роста и продуктивности растений малыми дозами гербицида; 2) определения условий, при которых гарантированно реализуется потенциальная возможность активации роста и устойчивости растений с использованием малых доз пестицидов; 3) разработки методологии и методов исследования явления гормезиса у разных по химической природе биологически активных веществ; 4) определения видовой и сортовой реакции растений на действие малых доз пестицидов.

В наших опытах ставилась задача установить зависимость доза–эффект на основе показателей роста корневой системы проростков ряда сельскохозяйственных растений при обработке семян растворами N-фосфонометилглицина в широком диапазоне концентраций [11]. Анализ полученного экспериментального материала позволил сделать вывод о том, что кривую зависимости доза–эффект в диапазоне использованных в опытах концентраций можно разделить на четыре зоны: зону стимуляции, зону постепенного усиления ингибирования роста, зону резкого ингибирования ростовых процессов, зону практически полного подавления роста проростков (рис. 1).

Цель данного исследования – изучение физиологических эффектов малых доз глифосата на проростках различных сельскохозяйственных культур и выявление видовой и сортовой специфичности ростовых реакций на инкрустацию семян глифосатом.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования были семена и проростки льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L., сорта Ласка и Веста), ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорта Радзимич и Фэст) и озимого рапса (*Brassica napus* L., сорт Империял).

Диапазон концентраций глифосата, используемых в опыте, составлял от $6,55 \cdot 10^{-5}$ до $1,55 \cdot 10^{-2}$ М (изменение в 236 раз) и был получен методом разбавления с шагом 1,25 раза в 1 %-ном водном растворе пленкообразователя Гисинар (сополимер акриламида и натриевой соли акриловой кислоты).

Опыты включали по 26 вариантов в 4-кратной повторности, контроль (1 %-ный р-р Гисинара) в 8-кратной повторности. Инкрустацию семян проводили вручную в стеклянной посуде. Расход рабочего раствора – 20 мкл/г семян.

Семена проращивали в бумажных рулонах по методике проращивания плоских и мелких семян [12] с модификацией, приведенной в [13, 14], физиологическое состояние проростков оценивали, как описано в работе [15]. Всхожесть определяли по ГОСТ 12038-84 [16]. Рулоны выдерживали

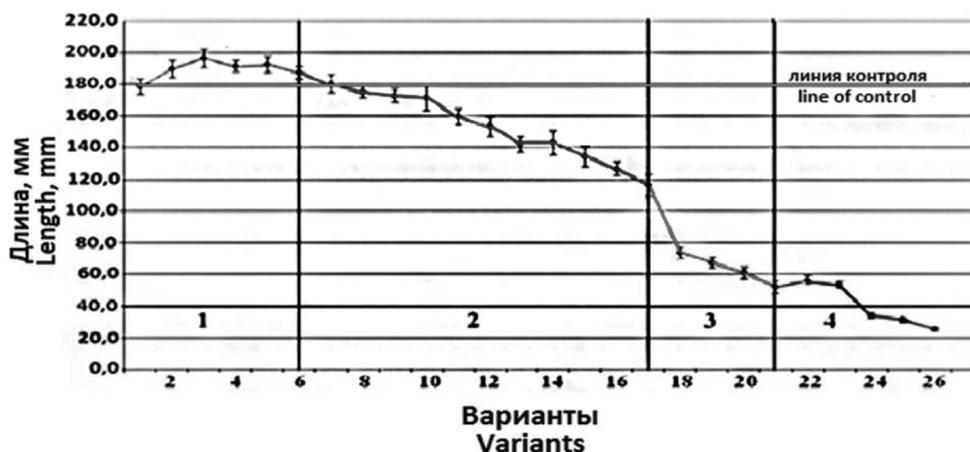


Рис. 1. Кривая зависимости доза–эффект при действии N-фосфометилглицина на рост корневой системы проростков ярового ячменя: 1 – зона стимуляции (гормезиса) (концентрации, при которых показатели длины корня/надземной части проростка достоверно превосходят контроль); 2 – зона постепенного усиления ингибирования роста (концентрации, при которых наблюдается плавное нарастание угнетения роста корня/надземной части); 3 – зона резкого ингибирования ростовых процессов (концентрации, при которых происходит резкое торможение роста проростков); 4 – зона полного подавления роста проростков

Fig. 1. The curve of dose-effect dependence in the action of N-phosphonomethylglycine on seedlings root growth of spring barley: 1 – stimulation zone (hormesis) (the concentration at which the length of roots/aerial part of the seedling was significantly superior to control); 2 – zone of gradual strengthening of growth inhibition (concentration at which there is gradual increase in the oppression of root/aerial part growth); 3 – zone of sharp inhibition of growth processes (concentration at which there is a sharp deceleration of seedlings growth); 4 – zone of complete suppression of seedlings growth

2 сут в термостате ТПС-2 при постоянной температуре 22 °С и на 3-и сутки помещали в условия искусственного освещения интенсивностью 7,5 тыс. лк (16 ч – свет, 8 ч – темнота).

Измерение длины корня и надземной части проводили на 3, 5, 7 и 9-е сутки. Содержание сухого вещества и массу 10 проростков измеряли на 7-е сутки. Для определения биометрических показателей при каждом учете брали по 15 проростков из каждого варианта и по 30 проростков из контролей.

Результаты и их обсуждение. В опытах со льном-долгунцом сорта Ласка выявлена зона стимуляции роста корневой системы в диапазоне концентраций глифосата от $7,7 \cdot 10^{-5}$ до $1,9 \cdot 10^{-4}$ М (на 9-е сутки). Величина стимуляции по отношению к контролю в наивысшей точке имела показатель 109,4 %, который является статистически достоверным. У льна-долгунца сорта Веста эффекта стимуляции не выявлено, при этом для указанного сорта характерна более высокая устойчивость к действию глифосата, чем для сорта Ласка. Выявлены различия в концентрациях, при которых начинается резкое ингибирование роста корня. Для сорта Ласка данная концентрация составила $2,6 \cdot 10^{-3}$ М, тогда как для сорта Веста – $5,1 \cdot 10^{-3}$ М, что в 1,9 раза выше. Кроме того, концентрация, при которой наблюдалась остановка роста корня у сорта Веста, в 2 раза выше аналогичной концентрации у сорта Ласка (рис. 2).

Для каждого сорта можно выделить диапазон концентраций, при которых отмечаются резкое снижение: у сорта Ласка – от $2,6 \cdot 10^{-3}$ до $5,1 \cdot 10^{-3}$ М (в 1,9 раза), у сорта Веста – от $5,1 \cdot 10^{-3}$ до $1 \cdot 10^{-2}$ М (в 2 раза), а затем и полная остановка роста корней.

Анализ полученных данных показывает, что независимо от сорта и концентрации глифосата всхожесть семян льна-долгунца составила 98 %, как и в контроле. Энергия прорастания была на уровне 95 % для всех вариантов. Изменение длины гипокотилей для обоих сортов незначительны при всем диапазоне концентраций, использованных в эксперименте.

В опыте с яровым ячменем выявлено, что инкрустирование семян раствором N-фосфометилглицина приводит к статистически достоверному ингибированию роста корневой системы, начиная с концентрации $1,4 \cdot 10^{-3}$ М у сорта Радзимич и $1,7 \cdot 10^{-3}$ М у сорта Фэст, при концентрациях более 0,17 % активность ростовых процессов незначительна у проростков обоих сортов.

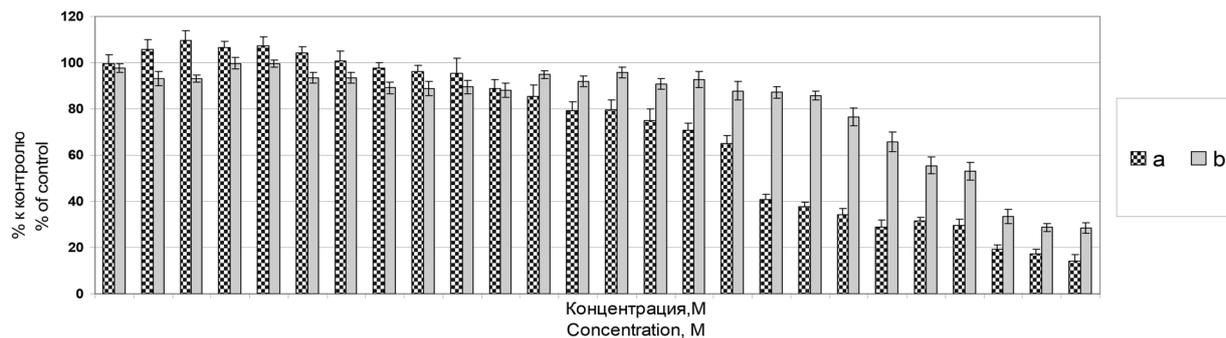


Рис. 2. Зависимость длины корня проростков льна-долгунца (*a* – сорт Ласка, *b* – сорт Веста) от концентрации глифосата (9-е сутки)

Fig. 2. The dependence of the seedlings root length of flax (*a* – cv. Laska, *b* – cv. Vesta) on the glyphosate concentration (9 days)

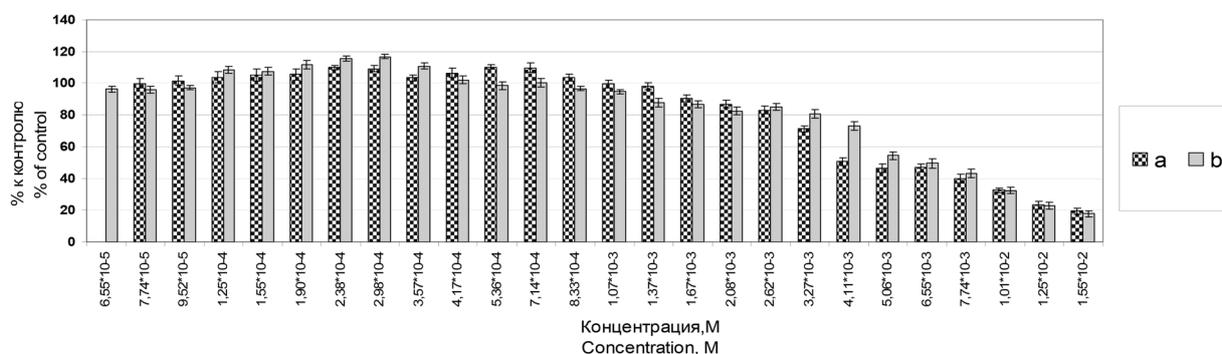


Рис. 3. Зависимость длины корня проростков ярового ячменя (*a* – сорт Фэст, *b* – сорт Радзимич) от концентрации глифосата (9-е сутки)

Fig. 3. The dependence of the seedlings root length of spring barley (*a* – cv. Fest, *b* – cv. Radzimich) on the glyphosate concentration (9 days)

Для сорта Радзимич в диапазоне концентраций от $1,3 \cdot 10^{-4}$ до $3 \cdot 10^{-4}$ М выявлена стимуляция роста корня, являющаяся статистически значимой. Следует отметить, что для сорта Фэст этот диапазон шире – от $1,3 \cdot 10^{-4}$ до $7,1 \cdot 10^{-4}$ М (рис. 3).

Резкое снижение роста корня наблюдалось у сорта Радзимич при концентрации глифосата $4,1 \cdot 10^{-3}$ М, у сорта Фэст – $5,1 \cdot 10^{-3}$ М, что может характеризовать его как более устойчивый к воздействию N-фосфометилглицина.

Установлено также, что воздействие глифосата на рост надземной части проростков значительно слабее, чем на рост корневой системы. Так, для обоих сортов ячменя ингибирование роста первого листа начинается при концентрации $5,1 \cdot 10^{-3}$ М, увеличиваясь с ее повышением. Стимуляцию роста надземной части наблюдали в диапазоне концентраций от $9,5 \cdot 10^{-5}$ до $4,1 \cdot 10^{-3}$ М.

Энергия прорастания семян независимо от концентрации глифосата сохранялась для всех вариантов на уровне 97 %, всхожесть – на уровне 99 %.

В свою очередь экспериментальные данные, полученные в опыте с озимым рапсом, свидетельствуют об отсутствии эффекта стимуляции роста корневой системы (рис. 4) и надземной части проростков этой культуры при инкрустации семян N-фосфометилглицином. При этом для рапса характерна более высокая устойчивость к действию глифосата, чем для других исследуемых культур.

Так, концентрация, при которой начинается резкое ингибирование роста корня, равна $1 \cdot 10^{-2}$ М, тогда как у других исследуемых культур она на порядок ниже (рис. 5) и составляет для растений ярового ячменя $5,1 \cdot 10^{-3}$ М (Радзимич) и $4,1 \cdot 10^{-3}$ М (Фэст), для льна-долгунца $2,6 \cdot 10^{-3}$ М (Ласка) и $5,1 \cdot 10^{-3}$ М (Веста).

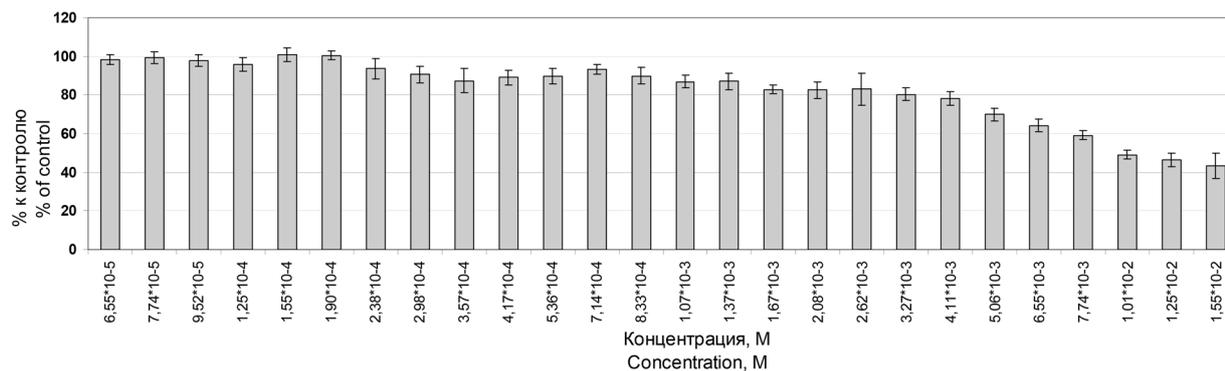


Рис. 4. Зависимость длины корня проростков озимого рапса (сорт Империял) от концентрации глифосата (9-е сутки)

Fig. 4. The dependence of the seedlings root length of winter rape (cv. Imperial) on the glyphosate concentration (9 days)

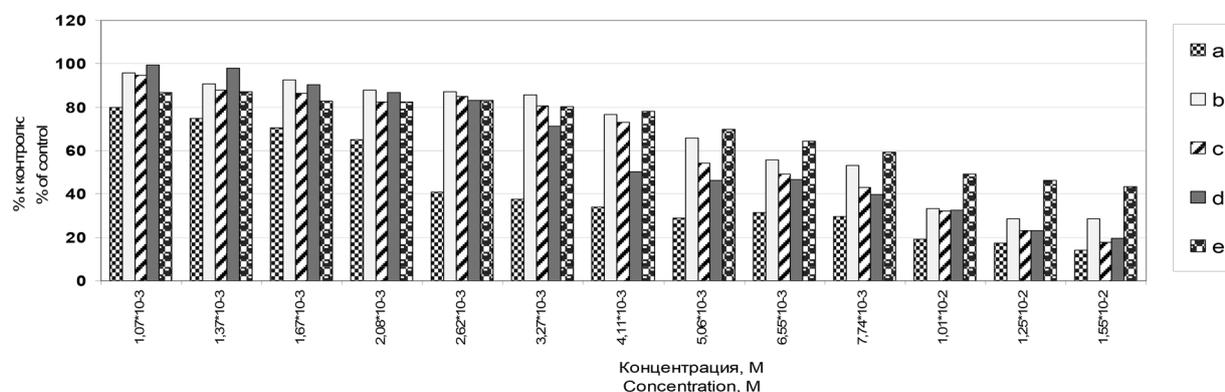


Рис. 5. Показатели роста корневой системы проростков различных культур и сортов в диапазоне концентраций глифосата от 1,07*10⁻³ до 1,55*10⁻² М (а – лен-долгунец сорта Ласка, б – лен-долгунец сорта Веста, с – ячмень сорта Радзимич, d – ячмень сорта Фэст, e – рапс сорта Империял)

Fig. 5. Root growth indices of seedlings of different crops and varieties in a range of glyphosate concentrations of 1,07*10⁻³ to 1,55*10⁻² M (a – flax cv. Laska, b – flax cv. Vesta, c – barley cv. Radzimich, d – barley cv. Fest, e – rape cv. Imperial)

Заклучение. Таким образом, установлена зависимость доза–эффект для каждой исследуемой культуры в широком диапазоне концентраций N-фосфонометилглицина. Результаты исследования указывают на наличие видовой и сортовой специфичности ростовых реакций проростков на инкрустацию семян данным гербицидом. Следовательно, для обоснования практического использования наблюдаемых эффектов необходимо детальное изучение влияния глифосата на сельскохозяйственные культуры не только разных видов, но и разных сортов.

Следует отметить, что выявленный диапазон концентраций, при которых наблюдалась стимуляция роста корневой системы, был устойчивым и воспроизводился от опыта к опыту, что рассматривается нами как проявление эффекта гормезиса.

Список использованных источников

1. К обоснованию гормезиса как фундаментальной биомедицинской парадигмы (обзор литературы и результатов собственных исследований) / Л. М. Шафран [и др.] // Совр. проблемы токсикол. – Киев: Медицина Украины. – 2010. – № 2/3. – С. 13–23.
2. Криштопенко, С. В. Доза–эффект / С. В. Криштопенко, М. С. Тихов, Е. Б. Попова. – М.: Медицина, 2008. – 288 с.
3. Calabrese, E. J. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists / E. J. Calabrese // Environ. Toxicol. Chem. – 2008. – Vol. 27. – P. 1451–1474.

4. Calabrese, E. J. The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology / E. J. Calabrese, L. A. Baldwin // *Toxicol. Sci.* – 2003. – Vol. 71. – P. 246–250.
5. Hemphill, D. D. Response of Vegetable Crops to Sublethal Application of 2,4-D / D. D. Hemphill, Jr. Montgomery, M. L. Montgomery // *Weed Sci.* – 1981. – Vol. 29, N 6. – P. 632–635.
6. Wiedman, S. J. Plant growth stimulation by sublethal concentrations of herbicides / S. J. Wiedman, A. P. Appleby // *Weed res.* – 1972. – Vol. 12. – P. 65–74.
7. Duke, S. O. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide / S. O. Duke, S. B. Powles // *Pest Management Sci.* – 2008. – Vol. 64. – P. 319–325.
8. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth / E. D. Velini [et al.] // *Pest Management Sci.* – 2008. – Vol. 64. – P. 489–496.
9. Response of Eucalyptus (*Eucalyptus urograndis*) plants at different doses of glyphosate / F. C. M. Pereira [et al.] // *J. of Agricult. Sci.* – 2013. – Vol. 5, N 1. – P. 66–74.
10. Chemical stress can increase crop yield / N. Cedergreen [et al.] // *Field Crops Res.* – 2009. – Vol. 114. – P. 54–57.
11. Исследование зависимости «доза–эффект» по реакции роста проростков при обработке семян 6-фосфонометилглицином (глифосатом) / Н. А. Ламан [и др.] // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: материалы VIII Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 28–30 октября 2015 г. / НАН Беларуси, Ин-т эксперим. ботаники им. В. Ф. Купревича, Белорус. обществ. объединение физиологов растений; науч. ред. Н. А. Ламан. – Минск: Колоград, 2015. – С. 69.
12. Ламан, Н. А. Проращивание мелких, плоских и долго прорастающих семян рулонным методом с использованием синтетической вентиляционной сетки / Н. А. Ламан, С. И. Будай, О. Э. Барнатович // *Вес. Акад. аграр. навук РБ.* – 2000. – № 4. – С. 57–61.
13. Особенности действия брассиностероидов в составе инсекто-фунгицидных композиций на рост проростков рапса (*Brassica napus* L.) в условиях низкотемпературного стресса / А. Ф. Судник [и др.]; Ин-т эксперим. ботаники НАН Беларуси // *Ботаника (исследования).* – Вып. 40. – Минск: Право и экономика, 2011. – С. 560–574.
14. Судник, А. Ф. Методика проращивания семян льна-долгунца и рапса и создания низкотемпературного стресса для проростков / А. Ф. Судник, Н. А. Ламан, Л. Б. Куканего // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: материалы VII Междунар. научн. конф., Минск, 26–28 октября 2011 г. – Минск, 2011. – С. 198.
15. Алексейчук, Г. Н. Сила роста семян зерновых культур и ее оценка методом ускоренного старения / Г. Н. Алексейчук; Ин-т эксперим. ботаники НАН Беларуси; под ред. Н. А. Ламана. – Минск: Право и экономика, 2009. – 44 с.
16. ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. – Введ. 19.12.84. – М.: Изд-во стандартов, 1985. – 57 с.

References

1. Shafran, L. M., Mokiенko, A. V., Petrenko, N. F., Gozhenko, A. I. and Nasibullin, B. A. (2010) “To substantiation hormesis as a fundamental biomedical paradigm (literature review and the own research results)”, *Sovremennyye problemy toksikologii* [Current problems of toxicology], no. 2/3, pp. 13-23.
2. Krishtopenko, S. V., Tikhov, M. S. and Popova, E. B. (2008) *Doza-effekt* [Dose-response], Medicine, Moscow, RU.
3. Calabrese, E. J. (2008) “Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 27, pp. 1451-1474.
4. Calabrese, E. J. and Baldwin, L. A. (2003) “The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology”, *Toxicological Sciences*, vol. 71, pp. 246–250.
5. Hemphill D. D., Montgomery, Jr. and Montgomery, M. L. (1981) “Response of Vegetable Crops to Sublethal Application of 2,4-D”, *Weed Science*, vol. 29, no. 6, pp. 632-635.
6. Wiedman, S. J. and Appleby, A. P. (1972) “Plant growth stimulation by sublethal concentrations of herbicides”, *Weed research*, vol. 12, pp. 65-74.
7. Duke, S. O. and Powles, S. B. (2008) “Glyphosate: a once-in-a-century herbicide», *Pest Management Science*, vol. 64, pp. 319-325.
8. Velini, E. D., Alves, E., Godoy, M. C., Meschede, D. K., Souza, R. T. and Duke, S. O. (2008) “Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth”, *Pest Management Science*, vol. 64, pp. 489-496.
9. Pereira, F. C. M., Nepomuceno, M. P., Pires, R. N., Parreira, M. C. and Alves, P. L. da C. A. (2013) “Response of Eucalyptus (*Eucalyptus urograndis*) plants at different doses of glyphosate», *Journal of Agricultural Science*, vol. 5, no. 1, pp. 66-74.
10. Cedergreen, N. N., Felby, C., Porter, J. R. and Streibig, J. C. (2009) “Chemical stress can increase crop yield”, *Field Crops Research*, vol. 114, pp. 54-57.
11. Laman, N. A., Kem, K. R., Khripach, A. V. and Sudnik, A. F. (2015) “The investigation of the “dose-response” dependence by the reaction of seedling growth on the seed incrustation by 6-phosphonomethylglycine (glyphosate)”, *Regulyatsiya rosta, razvitiya i produktivnosti rastenii: Materialy VII Mezhdunarod. nauch.-praktich. konf., Minsk, 28-30 oktyabrya 2015 g.* [The regulation of growth, development and productivity of plants: Materials VIII Intern. scientific-practical. conf., Minsk, 28-30 October 2015], V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Kolograd, Minsk, BY, p. 69.
12. Laman, N. A., Budai, S. I. and Barnatovich, O. E. (2000) “The sprouting of small, flat and long germinating seeds by roll method using a synthetic ventilation grid”, *Vestsi Natsyyanalнай Akademii navuk Belarusi. Ser. byial. navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus], no. 4, pp. 57-61.

13. Sudnik, A. F., Laman, N. A., Doroshchuk, O. V. and Kukanego, L. B. (2011) “Features of action of brassinosteroids as a part of insecticide-fungicide compositions on the growth of seedlings of rape (*Brassica napus* L.) in the conditions of low-temperature stress”, *Botanika (issledovaniya)* [Botany (investigations)], vol. 40, pp. 560-574.

14. Sudnik, A. F., Laman, N. A. and Kukanego, L. B. (2011) “Methods of germination of seeds of flax and rape, and the creation of a low-temperature stress for seedlings”, *Regulyatsiya rosta, razvitiya i produktivnosti rastenii: Materialy VII Mezhdunarod. nauch. konf.* [The regulation of growth, development and productivity of plants: Materials of VII International Scientific Conference], Minsk, BY, p. 198.

15. Alekseichuk, G. N. *Sila rosta semyan zernovykh kultur i ee otsenka metodom uskorennoy stareniya* [The power of cereal seeds growth and its valuation by method of accelerated aging], Institut eksperimentalnoi botaniki im. V. F. Kuprevicha NAN Belarusi [V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus], Minsk, BY.

16. (1985) GOST 12038-84. *Semena sel'skokhozyaystvennykh kultur. Metody opredeleniya vskhozhesti* [State Standard 12038-84. Seeds of agricultural crops. Methods for determining the germination]. Intod. 19.12.84, Standartinform Publ, Moscow, RU.

Информация об авторах

Ламан Николай Афанасьевич – академик, д-р биол. наук, профессор, зав. лаб. роста и развития растений. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: nikolai.laman@gmail.com

Кем Карина Робертовна – мл. науч. сотрудник лаборатории роста и развития растений. Институт экспериментальной ботаники им. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kem-666@mail.ru

Судник Алла Федоровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории роста и развития растений. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: allasudnik@tut.by

Для цитирования

Ламан, Н. А. Ростовые реакции проростков отдельных видов и сортов сельскохозяйственных растений на обработку семян глифосатом (N-фосфометилглицином) / Н. А. Ламан, К. Р. Кем, А. Ф. Судник // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 7–13.

Information about the authors

Laman Nikolai Afanas'evich – academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of Laboratory of plant growth and development. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya str., 27, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nikolai.laman@gmail.com

Kem Karina Robertovna – Junior Researcher of laboratory of plant growth and development. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya str., 27, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kem-666@mail.ru

Sudnik Alla Fedorovna – Ph. D., Senior Researcher of laboratory of plant growth and development. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya str., 27, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: allasudnik@tut.by

For citation

Laman N. A., Kem K. R., Sudnik A. F. Growth responses of seedlings of certain species and varieties of agricultural plants for seeds incrustation by glyphosate (N-phosphonomethylglycine). *Proceedings of the National academy of sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 7–13.

Г. С. Бородич

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ДИНАМИКА СМЕНЫ ЛИСТЬЕВ У БОРОДАТЫХ ИРИСОВ (*BEARDED IRISES*) ПРИ ИНТРОДУКЦИИ

Изучена динамика смены листьев у бородачатых ирисов на примере 12 сортов ириса гибридного (*Iris hybrida* Hort.) иностранной селекции. Подтверждено наличие двух периодов роста листьев: весенне-летнего и позднелетне-осеннего, а у некоторых сортов – наличие короткого периода покоя между ними.

Установлена зависимость продолжительности периода появления листьев позднелетне-осенней генерации от времени выведения сорта. Показано, что второй период роста у исследуемых сортов прерывается вынужденным покоем.

Ключевые слова: бородачатые ирисы, сорта ириса гибридного, листовые пучки, смена листьев, период роста.

G. S. Borodich

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

DYNAMICS OF CHANGE OF LEAVES IN BEARDED IRISES (*BEARDED IRISES*) IN THE INTRODUCTION

The dynamics of changing leaves of bearded iris on the example of 12 hybrid varieties of iris (*Iris hybrida* Hort.) foreign selection was studied. Confirmed the existence of two growth periods of leaves: spring-summer and late summer-autumn, as well as some varieties of a short period of rest in between.

The dependence of the duration of the appearance of leaves late summer-autumn on the time of generation of breeding varieties. It was shown that the second period of growth in the studied varieties interrupted forced rest.

Keywords: bearded iris, iris hybrid varieties, leafy bundles, changing leaves, the period of growth.

Введение. Культура ирисов, в частности садовых бородачатых, для Беларуси не новая. В городах и в сельской местности эти растения с крупными, необычной формы душистыми цветками и с мечевидными листьями, собранными в веер, разводили издавна [1]. В последнее время для выращивания привлекаются другие группы ирисов, но бородачатые до сих пор являются фаворитами декоративных насаждений.

Сорта садовых бородачатых ирисов принято называть сортами ириса гибридного (*I. hybrida* Hort.). Эти сорта, завезенные из Западной Европы, Средиземноморья, Ближнего Востока и горных районов Индии, получены в результате гибридизации природных видов [2]. Изначально это были западноевропейские диплоиды с двойным набором хромосом ($2n = 24$). В конце XIX в. к гибридизации стали активно привлекаться тетраплоиды ($2n = 48$) южного происхождения с разветвленным цветоносом и увеличенным размером цветков. В селекции современных сортов доля диплоидов чрезвычайно мала. Они менее декоративны и поэтому практически не используются селекционерами.

При интродукции сортов бородачатых ирисов в условия Беларуси представляется актуальным изучение процессов их роста и развития в новых условиях произрастания, что позволяет оценить степень адаптированности этих растений к погодно-климатическим условиям республики.

Сорта *I. hybrida* Hort зимуют без укрытия. Сумма положительных среднесуточных температур в период вегетации ирисов является достаточной для закладки цветочных почек, поэтому растения цветут фактически ежегодно [3].

По срокам вегетации ирисы относятся к группе весенне-летне-осеннезеленых растений, которые в течение вегетационного периода образуют две генерации листьев и уходят под снег

зелеными [4]. Согласно Г. И. Родионенко [5], в условиях северо-запада России они имеют два периода роста: весенне-летний и позднелетне-осенний.

Цель нашего исследования – изучение роста и развития листьев сортов высокорослых бородатых ирисов в течение вегетационного периода в центральной агроклиматической зоне Беларуси.

Объекты и методы исследования. Наблюдения проводили на коллекционном участке ирисов в ЦБС НАН Беларуси в сходные по температурному режиму сезоны 2014–2015 гг. (температурный фон был выше климатической нормы). Объектами исследования явились 12 высокорослых сортов ириса гибридного иностранной селекции в возрасте 3 лет. В опыт были вовлечены старые, средневозрастные и новые сорта (по времени интродукции).

Before the Storm (1989, США) – цветок крупный, темно-фиолетовый (черный), доли гофрированные;

Cayenne Capers (1961, США) – цветок крупный, бордовый, бархатистый, гофрированный;

Dancer's Veil (1959, США) – цветок крупный, гофрированный, доли с голубовато-сиреневой каймой;

Kytice (1972, Чехия) – цветок крупный, доли белые с сиреневой крапчатой каймой по краю, слегка гофрированные;

Madame Chereau (1844, Франция) – цветок не крупный, доли белые с сиреневой крапчатой каймой, волнистые;

Pacific Panorama (1960, США) – цветок средний, ярко-синий, доли волнистые;

Paper Moon (1954, США) – цветок крупный, нежно-желтый, доли волнистые;

Red Majesty (1944, США) – цветок крупный, красно-коричневый, доли гофрированные;

Siva-Siva (1962, США) – цветок крупный, доли желто-коричневые, переливчатые;

That's all Folks (2005, США) – цветок крупный, сильно гофрированный, доли желтые с белым пятном;

White City (1937, Англия) – цветок крупный, белый, доли слабо гофрированные;

Медный Всадник (1974, Украина) – цветок крупный, светло-коричневый, гофрированный.

Количество листьев в листовых пучках (веерах) оценивали каждые 7–14 дней, учитывая только срединные листья (количество низовых листьев не подсчитывали ввиду их раннего отмирания). После подсчета сухие листья удаляли. Высоту листовых пучков оценивали по размеру самого длинного листа. Рост листьев отслеживали, применяя метод татуировки, предложенный Г. И. Родионенко [5]. Для этого делали серию сквозных проколов, например шариковой ручкой, на листовые пластинки в пучках. В опыт было включено по 5 кустов каждого сорта, а в кустах – по 1 вееру.

Листовые пучки названы по времени их формирования или появления. Так, летние пучки формируются летом и осенью текущего года в результате смены листьев в осенних пучках предыдущего и весенних пучках текущего года. В таких веерах, как правило, летом закладываются цветочные почки. Осенние и весенние листовые пучки появляются из осенних почек осенью текущего или весной следующего года соответственно.

Результаты и их обсуждение. Слабые ночные заморозки и плюсовые дневные температуры во второй половине зимы при отсутствии снежного покрова в период исследований способствовали очень раннему (середина марта) отрастанию ирисов. К концу месяца в летних пучках появлялись молодые листочки (1–3 на веер) длиной 15–20 см. Осенние веера с 3–4 листочками к этому времени достигали высоты 10–20 см. В марте фиксировалось также появление весенних вееров. Так, например, у сортов *Before the Storm* и *That's all Folks* их насчитывалось 3–5 штук на куст, а у *Pacific Panorama* и *Madame Chereau* – 8–10.

В апреле начинали отмирать листья, зимовавшие в летних веерах и некоторых осенних. Длина молодых листьев во всех пучках увеличивалась. На начало мая у опытных растений высота летних вееров составляла 30–50 см, у осенних – 30–40, у весенних – 20–40.

Несмотря на раннее отрастание листьев, фазы бутонизации и цветения у высокорослых ирисов проходили в обычные сроки (май–июнь). Начиная с середины мая у сортов в летних пучках появлялись генеративные побеги, что тормозило рост листьев. На момент цветения в них насчитывалось, как правило, 2–4 листа длиной 40–50 см.

После цветения цветоносы и листья постепенно засыхали и легко удалялись. Таким образом, летние пучки заканчивали свое существование.

В конце цветения в «нецветущих» летних пучках, где цветонос по каким-либо причинам не сформировался, а также в осенних и весенних насчитывалось от 5 до 7 листьев. Высота веера в зависимости от сорта составляла от 40 до 70 см.

У себя на родине из-за засухи бородачатые ирисы после цветения находятся в состоянии спячки в течение продолжительного периода времени. И это их единственный период отдыха, потому что ввиду теплой зимы рост растений не прекращается.

В умеренных широтах наблюдалась совсем иная картина при интродукции ирисов. Методом татуировки установлено, что по окончании цветения у опытных ирисов в течение 5–14 дней продолжается рост центральных (срединных) листьев до достижения ими определенной длины, равной или превышающей на 1–2 см длину внешних листьев веера. Прирост листьев у сортов составлял от 1 до 15 см. После этого у большинства сортов (*Cayenne Capers*, *Dancer's Veil*, *Paper Moon*, *Red Majesty*, *White City*, Медный Всадник) наступал период относительного покоя (5–14 дней), когда заметных изменений в листовых пучках не происходило. У сортов *Before the Storm*, *Kytice* и *That's all Folks* приостановка роста листьев в некоторых веерах отмечалась сразу после цветения (через 4–5 дней). Часть вееров не «отдыхала», так как в них продолжался замедленный рост срединных листьев. В листовых пучках ирисов *Madame Chereau*, *Siva-Siva*, *Pacific Panorama* период покоя также носил условный характер.

Известно, что смена листьев у ирисов происходит путем появления и роста центральных листьев веера и отмирания внешних. В процессе наблюдений определялось количество дней от окончания цветения сорта до появления молодых листочков в его веерах. Результаты приведены в таблице.

**Продолжительность периода появления молодых листьев
в пучках бородачатых ирисов в позднелетне-осенний этап вегетации**

Сорт	Продолжительность периода появления листьев, дни	
	Первый лист	Последний лист
<i>Before the Storm</i>	26	65
<i>Cayenne Capers</i>	26	111
<i>Dancer's Veil</i>	22	66
<i>Kytice</i>	22	99
<i>Madame Chereau</i>	22	26
<i>Pacific Panorama</i>	22	31
<i>Paper Moon</i>	22	26
<i>Red Majesty</i>	22	42
<i>Siva-Siva</i>	22	65
<i>That's all Folks</i>	22	99
<i>White City</i>	22	36
Медный Всадник	26	45

Анализ полученных данных показал, что первые листья летне-осенней генерации начинают появляться спустя 3–4 недели после цветения. Весенние листья к этому времени у одних сортов уже закончили свой рост, у других – заканчивают.

Из таблицы видно, что у некоторых сортов (*Cayenne Capers*, *Kytice*, *That's all Folks*) процесс появления молодых листьев длится до глубокой осени (даже после первых заморозков) и составляет максимум 99–111 дней.

Установлено, что чем старше сорт по времени выведения, тем активнее и быстрее появляются срединные листья в веерах. Так, у *Madame Chereau*, *Pacific Panorama*, *Paper Moon* и *White City* этот период составил максимум 26–36 дней.

Наибольшее количество листьев в осенних и весенних пучках отмечается в июле–августе и составляет, как правило, 7–8 штук. Такой веер листьев означает наличие у данного сорта

молодого, хорошо сформировавшегося к этому времени корневища. Известно, что при таком количестве листьев в августе текущего года в веерах с большой вероятностью закладываются цветочные почки для цветения в следующем году [2]. Из наблюдаемых сортов исключение составили *Cayenne Capers*, *Red Majesty* и *That's all Folks*, у которых в веерах насчитывалось от 2 до 6 листов.

По наблюдениям Г. И. Родионенко [2], «с наступлением осенних похолоданий у многих сортов прекращается рост центрального листа в листовом пучке, и соседние с ним два листа образуют как бы ножницы. Сорта, у которых продолжается активный рост центрального листа, ножниц не образуют, что плохо отражается на их зимостойкости». Другие авторы [6, 7] утверждают, что фаза ножниц у высокорослых бородатых ирисов встречается редко, что в первую очередь относится к современным тетраплоидным сортам.

Анализируя полученные данные, можно отметить, что наличие фазы ножниц зависит прежде всего от сортовых особенностей и не зависит от времени выведения сорта. Так, эта фаза отсутствовала у *Madame Chereau* (1844), *Dancer's Veil* (1959), *Before the Storm* (1989), *That's all Folks* (2005).

В нашем опыте фаза ножниц наблюдалась у некоторых сортов с поздним появлением молодых листьев, а также у не успевших отмереть весенних листьев, причем наиболее отчетливо – у *Cayenne Capers* и *Red Majesty*. У сортов *Kytice*, Медный Всадник и в некоторых веерах *Siva-Siva* прослеживалась фаза односторонних ножниц. Одновременные наблюдения за этими же сортами в однолетних посадках показали, что фазы ножниц у ирисов не было. Молодые растения, в силу своих возможностей, к этому времени успели сформировать полноценные веера. Видимо, продолжительность выращивания ирисов на одном месте также является одной из причин появления фазы ножниц.

Установлено, что активное отмирание внешних листьев в пучках начинается приблизительно в середине июля. Этот процесс длится 3–3,5 мес., т. е. до самых заморозков. В конце вегетационного сезона в пучках фиксировалось присутствие как молодых летних листьев, так и неотмерших или полуотмерших весенних. Таким образом, прошлогодние осенние пучки и весенние пучки текущего года превращались в летние за счет смены листьев.

В сентябре–октябре у наблюдаемых ирисов появлялись осенние веера в количестве 1–4 на одно растение. Высота их, как правило, составляла всего 3–5 см. Дальнейший их рост и развитие ограничивались температурным фактором.

В ноябре у большинства сортов количество листьев в пучках уменьшалось до 4–5. Уменьшалась также и высота пучков (20–40 (50) см).

К концу сезона у растений замедлялись процессы роста центральных и отмирания внешних листьев. Листья приобретали оливковый оттенок, теряли тургор. Повреждений растений ночными заморозками не отмечалось.

В то же время в веерах у новых сортов *Before the Storm* (ноябрь 2014 г.) и *That's all Folks* (ноябрь 2015 г.) обнаружено появление срединных молодых листьев. Это свидетельствует о том, что ритм развития растений не соответствует сезонным изменениям погоды данного региона, а также о том, что зимний покой у сортов бородатых ирисов вынужденный и обусловлен в первую очередь низкими температурами.

Заключение. Изучение динамики смены листьев у сортовых бородатых ирисов подтвердило наличие у них двух периодов роста: весенне-летнего и позднелетне-осеннего. Первый характеризуется появлением и активным ростом весенней генерации листьев и цветоносов. После цветения генеративные побеги и летние пучки листьев, в которых они развивались, отмирают. Наступает короткий период покоя (5–14 дней), который у некоторых сортов может носить условный характер. Второй период роста знаменуется сменой весенних листьев во всех типах пучков: осенних, весенних и летних (у которых не было цветоносов) на летние, а также появлением осенних листовых пучков текущего года. Установлено, что продолжительность периода появления листьев позднелетне-осенней генерации зависит от времени выведения сорта. Активнее и быстрее эти процессы идут старых сортов. Тенденция к вечнозелености наиболее четко проявляется у современных тетраплоидов. Молодые срединные листья в веерах у них могут появляться в ноябре после первых заморозков. При выращивании в условиях умеренного климата позднелетне-осенний период у бородатых ирисов прерывается вынужденным покоем.

Список использованных источников

1. Декоративные травянистые растения для открытого грунта СССР. – Л.: Наука, 1977. – Т. 1. – С. 99.
2. Родионенко, Г. И. Ирисы / Г. И. Родионенко. – СПб., 2002.
3. Бородич, Г. С. Особенности сезонного развития сортов бородатых ирисов (*Bearded irises*) при интродукции в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси / Г. С. Бородич // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2011. – № 2. – С. 14–17.
4. Сидорович, Е. А. Интродукция травянистых многолетников в Беларуси / Е. А. Сидорович, Н. М. Лунина. – Минск: Навука і тэхніка, 1992.
5. Родионенко, Г. И. Род Ирис-Iris / Г. И. Родионенко. – М.; Л., 1961.
6. Пирогов, Ю. К. Уроки последних лет / Ю. К. Пирогов // Ирисы России (ежегод. бюл.). – 2005. – Вып. 13. – С. 66–68.
7. Игонина, Е. В. Зимостойкость ирисов / Е. В. Игонина // Ирисы России (ежегод. бюл.). – 2013. – Вып. 21. – С. 35–44.

References

1. (1977) *Dekorativnye travyanistye rasteniya dlya otkrytogo grynta SSSR* [Ornamental herbaceous plants for the open ground of the USSR], Nauka, Leningrad, RU, vol. 1, p. 99.
2. Rodionenko, G. I. (2002) *Irisy* [Iris], Sankt-Peterburg, RU.
3. Borodich, G. S. (2011) "Peculiarities of the seasonal development of varieties of bearded iris (*Bearded irises*) when introduced in the Central Botanical garden of NAS of Belarus", *Vestsy NAN Belarusi. Ser. Biyal. Navuk* [News of NAS of Belarus. Ser. biyal. nauk], no. 2, pp. 14–17.
4. Sidorovich, E. A. and Lunina, N. M. (1992) *Introduktsiya travyanistykh mnogoletnikov v Belarusi* [Introduction herbaceous perennials in Belarus], Navuka i tekhnika, Minsk, BY.
5. Rodionenko, G. I. (1961) *Rod Iris-Iris* [The genus Iris-Iris], Moscow, Leningrad, RU.
6. Pirogov, U. K. (2005) "The lessons of recent years", *Irisy Rossii (ezhegodnyi byulleten')* [Iris Russia (annual bulletin)], no. 13, pp. 66–68.
7. Igonina, E. V. (2013) "Hardiness irises", *Irisy Rossii (ezhegodnyi byulleten')* [Iris Russia (annual bulletin)], no. 21, pp. 35–44.

Информация об авторах

Бородич Галина Сергеевна – науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2А, 220022, Минск, Республика Беларусь). E-mail: G.Borodich@cbg.org.by

Information about the authors

Borodich Galina – Scientific Researcher. Central Botanical Garden of NAS of Belarus (Surganova str., 2A, 220022, Minsk, Republic of Belarus.) E-mail: G.Borodich@cbg.org.by

Для цитирования

Бородич, Г. С. Динамика смены листьев у бородатых ирисов (*Bearded irises*) при интродукции / Г. С. Бородич // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 14–18.

For citation

Borodich G. S. Dynamics of change of leaves in bearded irises (*bearded irises*) with introductions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 14–18.

Е. В. Вязов, Н. В. Шалыго

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**АКТИВНОСТЬ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА
И ЗАЩИТНАЯ СИСТЕМА РАСТЕНИЙ ОГУРЦА (*CUCUMIS SATIVUS* L.)
ПРИ УЗКОПОЛОСНОМ ОСВЕЩЕНИИ РАЗЛИЧНОГО СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА**

Освещение растений огурца с применением красных и синих светодиодов приводит к небольшому снижению активности фотосистемы 2, что вызвано адаптацией фотосинтетического аппарата. Используемое светодиодное освещение не оказывает существенного влияния на площадь листа и сухую массу растений, а при применении только синих светодиодов наблюдается интенсификация их роста. Под красными светодиодами активизируется антиоксидантная и антипатогенная защита растений. Полученные результаты могут быть применены для оптимизации условий выращивания растений в теплицах.

Ключевые слова: фотосистема 2, защитная система, условия освещения, *Cucumis sativus* L.

Y. V. Viazau, N. V. Shalygo

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**PHOTOSYNTHETIC APPARATUS AND DEFENSE SYSTEM OF CUCUMBER (*CUCUMIS SATIVUS* L.)
PLANTS UNDER LED LIGHTING OF DIFFERENT SPECTRAL COMPOSITION**

Lighting with the use of red and blue light-emitting diodes (LED) causes a slight decrease in photosystem II activity due to an adaptation of photosynthetic apparatus in cucumber plants. Applied lighting generally does not have a significant effect on leaf area and dry weight of plants. However, intensification of growth under blue LEDs alone takes place. Red narrow-band light induces antioxidant and anti-pathogenic protection in cucumber plants. The obtained results can be applied for optimization of the growing conditions of greenhouse plants.

Keywords: photosystem 2, defense system, lighting conditions, *Cucumis sativus* L.

Введение. Известно, что спектральный состав освещения оказывает влияние на структуру и функционирование фотосинтетического аппарата, рост и развитие растений [1, 2]. Такое влияние опосредовано фоторецепторами, участвующими в восприятии видимого света и ультрафиолета, и фотосинтетическими пигментами [3, 4]. В условиях естественного освещения только часть поглощенной пигментами энергии светового излучения может быть использована для целей фотосинтеза [5]. Как правило, существует некоторый избыток энергии, который затем просто рассеивается посредством флуоресценции хлорофилла или в виде тепла. Эта избыточная энергия может также мигрировать с возбужденных молекул хлорофилла на молекулы кислорода, приводя к образованию синглетного кислорода, либо вызывать дисбаланс в фотосинтетической электрон-транспортной цепи, при котором отдельные ее компоненты могут быть чрезмерно восстановлены или окислены, что повышает вероятность образования супероксидного анион-радикала и других активных форм кислорода [6, 7]. Известно, что избыточное накопление активных форм кислорода (например, при воздействии ряда абиотических стрессовых факторов или при проникновении патогенов) приводит к развитию окислительного стресса, сопровождающегося рядом деструктивных окислительных процессов. С другой стороны, при этом обычно наблюдается активация защитной системы: увеличение содержания низкомолекулярных антиоксидантов, повышение активности антиоксидантных ферментов, накопление стрессовых белков.

Можно предположить, что ввиду наличия связи между утилизацией энергии светового излучения и накоплением активных форм кислорода возможны специфические различия в интенсив-

ности окислительных процессов и, следовательно, в активности защитной системы растения в зависимости от спектрального состава освещения. Это может быть обусловлено в том числе и тем фактором, что кванты света разной длины поглощаются разными наборами фоторецепторов, активирующих характерные для них сигнальные пути.

В ряде публикаций приводятся результаты исследований, свидетельствующие о влиянии спектрального состава света на содержание и активность компонентов защитной системы растений. В то же время эти данные несколько противоречивы. Samuolienė и соавт. [8] показали, что освещение синими и зелеными светодиодами приводит к интенсификации тушения свободных радикалов и увеличению содержания токоферола, в то время как синие светодиоды вызывают снижение содержания аскорбиновой кислоты в листьях салата (*Lactuca sativa*). Согласно Li и Kubota [9], дополнительное освещение красным, но не синим или зеленым, светом вызывает увеличение уровня фенолов в листьях салата. Кроме того, фоторецепторные сигнальные пути, задействованные в адаптации к условиям освещения, вероятно, взаимосвязаны с сигнальными путями салициловой и жасмоновой кислот и, следовательно, могут оказывать влияние на активность защитной системы (например, вызывать накопление антипатогенных белков), возможно за счет индукции изменения уровня активных форм кислорода [5, 10]. Szechyńska-Hebda и соавт. [7] показали, что в *Arabidopsis thaliana* изменение электрического потенциала плазматической мембраны в ответ на освещение зависит от длины волны, и привели доказательства того, что это связано с адаптацией к условиям освещения и с работой защитной системы. Ранее на растениях огурца нами показана интенсификация работы аскорбат-глутатионового цикла утилизации активных форм кислорода при освещении красными светодиодами [11, 12].

Таким образом, при помощи оптимизации спектрального состава источников света может быть достигнута модификация не только состояния фотосинтетического аппарата, но и активности защитной, в том числе антиоксидантной и антипатогенной, системы растений. Такая оптимизация в первую очередь важна в случае выращивания растений в теплицах, где широко применяется основное или дополнительное искусственное освещение. Использование светодиодов для решения этой задачи является предпочтительным ввиду малой ширины спектральных полос, отсутствия токсичных материалов и высокой энергоэффективности [13]. Стоит отметить, что относительная простота конструирования осветителей позволяет комбинировать светодиоды с разной длиной волны света и дает возможность динамического изменения их спектра.

Значимым компонентом защитной системы растения являются PR-белки, синтезируемые в растительной клетке в ответ на атаку патогеном. Они синтезируются при поражении растений грибами, вирусами, бактериями, при проникновении нематод и насекомых. PR-белки играют значительную и разнообразную роль при патогенезе, являясь участниками сигнальных систем, катализируя образование вторичных мессенджеров и вызывая повреждения мембран патогенов. Белок PR-2 представляет собой β -1,3-глюканазу, которая играет важную роль в защите от грибковых патогенов, так как способна разлагать один из основных компонентов их клеточной стенки – β -1,3-глюкан.

Цель данного исследования – изучение влияния красного и синего светодиодного освещения на морфометрические показатели, состояние фотосинтетического аппарата, антиоксидантную активность и уровень экспрессии гена, кодирующего белок PR-2.

Объекты и методы исследования. В опытах использовали растения огурца (*Cucumis sativus* L.) тепличного сорта Кураж, районированного в Республике Беларусь, выращенные в лабораторных условиях под люминесцентными лампами Philips TL-D 36W/765 при температуре 23 ± 1 °C и относительной влажности воздуха 65 ± 5 % до появления зачатка первого листа, что составляло в среднем 8 сут. Затем часть растений выращивали, используя светильники с красными (630–650 нм, вариант «Красный»), синими (450–465 нм, вариант «Синий») или красными и синими светодиодами одновременно в соотношении 2:1 (вариант «Красный + Синий») до полного развития первого листа (8–10 сут). Контролем служили растения огурцов, которые продолжали выращивать в течение 8–10 сут под белым светом люминесцентных ламп (вариант «Белый»). В светильниках использовали светодиоды XLamp фирмы Cree. Для всех вариантов освещения фотопериод составлял 14 ч, а освещенность – 50 Вт/м². Для анализа использовали первый настоящий лист.

Из морфометрических показателей определяли высоту растений, площадь листовой пластины и сухую массу. Высоту растений измеряли как расстояние от земли до черешка первого листа. Площадь листовых пластин определяли с помощью нанесения контуров листьев на миллиметровую бумагу. Для определения сухой массы навески листьев огурца по 1 г измельчали и помещали в стеклянные бюксы. Образцы в бюксах переносили в вакуумный сушильный шкаф VacuCell 111 Standard (ВМТ, Чехия) и высушивали в течение 2,5 ч при 100 °С и давлении в 0,05 атм, а затем взвешивали.

Анализ активности фотосистемы 2 (ФС2) проводили с помощью метода индукции флуоресценции хлорофилла в интактных листьях огурца, адаптированных в течение 15 мин к темноте. Для этого использовали РАМ-флуориметр Teaching-РАМ (Heinz Walz, Германия), позволяющий возбуждать фоновую флуоресценцию хлорофилла F_0 светом низкой интенсивности, модулированным с частотой 32 Гц ($0,04 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, 650 нм). При включении актиничного света ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, 665 нм) интенсивность флуоресценции достигала максимального уровня F_m , а затем снижалась за счет дезактивации по фотохимическому и диссипационному пути. Применение вспышки насыщающего света ($3500 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, 665 нм) на фоне действия актиничного увеличивало интенсивность флуоресценции с уровня F до уровня F_m' . После вспышки насыщающего света актиничный свет выключали и включали источник дальнего красного света, возбуждающий только ФС1. При этом пул переносчиков электронов быстро и полностью окислялся. Уровень флуоресценции достигал значения F_0' . По полученным значениям F_0 , F_0' , F_m , F_m' и F рассчитывали величину эффективного квантового выхода фотохимических реакций ФС2 ($\Phi_{\text{ФС2}}$) и коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла (qN) по следующим формулам:

$$\Phi_{\text{ФС2}} = (F_m' - F)/F_m',$$

$$qN = 1 - (F_m' - F_0')/(F_m - F_0).$$

Эффективность функционирования электрон-транспортной цепи, или скорость транспорта электронов (ETR), рассчитывали по формуле

$$ETR = \Phi_{\text{ФС2}} \cdot FAR \cdot c \cdot 0,5,$$

где FAR – интенсивность фотосинтетически активной радиации ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$); c – часть абсорбированного света (84 %); 0,5 – часть фотосинтетически активной радиации, приходящейся на ФС2 [14].

Содержание структурных белков фотосистем, таких как белки Lhcb1, Lhcb2 светособирающего комплекса ЛНСII и белок PsaA ядра ФС1, определяли с помощью иммуноблотинга. Для этого навески свежих листьев (по 0,2 г) гомогенизировали в 1 мл буфера для экстракции ДТЕ. Затем проводили денатурирующий гель-электрофорез (SDS-PAGE), используя установку Mighty Small II (Amersham Biosciences, США), 12 %-ный разделяющий гель и 4 %-ный концентрирующий гель. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C (Amersham Biosciences, США) с порами 0,45 мкм, которую затем блокировали TBST-буфером, содержащим 4 %-ное обезжиренное сухое молоко, в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее мембрану инкубировали в течение 1 ч с первичными поликлональными антителами к белкам Lhcb1, Lhcb2 или PsaA (Agriser, Швеция), а затем в течение 1 ч со вторичными антителами, конъюгированными со щелочной фосфатазой (Agriser, Швеция). Визуализацию белков проводили с помощью BCIP и NBT (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с протоколом производителя. Содержание белка рассчитывали по площади и интенсивности визуализированных пятен на нитроцеллюлозной мембране.

Общую антиоксидантную активность в листьях огурца определяли с помощью теста на нейтрализацию стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH) по [15]. Для этого навески листьев по 0,2 г помещали в фарфоровые ступки, добавляли 1 мл 80 %-ного этанола и растирали до гомогената. Далее гомогенат переносили в пробирки Эппендорф, ступки смывали 1 мл 80 %-ного этанола, гомогенат объединяли. Объединенный гомогенат встряхивали в термо-

блоке Thermomixer comfort (Eppendorf, Германия) в течение 20 мин при комнатной температуре и центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 g на центрифуге Heraeus Pico 17 (Thermo Scientific, США). Затем к 175 мкл полученного супернатанта добавляли 1 мл 200 мкМ раствора DPPH (Sigma-Aldrich, Германия) и инкубировали образцы 30 мин при комнатной температуре. Для анализа общей антиоксидантной активности полученные экстракты разбавляли в 80 %-ном этаноле в 3 раза и регистрировали кинетику изменения оптической плотности раствора при 517 нм в течение 10 мин. В качестве контроля выступал супернатант без добавления DPPH. Количество нейтрализованного DPPH на 1 г навески растительного материала рассчитывали по разнице исходной и конечной концентраций DPPH, с учетом разбавления, используя калибровочную кривую, построенную с применением коммерческого DPPH (Sigma-Aldrich, Германия).

Экспрессию гена *PR-2*, кодирующего один из ключевых антипатогенных белков PR-2 (β -1,3-глюканазу), определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), как описано в работе [16], с применением амплификатора MJ Mini Cycler (Bio-Rad, США) и олигонуклеотидных праймеров (прямой 5'GACG CCTC AACG ACTG TAGG3' и обратный 5'CAGC CGCA CATG TATT GGTC3'), рассчитанных нами в программе Vector NTI (Invitrogen Corp.). В качестве гена-нормализатора использовали ген *18S rRNA*, праймеры для которого были взяты из работы [16] (праймеры синтезированы в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси). Продукты ПЦР разделяли при помощи горизонтального гель-электрофореза на установке Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, США) и визуализировали, используя краситель SYBR Green (Fermentas, Литва).

Анализ продуктов электрофореза и иммуноблотинга проводили в программе TotalLab v.2.01. Для измерения оптической плотности использовали спектрофотометр Uvikon 931 фирмы Kontron (Германия). Все данные представлены как средние арифметические и их стандартные отклонения, вычисленные из трех независимых опытов. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы SigmaPlot 11.2.

Результаты и их обсуждение. Использование красных и синих светодиодов при выращивании огурцов показало, что в таких условиях изменяются отдельные морфометрические показатели. Так, под синим светом (вариант «Синий») наблюдалось увеличение высоты растений в 1,6 раза по сравнению с контролем (вариант «Белый»), в то же время под светодиодным осветителем с двумя спектральными полосами (вариант «Красный + Синий») растения по высоте практически не отличались от контроля (см. таблицу). При этом по площади первого листа опытные варианты и контроль достоверно не различались, а сухая масса во всех опытных вариантах была несколько выше контроля (см. таблицу). Выявленное действие синих светодиодов на рост растений огурца может быть опосредовано фототропинами – рецепторами синего света, контролирующими процесс фототропизма. Фототропины также участвуют в осуществлении поворота к солнцу листьев растений [17]. В наших экспериментах наблюдался такой же эффект после действия синего света. Например, в опытных вариантах («Синий», «Красный + Синий») и в контроле («Белый») листья были ориентированы перпендикулярно падающему свету, а в варианте «Красный», т. е. при отсутствии синей спектральной полосы в освещении, наблюдалась частичная дезориентация листовой пластинки.

Морфометрические показатели растений огурца при освещении красными и синими светодиодами

Вариант освещения	Высота растений, см	Площадь листа, см ²	Сухая масса, мг/г сыр. массы
Белый	13,3 ± 1,6	29,8 ± 1,5	85 ± 2
Красный	13,5 ± 1,6	32,5 ± 3,8	92 ± 3
Красный + Синий	13,4 ± 1,6	25,6 ± 3,9	101 ± 2
Синий	21,7 ± 1,8	26,9 ± 2,6	100 ± 4

Показано некоторое снижение функциональной активности ФС2 при выращивании растений огурцов под красными и синими светодиодами как по отдельности, так и при их сочетанном использовании. Это выражалось в снижении квантового выхода фотохимических реакций ФС2 $\Phi_{\text{ФС2}}$ в опытных вариантах: «Красный» – на 7,5 %, «Красный + Синий» на – 7,5, «Синий» – на 10,3 % по сравнению с контролем (рис. 1). На ингибирование активности ФС2 при использовании

узкополосного освещения указывает также снижение эффективности работы электрон-транспортной цепи *ETR* («Красного» – на 7,5 %, «Красного + Синего» – на 7,8, «Синего» – на 10,5 %) и заметное увеличение константы нефотохимического тушения *qN* («Красный» – на 60 %, «Красный + Синий» – на 139, «Синий» – на 120 %) по сравнению с растениями, выращиваемыми под белым светом (рис. 1).

Выявленное снижение активности ФС2 в условиях узкополосного светодиодного освещения может быть связано со стрессовым воздействием, в том числе с высокой долей фотосинтетически активного света в спектре использованных светодиодов (ввиду больших значений константы нефотохимического тушения). Однако, принимая во внимание лишь небольшое снижение активности ФС2 и показанное нами ранее отсутствие нарушения целостности клеточных мембран в таких условиях [18], речь идет об умеренном стрессе, предполагающем протекание адапционных процессов в растительном организме. Причиной снижения функциональной активности ФС2 и ослабления транспорта электронов может быть перераспределение в белковом составе ФС при продолжительном действии новых условий освещения. Ранее нами показано снижение содержания белков светособирающих комплексов ФС1 (Lhca1-4) при освещении синими или красными светодиодами [19]. В данной работе изучено содержание белков мигрирующего светособирающего комплекса ЛНСII (Lhcb1 и Lhcb2) и белка PsaA ядра ФС1. Анализ показал, что при освещении синими и красными светодиодами (как по отдельности, так и совместно) происходит незначительное уменьшение содержания комплекса ЛНСII: «Красного» – на 0,5 %, «Красного + Синего» – на 34, «Синего» – на 36 % в среднем по сравнению с контролем (рис. 2, *a*). В то же время синий свет приводил к заметному увеличению (в 2 раза) содержания белка PsaA ядра ФС1 относительно контроля (рис. 2, *b*).

Представленные данные находятся в соответствии с результатами, изложенными выше, и показывают, что при освещении красными и синими светодиодами (совместно либо по отдельности) в растениях огурца происходит уменьшение количества светособирающих комплексов. Это объясняет небольшое снижение активности ФС2 в таких условиях и указывает на регуляцию экспрессии генов белков фотосистем в ходе адаптации фотосинтетического аппарата растения к продолжительному действию специфических условий освещения [2].

Для анализа влияния узкополосного освещения на компоненты защитной системы нами изучена общая антиоксидантная (антирадикальная) активность экстрактов листьев огурца по нейтрализации радикала DPPH и уровень экспрессии гена, кодирующего один из важнейших антипатогенных белков – белок PR-2.

Тест с использованием радикала DPPH показал наибольшую антиоксидантную активность в растениях под красным светом и несколько сниженную (на 9 %) способность нейтрализовывать свободные радикалы в растениях под синими светодиодами по сравнению с белым светом (рис. 3, *a*). Количество нейтрализованного DPPH в варианте «Красный + Синий» было близко

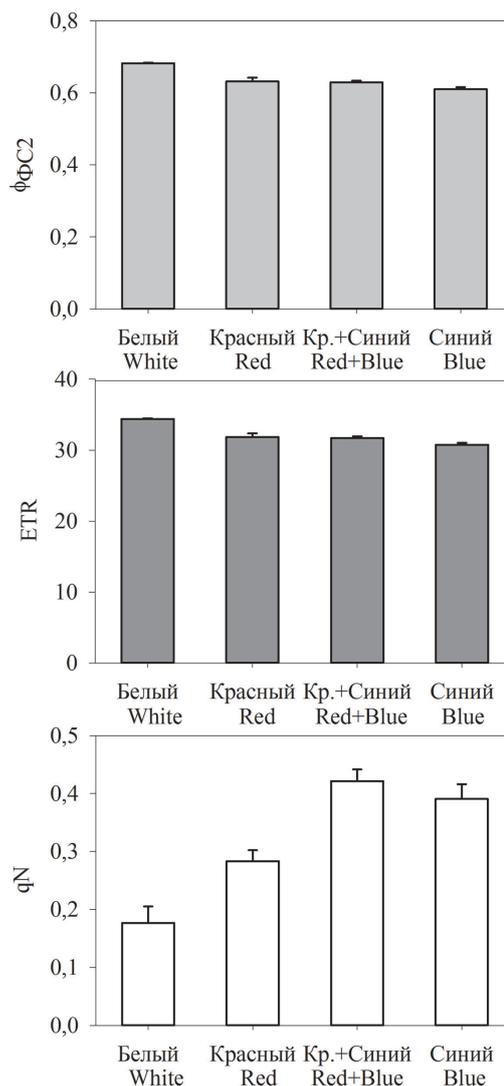


Рис. 1. Показатели активности ФС2 в листьях огурца при освещении красными и синими светодиодами

Fig. 1. Parameters of PS2 performance in leaves of cucumber illuminated with red and blue LEDs

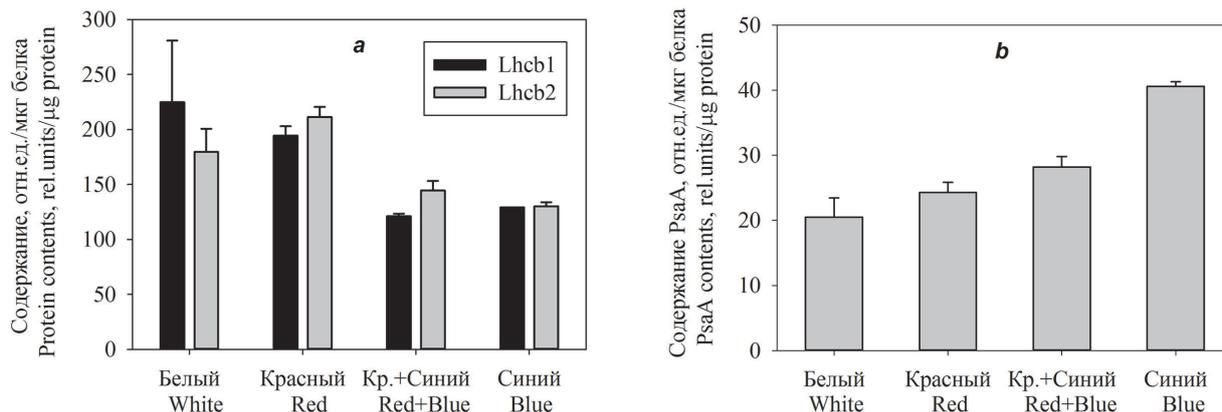


Рис. 2. Содержание белков комплекса ЛНСII (a) и белка PsIA (b) ядра ФСI в листьях огурца при использовании осветителей с красными и синими светодиодами

Fig. 2. Contents of LHCII complex proteins (a) and PSI core protein PsIA (b) in leaves of cucumber illuminated with red and blue LEDs

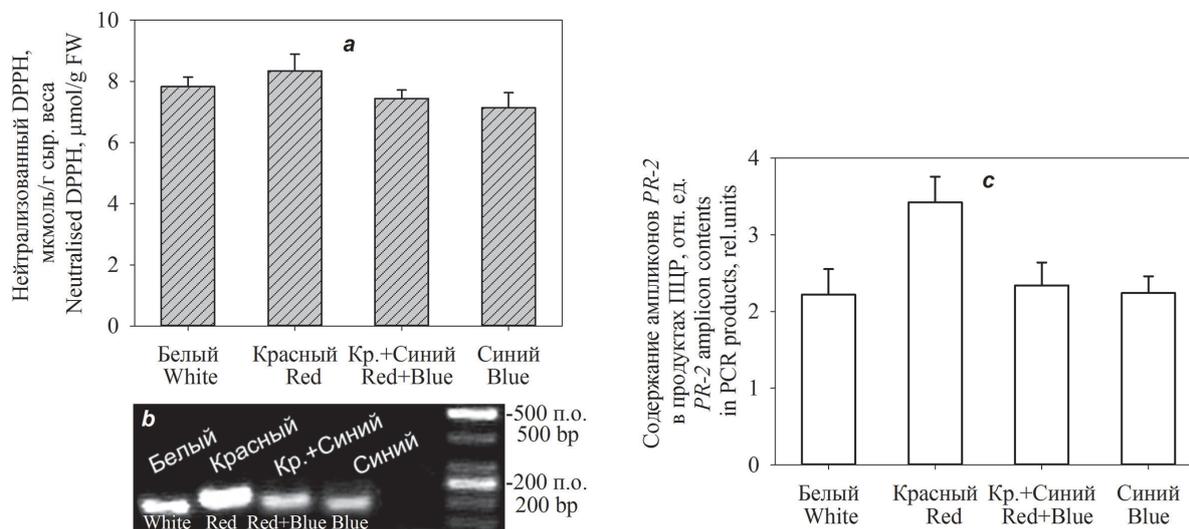


Рис. 3. Общая антиоксидантная активность (a) и экспрессия гена PR-2 (b, c) в листьях огурца при освещении красными и синими светодиодами

Fig. 3. Total antioxidant activity (a) and PR-2 gene expression (b, c) in leaves of cucumber illuminated with red and blue LEDs

к контролю (варианту «Белый»). Полученные нами данные, соответствующие изложенным в предыдущих публикациях результатам [12, 13], позволяют сделать вывод о том, что красный узкополосный свет стимулирует антиоксидантную систему растения огурца, в то время как синий свет ее несколько ослабляет.

Анализ экспрессии генов, кодирующих антипатогенный белок PR-2, показал наличие ампликонов гена PR-2 во всех изученных вариантах, в том числе в контрольном (рис. 3, b). Наибольшее их число (154 % от контроля) обнаружено в образцах растений, выросших под красными светодиодами (рис. 3, c). В остальных вариантах уровень экспрессии гена PR-2 близок к контролю. Таким образом, полученные результаты показывают, что красный узкополосный свет индуцирует экспрессию PR-2, а другие варианты освещения не влияют на этот процесс.

Заключение. Показано, что узкополосное освещение растений огурца с применением красных и синих светодиодов (совместно либо по отдельности) вызывает незначительное снижение активности ФС2, связанное со стрессовым влиянием большой доли эффективно поглощаемого фотосинтетическими пигментами света. При этом происходит адаптация фотосинтетического аппарата,

сопровождающаяся изменением белкового состава фотосистем и усилением нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла. В то же время такое освещение в целом не оказывает существенного влияния на морфометрические показатели растения (площадь листа и сухая масса), за исключением интенсификации роста при использовании только синих светодиодов. Под красным узкополосным светом, в отличие от других вариантов освещения, активизируется антиоксидантная и антипатогенная защита. Данные результаты следует учитывать при разработке светодиодных осветителей для сельскохозяйственных растений.

Благодарности

Работа выполнена в рамках темы 1.03 и задания 1.26 Государственной программы научных исследований «Фундаментальные основы биотехнологий» (2010–2013 гг.) и поддержана грантами Президиума НАН Беларуси для аспирантов (2013–2014 гг.).

Acknowledgments

This work was supported by the State Research Program of the Republic of Belarus “Fundamentals of biotechnology”, grants 1.03 and 1.26, and also by two grants of Presidium of NAS of Belarus for postgraduate students.

Список использованных источников

1. Photosynthetic Performance and Pigment Composition of Leaves from two Tropical Species is Determined by Light Quality / J. C. Ramalho [et al.] // *Plant Biol.* – 2002. – N 4. – P. 112–120.
2. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. capitata) / K.-H. Lin [et al.] // *Sci. Hort.* – 2013. – Vol. 150. – P. 86–91.
3. Galvão, V. C. Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps / V. C. Galvão, C. Fankhauser // *Curr. Opin. in Neurobiol.* – 2015. – Vol. 34. – P. 46–53.
4. Dietzel, L. Photosynthetic acclimation: state transitions and adjustment of photosystem stoichiometry – functional relationships between short-term and long-term light quality acclimation in plants / L. Dietzel, K. Bräutigam, T. Pfannschmidt // *FEBS J.* – 2008. – Vol. 275, N 6. – P. 1080–1088.
5. Light acclimation, retrograde signalling, cell death and immune defences in plants / S. Karpiński [et al.] // *Plant, Cell and Environment.* – 2013. – Vol. 36. – P. 736–744.
6. Baxter, A. ROS as key players in plant stress signaling / A. Baxter, R. Mittler, N. Suzuki // *J. of Experim. Botany.* – 2014. – Vol. 65, N 5. – P. 1229–1240.
7. Evidence for light wavelength-specific photoelectrophysiological signaling and memory of excess light episodes in arabidopsis / M. Szechyńska-Hebda [et al.] // *The Plant Cell.* – 2010. – Vol. 22. – P. 2201–2218.
8. The Effect of Supplementary LED Lighting on the Antioxidant and Nutritional Properties of Lettuce / G. Samuolienė [et al.] // *Acta Hort.* – 2012. – Vol. 952. – P. 835–842.
9. Li, Q. Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce / Q. Li, C. Kubota // *Environmental and Experim. Botany.* – 2009. – Vol. 67. – P. 59–64.
10. Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses / S. Kangasjärvi [et al.] // *J. of Experim. Botany.* – 2012. – Vol. 63, N 4. – P. 1619–1636.
11. Активность аскорбат-глутатионового цикла в растениях огурца (*Cucumis sativus*) в условиях светодиодного освещения / Е. В. Вязов [и др.] // *Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2014. – № 1. – С. 78–83.
12. Вязов, Е. В. Влияние спектрального состава светодиодного излучения на активность антиоксидантных ферментов и накопление защитных белков в растениях огурца (*Cucumis sativus* L.) / Е. В. Вязов, Н. В. Шалыго // *Докл. Нац. акад. наук Беларусі.* – 2015. – Т. 59, № 2. – С. 87–92.
13. Prospects for LED lighting / S. Pimputkar [et al.] // *Nat. Photonics.* – 2009. – Vol. 3. – P. 180–182.
14. Корнеев, Д. Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции / Д. Ю. Корнеев. – Киев: Альтерпрес, 2002. – 188 с.
15. Ragaee, S. Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use / S. Ragaee, E. M. Abdel-Aal, N. Maher // *Food Chemistry.* – 2006. – Vol. 95. – P. 32–38.
16. Технология ДНК-типирования генов устойчивости ячменя к засухе: метод. указания / И. Н. Доманская [и др.]. – Минск: Право и экономика, 2011. – 31 с.
17. Briggs, W. R. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors / W. R. Briggs, J. M. Christie // *Trends in Plant Sci.* – 2002. – Vol. 7, N 5. – P. 204–210.
18. Вязов, Е. В. Содержание активных форм кислорода, продуктов перекисного окисления липидов и проницаемость клеточных мембран в растениях огурца (*Cucumis sativus*) в условиях узкополосного освещения / Е. В. Вязов, Н. В. Шалыго // *Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2013. – № 2. – С. 71–74.
19. Spectral changes of cucumber leaf during adaptation of the photosynthetic apparatus to LED lighting / Y. V. Viazau [et al.] // *J. of Appl. Spectroscopy.* – 2015. – Vol. 81, N 6. – P. 1019–1024.

References

1. Ramalho, J. C., Marques, N. C., Semedo, J. N., Matos, M. C. and Quartin, V. L. (2002) «Photosynthetic Performance and Pigment Composition of Leaves from two Tropical Species is Determined by Light Quality», *Plant Biology*, no. 4, pp. 112-120.
2. Lin, Kuan-Hung, Huang, Meng-Yuan, Huang, Wen-Dar, Hsu, Ming-Huang, Yang, Zhi-Wei and Yang, Chi-Ming (2013) «The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. capitata)». *Scientia Horticulturae*, vol. 150, pp. 86-91.

3. Galvão, V. C. and Fankhauser, C. (2015) «Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps», *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 34, pp. 46-53.
4. Dietzel, L., Bräutigam, K. and Pfannschmidt, T. (2008) «Photosynthetic acclimation: state transitions and adjustment of photosystem stoichiometry – functional relationships between short-term and long-term light quality acclimation in plants», *Federation of European Biochemical Societies*, vol. 275, no. 6, pp. 1080-1088.
5. Karpiński, S., Szechyńska-Hebda, M., Wituszyńska, W. and Burdiak, P. (2013) «Light acclimation, retrograde signaling, cell death and immune defences in plants», *Plant, Cell and Environment*, vol. 36, pp. 736-744.
6. Baxter, A., Mittler, R. and Suzuki, N. (2014) «ROS as key players in plant stress signaling», *Journal of Experimental Botany*, vol. 65, no. 5, pp. 1229-1240.
7. Szechyńska-Hebda, M., Kruk, J., Górecka, M., Karpińska, B. and Karpiński, S. (2010) «Evidence for light wavelength-specific photoelectrophysiological signaling and memory of excess light episodes in Arabidopsis», *The Plant Cell*, vol. 22, pp. 2201-2218.
8. Samuolienė, G., Brazaitytė, A., Sirtautas, R., Novičkovas, A. and Duchovskis, P. (2012) «The Effect of Supplementary LED Lighting on the Antioxidant and Nutritional Properties of Lettuce», *Acta Horticulturae*, vol. 952, pp. 835-842.
9. Li, Q. and Kubota, C. (2009) «Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce», *Environmental and Experimental Botany*, vol. 67, pp. 59-64.
10. Kangasjärvi, S., Neukermans, J., Li, S., Aro, E.-M. and Noctor, G. (2012) «Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses», *Journal of Experimental Botany*, vol. 63, no. 4, pp. 1619-1636.
11. Vyazov, E. V., Kozel, N. V., Domanskii, V. P. and Shalygo, N. V. (2014) «Activity of ascorbate-glutathione cycle in cucumber plants (*Cucumis sativus*) under LED lighting», *Vestsi NAN Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the NAS of Belarus, biological series], no. 1, pp. 78-83.
12. Vyazov, E. V. and Shalygo, N. V. (2015) «Effect of spectral composition of led lighting on the activity of antioxidant enzymes and defence protein contents in the cucumber plants (*Cucumis sativus* L.)», *Doklady NAN Belarusi* [Doklady of the NAS of Belarus], vol. 59, no. 2, pp. 87-92.
13. Pimpitkar, S., Speck, J. S., DenBaars, S. P. and Nakamura, S. (2009) «Prospects for LED lighting», *Nature Photonics*, vol. 3, pp. 180-182.
14. Korneev, D. Yu. (2002) *Informatsionnye vozmozhnosti metoda induktsii fluorestsentsii* [Informational capabilities of the fluorescence induction method], Alterpres, Kyiv, UA.
15. Ragaee, S., Abdel-Aal, E. M. and Maher, N. (2006) «Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use», *Food Chemistry*, vol. 95, pp. 32-38.
16. Domanskaya, I. N., Radyuk, M. S., Budakova, E. A., Samovich, T. V., Spivak, E. A. and Shalygo, N. V. (2011) *Tekhnologiya DNK-tipirovaniya genov ustoychivosti yachmenya k zasukhe: metodicheskie ukazaniya* [The technology of DNA typing of genes for drought tolerance of barley: guidelines], Pravo i ekonomika, Minsk, BY.
17. Briggs, W. R. and Christie, J. M. (2002) «Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors», *Trends in Plant Science*, vol. 7, no. 5, pp. 204-210.
18. Vyazov, E. V. and Shalygo, N. V. (2013) «Reactive oxygen species content, lipid peroxidation and cell membranes permeability in cucumber (*Cucumis sativus*) plants under narrow-band lighting», *Vestsi NAN Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the NAS of Belarus, biological series], no. 2, pp. 71-74.
19. Vyazau, Y. V., Kozel, N. V., Domanski, V. P. and Shalygo, N. V. (2015) «Spectral changes of cucumber leaf during adaptation of the photosynthetic apparatus to LED lighting», *Journal of Applied Spectroscopy*, vol. 81, no. 6, pp. 1019-1024.

Информация об авторах

Вязов Евгений Викторович – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: viazau@yahoo.com

Шальго Николай Владимирович – д-р биол. наук, чл.-кор. НАН Беларуси, доцент, зав. лабораторией биофизики и биохимии растительной клетки. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shalygo@ibp.org.by

Для цитирования

Вязов, Е. В. Активность фотосинтетического аппарата и защитная система растений огурца (*Cucumis sativus* L.) при узкополосном освещении различного спектрального состава / Е. В. Вязов, Н. В. Шальго // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 19–26.

Information about the authors

Viazau Yauhen Viktoravich – Junior Scientific Researcher. Institute of biophysics and cell engineering of the National academy of sciences of Belarus (Akademicheskaya str., 27, 220072, Minsk, Belarus). E-mail: viazau@yahoo.com

Shalygo Nikolai Vladimirovich – Sc. D. (Biology), corresponding member of NAS of Belarus, Associate Professor, Head of the Laboratory of biophysics and biochemistry of plant cell. Institute of biophysics and cell engineering of the National academy of sciences of Belarus (Akademicheskaya str., 27, 220072, Minsk, Belarus). E-mail: shalygo@ibp.org.by

For citation

Viazau Y. V., Shalygo N. V. Photosynthetic apparatus and defense system of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants under LED lighting of different spectral composition. *Proceedings of the National academy of sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 19–26.

Н. А. Копылова, Н. А. Ламан

*Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

НОВЫЙ СПОСОБ ЭКСТРАКЦИИ КАРОТИНОИДОВ ИЗ СОЦВЕТИЙ ЗОЛОТАРНИКА КАНАДСКОГО (*SOLIDAGO CANADENSIS* L.) ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРЕПАРАТОВ С АНТИОКСИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Проанализированы экстрагирующие свойства различных органических растворителей. Показана перспективность использования смеси касторового масла с 96 %-ным этанолом для более полного извлечения каротиноидов из растительного материала и создания недорогих экологически безопасных препаратов с антиоксидантными противовоспалительными свойствами. В качестве растительного сырья предлагается использовать соцветия золотарника канадского, который является широко распространенным инвазивным видом и практически неограниченным сырьевым ресурсом.

Ключевые слова: золотарник канадский (*Solidago canadensis* L.), экстракция, каротиноиды, биологически активные соединения.

N. A. Kopylova, N. A. Laman

*V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus*

NEW METHOD FOR CAROTENOID EXTRACTION FROM *SOLIDAGO CANADENSIS* BLOSSOMS AS A BASIS FOR THE CREATION OF DRUGS WITH ANTIOXIDANT PROPERTIES

The extracting properties of various organic solvents is studied. The significance of using a mixture of castor oil with 96% ethanol for a more complete extraction of carotenoids from plant material and to create inexpensive environmentally safe anti-inflammatory drug with antioxidant properties is established. It is suggested to use Canadian goldenrod blossoms as unlimited raw resource, to reduce the spread of this extended invasive species.

Keywords: *Solidago canadensis* L., extraction, carotenoids, biologically active substances.

Введение. Антиоксидантные свойства каротиноидов стимулировали интерес к их изучению в связи с риском развития рака простаты, легких, желудочно-кишечного тракта и других органов и тканей. Препаратам, содержащим антиоксиданты, сегодня придается большое значение также в профилактике заболеваний глаз, сердца, сосудов, в укреплении иммунной системы. В связи с этим приобретает актуальность выбор растительного материала, богатого каротиноидами, и способ извлечения каротиноидов с максимально возможным выходом.

В последние годы все более усиливается тенденция к ограничению использования растворителей в пищевой промышленности. Многие органические растворители, которые применяли в промышленности для экстрагирования липофильных веществ, подвергнуты запрету или ограничению в использовании. Например, хлористый метилен довольно широко применялся в фармацевтической промышленности для экстракции каротиноидов плодов шиповника [1]. Однако, как показывает накопленный опыт, даже жесткие условия очистки не позволяют полностью удалить неполярные органические растворители из экстракта и шрота [2].

Растительные масла являются экологически безопасными экстрагентами, но степень экстракции каротиноидов невысока из-за длительности и низкой эффективности процесса массообмена в масляном экстракте. Кроме того, желательна добавление более полярного компонента для извлечения кислородсодержащих каротиноидов – ксантофиллов.

Среди растительных масел можно выделить касторовое, обладающее рядом свойств, которые могут сделать более эффективным процесс экстракции не только каротинов, но и ксантофиллов.

Оно смешивается со спиртом в соотношении 1:1 и менее стойко при хранении, не окисляется, не высыхает, относится к недорогим продуктам [3, 4]. Повысить выход каротиноидов, как мы предполагаем, можно путем добавления этанола (Эт) к касторовому маслу (КМ). Это позволило бы создавать смеси с более полярными свойствами, т. е. изменять полярность экстрагента, варьируя соотношение масло:спирт.

Известно, что золотарник канадский используется в народной медицине как антисептическое, ранозаживляющее средство. Предварительные исследования показали, что соцветия золотарника канадского отличаются высоким содержанием каротиноидов. В связи с этим целью работы явилось создание основы для разработки антиоксидантного препарата с противовоспалительным действием путем экстракции каротиноидов с помощью смеси КМ и Эт.

Материалы и методы исследования. В качестве объектов исследования использовали замороженные соцветия золотарника канадского. Для сравнения экстрагирующей способности смеси КМ:Эт брали сухие гипантии шиповника морщинистого, сухие плоды рябины обыкновенной, рябины круглолистной, боярышника мягковатого.

Опыт работы с соцветиями золотарника как с сырьем для экстракции биологически активных соединений показал, что их лучше хранить в замороженном виде, так как при высушивании цветки быстро превращаются в пух, не содержащий каротиноидов. В связи с этим эксперименты проводили с замороженным материалом. Чтобы удалить воду, появляющуюся после оттаивания, материал растирали с безводным сульфатом натрия. Для экстракции каротиноидов использовали гексан, этилацетат, 96 %-ный Эт, смеси КМ:96 %-ный Эт в соотношении 1:5 и 1:10.

Концентрацию каротиноидов в экстрактах определяли спектрофотометрически (спектрофотометр Jasco V-630, Тайвань) по β -каротину согласно стандартной методике [5]. Экстракты цветков золотарника хроматографировали на жидкостном хроматографе «Цвет 4000» (Россия).

Результаты и их обсуждение. *Экстракция органическими растворителями.* На рис. 1 приведены хроматограммы экстрактов цветков золотарника канадского. Показано, что практически все экстрагируемые каротиноиды выходят в составе одного пика.

Из литературы известно, что большая часть каротиноидов желтых цветков и листьев относится к классу ксантофиллов, причем чаще всего они находятся в виде эфиров. В связи с этим нами

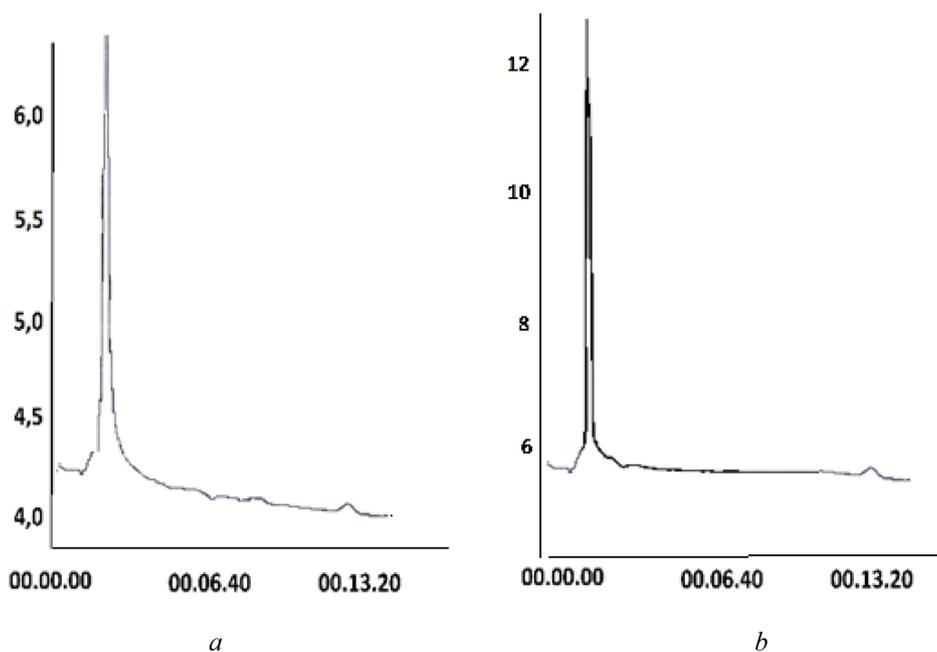


Рис. 1. Хроматограммы экстрактов цветков золотарника канадского (*a* – этилацетат, *b* – 96 %-ный этанол).

Ось абсцисс – время удерживания, мин; ось ординат – сигнал СФ-детектора, мВ

Fig. 1. The chromatograms of *Solidago canadensis* flower extracts (*a* – ethyl acetate, *b* – 96 % ethanol).

X-axis – retention time, min; Y-axis – signal of spectrophotometric detector, mV

изучено влияние процедуры омыления на изменение концентрации каротиноидов в экстрактах цветков золотарника канадского.

Влияние омыления на содержание каротиноидов в экстракте цветков золотарника канадского. Навеску цветков золотарника канадского растирали с безводным сульфатом натрия до получения однородной массы, в качестве экстрагентов использовали этилацетат и смесь ацетон:Эт в соотношении 3:1. Омыление проводили в темноте при комнатной температуре, так как нагревание в щелочной среде приводит к разрушению каротиноидов. В колбу с экстрактом добавляли 1 г гидроксида калия и проводили омыление в течение 20 мин при встряхивании, после чего определяли концентрацию каротиноидов спектрофотометрическим методом. Данные представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Влияние процедуры омыления на содержание каротиноидов в экстрактах цветков золотарника канадского

Экстрагент	Содержание каротиноидов, мг/100 г		% к контролю
	до омыления	после омыления	
Этилацетат	42,4	40,3	95,05
Гексан:этанол (1:1)	47,2	44,72	94,75

Омыление приводило к частичному разрушению каротиноидов, однако без нагревания и света потери были невелики и составили примерно 5%. Можно было бы ожидать некоторого увеличения концентрации свободных ксантофиллов из-за разрыва сложноэфирных связей, но, по-видимому, этого не произошло. Спектры поглощения стандарта лютеина и экстракта цветков без омыления сходны (рис. 2).

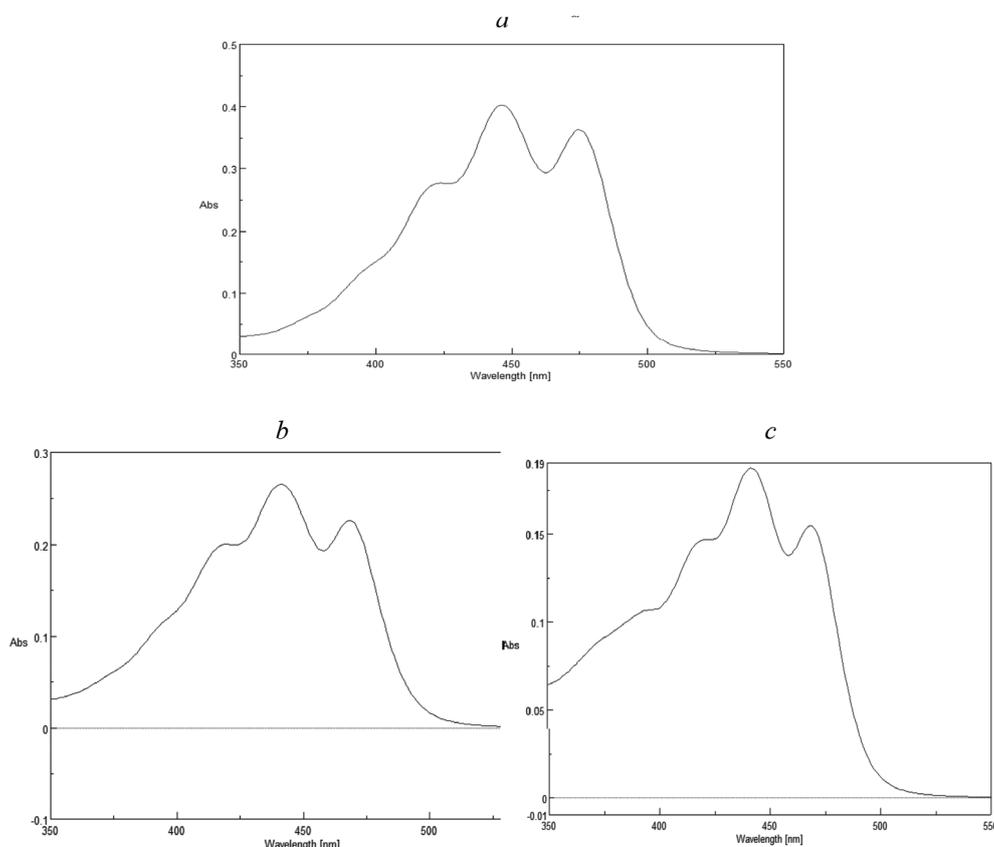


Рис. 2. Спектры поглощения стандарта лютеина (a), экстракта цветков золотарника без омыления (b) и после омыления (c)

Fig. 2. Absorption spectra of lutein standard (a), goldenrod flower extract without saponification (b) and after saponification (c)

Поскольку концентрация каротиноидов под влиянием омыления изменилась незначительно, предположили, что данная процедура не является необходимой и в дальнейшем ее не проводили. Это позволило сократить время приготовления экстрактов и сохранить каротиноиды в нативном состоянии.

Экстрагирующая способность различных органических растворителей. Подбор органических растворителей осуществляли, исходя из опыта экспериментальной работы с экстрактами каротиноидов растительных тканей, проведенной нами ранее [6, 7]. Для сравнения экстрагирующей способности использовали растворители различной полярности: гексан, этилацетат, 96 %-ный Эт, смеси КМ:96 %-ный Эт в соотношении 1:5, КМ:96 %-ный Эт в соотношении 1:10. Основными каротиноидами цветков золотарника канадского являются ксантофиллы, поэтому для их извлечения необходим растворитель более полярный, чем гексан, но с меньшей полярностью, чем 96 %-ный Эт. Нам представлялось важным сравнить экстрагирующую способность разных по химической природе соединений, чтобы определить тот интервал полярности, которой должен обладать эффективный растворитель для данного материала.

Вместе с тем экстрагент не должен быть токсичным. С этой целью использовали смеси КМ с Эт, что позволяло: 1) создать смесь с более полярными свойствами; 2) изменять полярность экстрагента, варьируя соотношение масло:спирт.

Процедура экстракции была одинаковой для всех вариантов (навеска материала 0,5 г, объем экстрагента 5 мл, время экстракции 30 мин, комнатная температура), при этом не ставилась цель достичь полного извлечения каротиноидов. Полученные данные представлены на рис. 3.

Показано, что максимальное количество каротиноидов извлекается смесью КМ:Эт в соотношении 1:10, что составляет 229,6 % по сравнению с применением 96 %-ного Эт. Экстрагирующая способность смеси с более высоким содержанием КМ (1:5) оказалась ниже – 124,2 % к контролю.

Спектры поглощения экстрактов цветков золотарника в некоторых исследуемых растворителях представлены на рис. 4.

Высокая экстрагирующая способность смеси КМ:Эт в соотношении 1:10 проявилась также при использовании других экспериментальных объектов – сухих гипантиев шиповника, плодов рябины обыкновенной, рябины круглолистной, боярышника мягковатого. Данные представлены в табл. 2.

Таким образом, использование смеси КМ:96 %-ный Эт в соотношении 1:10 позволяет наиболее полно извлекать каротиноиды из растительного материала.

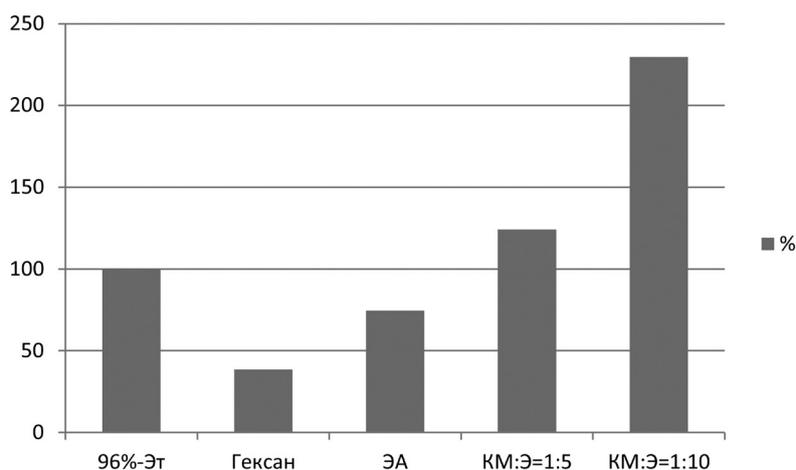


Рис. 3. Экстрагирующая способность различных органических соединений. Концентрация каротиноидов, извлекаемая 96 %-ным этанолом, принята за 100 %. КМ – касторовое масло, ЭА – этилацетат, 96 %-Эт и Э – 96 %-ный этанол

Fig. 3. The extracted ability of various organic compounds. The concentration of carotenoids extracted with 96 %-ethanol, is taken as 100 %. Legend: КМ – castor oil, ЭА – ethyl acetate, 96 %-Эт and Э – 96 %-ethanol

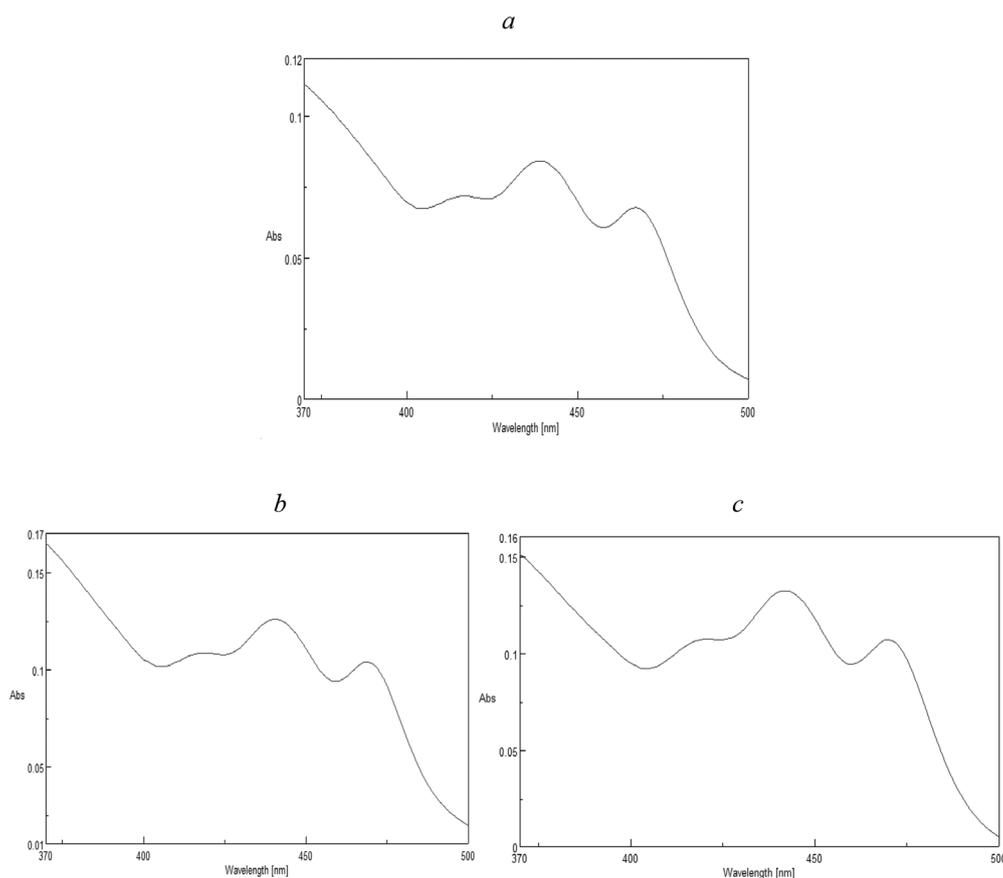


Рис. 4. Спектры поглощения экстрактов цветков золотарника в 96 %-ном этаноле (a) и в смесях КМ:96 %-ный этанол в соотношении 1:5 (b) и 1:10 (c)

Fig. 4. Absorption spectra: extract of goldenrod flowers with 96 %-ethanol (a), extracts of goldenrod flowers with mixtures of castor oil:96 %-ethanol = 1: 5 (b), and castor oil:96 %-ethanol = 1:10 (c)

Т а б л и ц а 2. Сравнение экстрагирующих способностей гексана и смеси КМ:Эт

Объект	Содержание каротиноидов, мг/г воздушно-сухой массы		% к контролю
	Гексан (контроль)	КМ:Эт в соотношении 1:10	
Шиповник морщинистый	16,4	27,8	170,12
Рябина обыкновенная	10,43	15,0	143,82
Рябина круглолистная	1,0	1,9	190,0
Боярышник мягковатый	6,07	8,12	133,77

КМ является недорогим, экологически безопасным продуктом, издавна используется как народное средство для ухода за кожей лица и волосами, не образует пленку и хорошо впитывается кожей. Оно может послужить основой для создания косметических средств, мазей с антиоксидантными свойствами, которые, возможно, найдут применение в медицинской практике для ускорения заживления ран, профилактики пролежней.

Заключение. В результате экспериментальных исследований проанализированы экстрагирующие свойства различных органических растворителей. Показана перспективность использования смеси касторового масла с 96 %-ным этанолом для более полного извлечения каротиноидов из растительного материала и создания недорогих экологически безопасных препаратов с антиоксидантными противовоспалительными свойствами. В качестве растительного сырья предлагается использовать соцветия золотарника канадского, который является широко распространенным инвазивным видом и практически неограниченным сырьевым ресурсом.

Список использованных источников

1. Пономарев, В. О. Экстрагирование лекарственного сырья / В. О. Пономарев. – М.: Медицина, 1976. – 367 с.
2. Чуешов, В. И. Промышленная технология лекарств / В. И. Чуешов, М. Ю. Чернов, Л. М. Хохлова. – Харьков: МТК-Книга, изд-во НФАУ, 2002. – Т. 2. – 716 с.
3. Тютюнников, Б. Н. Химия жиров / Б. Н. Тютюнников. – М., 1974. – 356 с.
4. Щербаков, В. Г. Биохимия и товароведение масличного сырья / В. Г. Щербаков. – М., 1979. – 277 с.
5. Гавриленко, В. Ф. Большой практикум по физиологии растений / В. Ф. Гавриленко, М. Е. Ладыгина, Л. М. Хандобина. – М., 1975. – С. 130–132.
6. Копылова, Н. А. Исследование условий экстракции водорастворимых и липофильных БАВ из гипантиев шиповника / Н. А. Копылова, Н. А. Ламан // Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2013. – № 1. – С. 24–29.
7. Копылова, Н. А. Экспериментальное обоснование условий получения устойчивой эмульсии из гидрофильного и липофильного экстрактов плодов шиповника (*Rosa rugosa* Thunb.) / Н. А. Копылова, Н. А. Ламан // Ботаника (исследования). – 2013. – Вып. 42. – С. 349–358.

References

1. Ponomarev, V. O. (1976) *Ekstragirovanie rastitel'nogo syr'ya* [The extraction of plant raw materials], Meditsina, Moscow, RU.
2. Chueshov, V. I., Chernov, M. Yu. and Khokhlova, L. M. (2002) *Promyshlennaya tekhnologiya lekarstv* [The industrial technology of drugs], МТК-Книга, Kharkov, PL, vol. 2.
3. Tyutyunnikov, B. N. (1974) *Khimiya zhirov* [Fat chemistry], Moscow, RU.
4. Shcherbakov, V. G. (1979) *Biokhimiya i tovarovedenie maslichnogo syr'ya* [Biochemistry and merchandising oilseeds], Moscow, RU.
5. Gavrilenko, V. F., Ladygina, M. E. and Khandobina, L. M. (1975) *Bol'shoi praktikum po fiziologii rastenii* [A large workshop on plant physiology], Vysshaya shkola, Moscow, RU.
6. Kopylova, N. A. and Laman, N. A. (2013) «The investigation of the extractive conditions of hydrophilic and lipophilic biological active substances from the rose hips», *Vesti Natsyonal'nai Akademii navuk Belarusi. Ser. biyal. navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], no. 1, pp. 24-29.
7. Kopylova, N. A. and Laman, N. A. (2013) «Experimental foundation of preparational conditions of stable emulsion from hydrophilic and lipophilic extracts of rose hips», *Botanika (issledovaniya)* [Botany (investigations)], vol. 42, pp. 349-358.

Информация об авторах

Копылова Наталья Александровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: natal.kopylova.68@mail.ru

Ламан Николай Афанасьевич – академик, д-р биол. наук, профессор, зав. лаб. роста и развития растений. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: nikolai.laman@gmail.com

Для цитирования

Копылова, Н. А. Новый способ экстракции каротиноидов из соцветий золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) как основа создания препаратов с антиоксидантными свойствами / Н. А. Копылова, Н. А. Ламан // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 27–32.

Information about the authors

Kopylova Natalia Aleksandrovna – Ph. D. (Biol.), Senior Scientific Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya str., 27, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: natal.kopylova.68@mail.ru

Laman Nikolai Afanas'evich – academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of Laboratory of growth and development of plants. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya str., 27, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nikolai.laman@gmail.com

For citation

Kopylova N. A., Laman N. A. New method for carotenoid extraction from *Solidago canadensis* blossoms as a basis for the creation of drugs with antioxidant properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 27–32.

Е. Н. Олешук, А. Н. Гриц, Е. Г. Попов, Т. Г. Янчевская

*Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ ИНТРОДУЦИРУЕМЫХ СОРТОВ ВИНОГРАДА (*VITIS*) ПО АКТИВНОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Экспериментально проверена возможность использования окислительно-восстановительных (Red/Ox) ферментов как биохимических маркеров для экспресс-оценки стрессоустойчивости сортов винограда к неблагоприятным абиотическим факторам и выявления перспективных сортов для введения их в промышленную культуру. Показано, что активность Red/Ox-ферментов обусловлена сортовой специфичностью винограда и в значительной мере зависит от интенсивности и продолжительности воздействия стрессобразующих факторов. Установлено, что биохимические показатели Red/Ox-системы растений (активность изоферментов пероксидазы и супероксиддисмутазы) представляют собой информативные характеристики для экспресс-оценки стрессоустойчивости и биологической пластичности растений винограда.

Наибольшая устойчивость к факторам абиотического стресса (водный дефицит, пониженные температуры и недостаточная освещенность), выявленная у сортов винограда североамериканской селекции (*Маркетт* и *Маршал Фош*) четко коррелировала с изменениями активности Red/Ox-ферментов. При этом обнаружено, что устойчивые к стрессовым воздействиям сорта винограда по сравнению с восприимчивыми отличаются более высокой активностью изоферментов пероксидазы и супероксиддисмутазы и более совершенным механизмом реализации их действия. Соответственно, сорта винограда европейской селекции (*Пино Нуар, Красень*), полученные исключительно на основе генетического материала *V. vinifera*, проявили более низкую адаптивность к стрессобразующим факторам, чем более выносливые и пластичные сорта американской группы, что подтверждено результатами биохимических, биометрических и морфофизиологических исследований.

Ключевые слова: сорта винограда, стрессоустойчивость, адаптация, биологическая пластичность, Red/Ox-ферменты, пероксидаза, супероксиддисмутаза.

E. N. Oleshuk, A. N. Griz, E. H. Popoff, T. G. Yanchevskaya

*V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus*

EXPRESS-ASSESSMENT OF INTRODUCED *VITIS* SPECIES' STRESS RESISTANCE USING RED/OX-MARKERS

There were obtained the experimental data with the possibility of using Red/Ox-enzymes as biochemical markers for rapid assessment of stress-resistant to abiotic factors of grape varieties, and identify promising varieties of grapes for introducing them into industrial culture. Found that the biochemical parameters characterizing Red/Ox-plant system (activity of iso-enzymes of peroxidase and superoxide dismutase) are informative experimental data for rapid assessment of stress resistance and biological plasticity plants grapes. Active Red/Ox-enzymes due to varietal specificity of grapes and largely depends on the intensity and duration of exposure factors stress factors.

The greatest resistance when abiotic stress (water deficit, lower temperatures and insufficient illumination) showed grapes North American breeding, in particular, *Marquette* and *Marshal Foch*, correlating with the change in activity of Red/Ox-enzymes. Found that resistant grape varieties compared with the susceptible, are initially more high Red/Ox-enzymes (isoenzymes of peroxidase and superoxide-dismutase) and a better mechanism for their implementation. According to biochemical, morphological and biometrical studies in European breeding grapes (*Krasen*) obtained from grapes *V. vinifera*, *Marked* lower adaptability to stress factors compared to more labile and plastic strains of the American group.

Keywords: grapes varieties, stress, adaptation, biological plasticity, frost resistance, oxidative stress, Red/Ox-enzymes superoksidismutaza, peroxidase.

Введение. Традиционно считается, что виноград (*Vitis*) – чрезвычайно требовательная к условиям освещенности и теплообеспеченности культура. Вместе с тем известно, что виноград отличается высокой биологической пластичностью, вследствие чего возможно его успешное выращивание в самых разных природно-климатических условиях [1, 2].

Виноградарство Республики Беларусь в настоящее время находится в стадии становления. Селекция винограда в республике до недавнего времени не проводилась, поэтому практически все сорта являются интродуцированными [2, 3]. Внедрение перспективных для агроклиматических условий Беларуси сортов из мировой ампелографической коллекции позволяет в короткие сроки увеличить продуктивность виноградных насаждений. Вместе с тем выбрать лучшие фенотипы (сорта, гибридные формы) для интродукции – задача непростая и ответственная, требующая тщательного анализа биологических особенностей растений, в частности сортовой реакции (сортоспецифичность) на агроэкологические условия культивации. В климатических условиях зоны рискованного виноградарства, к которой принадлежит вся территория республики, следует обращать особое внимание на способность сортов адаптироваться к местным условиям [3–7].

С учетом районирования в Беларуси проводятся многолетние испытания новых сортов и гибридных форм винограда в полевых условиях. Чтобы сократить материальные затраты и время на эти исследования, актуальным является развитие и внедрение экспресс-диагностики стрессоустойчивости образцов и форм *Vitis*, основанной на измерении активности ферментов их окислительно-восстановительной системы (Red/Ox-системы) [8–10]. Известно, что при стрессовых воздействиях разной природы в растениях развивается неспецифическая ответная реакция, сопровождающаяся генерацией активных форм кислорода (АФК), которые вызывают повреждения различных компонентов живых клеток (белков, ДНК, липидов), приводящие к нарушению их функций. В нейтрализации АФК участвуют ферменты Red/Ox-системы, в частности изоэнзимы пероксидазы (ПО, КФ 1.11.1.7) и супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) [10–12]. Сравнительный анализ результатов биохимических, физиологических и морфометрических исследований выявляет корреляции, дающие возможность заранее оценить устойчивость растений винограда к абиотическим стрессовым воздействиям в полевых условиях.

Цель настоящего исследования – разработка метода оценки биологической пластичности и приспособляемости образцов винограда с использованием современных биохимических подходов, которые позволяют в короткие сроки обосновать и спрогнозировать выбор среди его новых стрессоустойчивых и высокоадаптивных сортов, наиболее перспективных для введения в промышленную культуру.

Материалы и методы исследований. Исходным посадочным материалом служили оздоровленные *in vitro* растения *Vitis*, предоставленные НИВиВ «Магарач» (Ялта). Работа проводилась на сортах винограда различной генетической природы и происхождения (*Бианка*, *Красень*, *Маркетт*, *Маршал Фош*, *Пино Нуар* и др.) из различных эколого-географических регионов и селекционных центров мирового виноградарства (Западная Европа, Серная Америка, Юг России).

Эксперименты проводили в биотехнологическом комплексе (БТК-1), который обеспечивает круглогодичный цикл выращивания растений. Нами создавались условия, моделирующие абиотический стресс различной природы. Так, исследованы стрессовые воздействия пониженной и повышенной температуры, пониженной освещенности, недостаточного и избыточного увлажнения. Температурный стресс (холодовой шок) создавали путем помещения вегетирующих растений в холодильную камеру (при +3 °С), без их предварительной закалки, на 1 сут; недостаток освещенности создавали притенением; водный стресс различной природы моделировали: а) прекращением полива в течение 3–5 сут (стресс фиксировали по снижению тургора в листьях); б) избыточным увлажнением путем затопления корневой системы растений водой в течение 3 сут.

Активность изоферментов ПО и СОД в листьях винограда измеряли после проведения электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) SE-250 согласно [12], на основании того, что интенсивность окрашивания нитросиним тетразолиевым прямо пропорционально коррелирует с активностью ферментов [13]. Электрофореграммы сканировали, обрабатывали с помощью компьютерных программ Total/Lab 3.2. Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в листьях растений винограда определяли по содержанию малонового диальдегида (МДА), используя стандартную методику [14].

Результаты и их обсуждение. Для проведения исследований были выбраны типичные сорта из разных эколого-географических селекционных центров виноградарства (табл. 1).

Таблица 1. Краткая биологическая характеристика сортов винограда, являющихся объектами исследований

Наименование сорта и схема гибридизации	Сортогруппа винограда	Сила роста	Зимостойкость	Оценка устойчивости к болезням (милдью), балл	Страна, селекционный центр
Пино Нуар (<i>Pinot Noir</i>) (<i>Траминер</i> × <i>Пино Менье</i>)	Виноград европейский <i>V. vinifera</i>	Слабая	–21 °С	4 (низкая)	Франция
Маршал Фош (<i>Marechal Foch</i>), (<i>Рипариа</i> × <i>Рупестрис 101-14</i>) × <i>Гольдрислинг</i>)	Межвидовой франко-американский гибрид (ФАН)	Средняя	–30 °С	2 (высокая)	США
Бианка (<i>Bianka</i>) (<i>Виллар Блан</i> × <i>Шасла Бувье</i>)	Сложный межвидовой гибрид на основе <i>V. vinifera</i>	Средняя	–26...–27 °С	2 (высокая)	Венгрия
Красень (<i>Krasen</i>), (<i>Антей Магарачский</i> × <i>Сверхранний Бессемянный Магарача</i>)	Сложный межвидовой гибрид на основе <i>V. vinifera</i>	Высокая	–24...–25 °С	2–3 (средняя)	Крым, НИВиВ «Магарач»
Маркетт (<i>Marquette</i>), (<i>MN 1094</i> × <i>Ravat 262</i>)	Сложный межвидовой гибрид (АН)	Очень высокая	–32...–36 °С	1–2 (очень высокая)	США

Пино Нуар относится к эколого-географической группе классических западноевропейских сортов винограда, отличается слабой морозоустойчивостью и низкой устойчивостью к болезням, очень высокими вкусовыми качествами; *Маршал Фош* – представитель группы франко-американских гибридов (French-American Hybrids, ФАН); *Бианка* и *Красень* – сложные межвидовые гибриды современной селекции из разных селекционных центров Европы, в которых преобладают гены европейского винограда *V. vinifera*; *Маркетт* – один из новейших сортов северо-американской селекции (American Hybrids, АН) сложной генетической природы, сочетающий в себе высокую урожайность и стабильность плодоношения с высокой устойчивостью к морозу и основным болезням виноградной лозы. Сорт *Пино Нуар* еще на стадии адаптации *in vivo* показал низкую биологическую пластичность и адаптивность (выпад саженцев более 50 %), потому сорт был отбракован как неперспективный еще на первом этапе опытов.

Экспресс-метод оценки ответа растений винограда на абиотические стрессовые воздействия основан на реакциях растительной клетки, выражающихся в дифференциальной активации

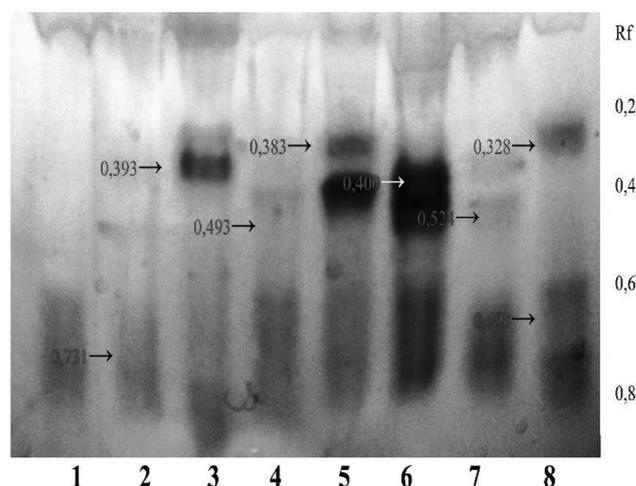


Рис. 1. Изоэнзимный спектр ПО в листьях винограда различных сортов в зависимости от вида стресса.

Треки: 1, 2, 5 – контрольные (*Бианка*, *Маршал Фош*, *Маркетт* соответственно); 3, 7 – водный стресс (*Маршал Фош* и *Бианка*); 4, 8 – затенение (*Бианка* и *Маршал Фош*); 6 – низкотемпературный стресс (*Маркетт*)

Fig. 1. Isoenzymes spectrum of peroxides on the leaves of grapes of different varieties depending on the type of stress. Tracks: 1, 2, 5 – control (*Bianca*, *Marshal Foch*, *Marquette*, respectively); 3, 7 – water stress (*Marshal Foch* and *Bianca*); 4, 8 – shading (*Bianca* and *Marshal Foch*); 6 – low-temperature stress (*Marquette*)

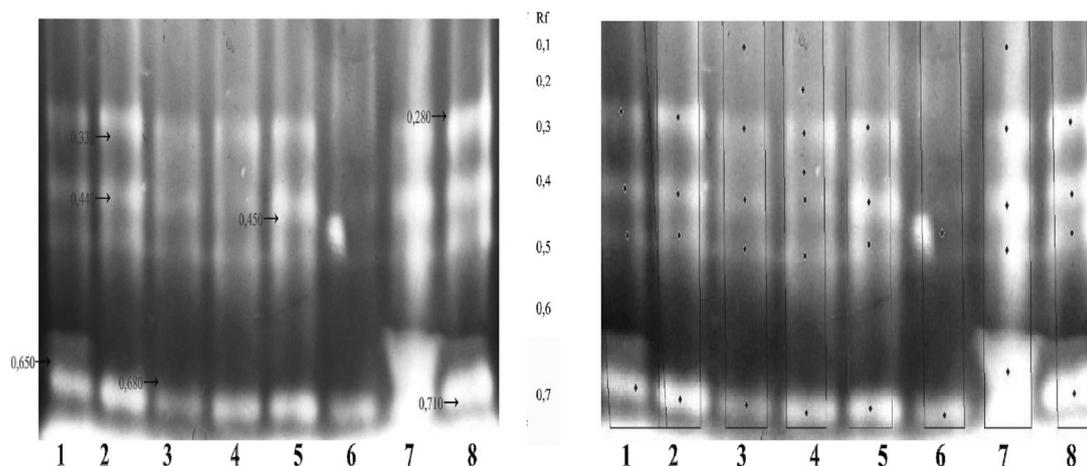


Рис. 2. Активность экспрессии изоэнзимов СОД в листьях винограда различных сортов в зависимости от вида стресса. Треки: 1, 5 – контроль (*Бianка* и *Маркетт*); 2, 6 – низкотемпературный стресс (*Бianка* и *Красень*); 3, 7 – водный стресс (*Маршал Фош* и *Маркетт*); 4, 8 – затенение (*Бianка* и *Маркетт*). Точками на полосах (справа) выделены зоны с выраженными изменениями

Fig. 2. Expression of SOD isoenzymes of in leaves of grapes cultivars depending on the type of stress. Tracks: 1, 5 – controls (*Bianca* and *Marquette*); 2, 6 – low-temperature stress (*Bianca* and *Krasen*); 3, 7 – water stress (*Marshal Foch* and *Marquette*); 4, 8 – shading (*Bianca* and *Marquette*). Points on the bands (right side) on allocated to areas with pronounced changes

изоферментов Red/Ох-системы (ПО и СОД), отличающихся своей интенсивностью и спектром молекулярных форм. Стрессовые воздействия различной интенсивности и экспозиции оказывают негативное влияние на физиологические и биохимические параметры развития растения винограда и приводят к нарушению гомеостаза. Полученные результаты приведены на рис. 1, 2 и в табл. 2, 3.

Т а б л и ц а 2. Активность ПО в клетках листьев винограда (компьютерная обработка электрофореграммы рис. 1)

Изоформа	Rf							
	Трек 1	Трек 2	Трек 3	Трек 4	Трек 5	Трек 6	Трек 7	Трек 8
1	0,090	0,021	0,093	0,086	0,079	0,086	0,024	0,034
2	0,214	0,169	0,193	0,400	0,297	0,331	0,100	0,079
3	0,359	0,21	0,393	0,472	0,383	0,400	0,386	0,328
4	0,445	0,431	0,652	0,493	0,59	0,541	0,486	0,593
5	0,559	0,469	0,697	0,593	0,734	0,662	0,524	0,693
6	0,645	0,731	0,717	0,714	0,800	0,783	0,769	0,834
7	0,721	0,859	0,952	0,924	0,848	0,848	0,828	
8	0,090	0,021			0,890	0,869		
9						0,907		

П р и м е ч а н и е. Треки: 1, 2, 5 – контрольные (*Бianка*, *Маршал Фош*, *Маркетт* соответственно); 3, 7 – водный стресс (*Маршал Фош* и *Бianка*); 4, 8 – затенение (*Бianка* и *Маршал Фош*); 6 – низкотемпературный стресс (*Маркетт*).

Представленные данные указывают на нарушение гомеостаза и, соответственно, Red/Ох-статуса растений при культивировании в моделирующих стресс условиях опытов, что прослеживается по изменению активности ПО и СОД, а также по накоплению МДА.

Установлено, что в неблагоприятных условиях спектр энзимов Red/Ох-системы усиливается, однако изменение их активности характеризуется особенностями, зависящими от сорта растения, природы стресса и его интенсивности. Так, например, в состоянии водного и температурного стресса устойчивый сорт американской селекции *Маркетт* проявил наибольшее значение окрашивания ПО (тестируется по интенсивности окраски, см. рис. 1, треки 5, 6). Отметим, что относи-

тельно высокое окрашивание ПО присуще данному сорту изначально (трек 3) и, видимо, закреплено конститутивно.

Ухудшение физиологического состояния растительных клеток в условиях абиотического стресса связано с накоплением МДА и увеличением супероксид-анион радикалов, что приводит к изменению активности ферментов антиоксидантной защиты (ПО и СОД), которые призваны предотвратить нарушение гомеостаза и Red/Ох-статуса растения.

В целом, данные электрофореза в ПААГ (рис. 1) показывают, что устойчивые к стрессу растения (сорта *Маркетт*, *Маршал Фош*) имеют более эффективную систему защиты, лучше обеспечивающую функционирование растительного организма в ухудшающихся условиях.

По результатам компьютерной обработки электрофореграммы (рис. 1, табл. 2) видно, что стресс индуцирует не только интенсивность общего окрашивания, но и образование новых изоформ ПО (*de novo*) с относительной электрофоретической подвижностью белка-фермента $Rf = 0,890$ и $Rf = 0,907$ (треки 5 и 6), что указывает на развитие защитной реакции растений винограда.

Результаты экспериментов показали, что индуцируемые стрессом на биохимическом уровне защитные реакции у североамериканских сортов винограда (в первую очередь у *Маркетт*) выражены сильнее, чем у европейских (*Бианка* и *Красень*). При этом абиотический стресс приводил к увеличению интенсивности окрашивания подвижных изоформ ПО (с меньшими величинами Rf). Различия в спектре изоферментов ПО, вероятно, отражают сортовую специфичность растений винограда в реакции на стрессовые воздействия и их интенсивность.

Важность измерений активности ферментов Red/Ох-системы обусловлена их первостепенной ролью в антиоксидантной защите клеток от постоянно образующихся высокотоксичных кислородных радикалов [10, 11, 13]. В частности, в наших опытах об этом свидетельствуют результаты измерения под действием стрессобразующих абиотических факторов активности другого важнейшего фермента антиоксидантной защиты – СОД. Данные опытов представлены на рис. 2.

Согласно полученным результатам (рис. 2, табл. 3), активация экспрессии СОД происходит при различных видах абиотического стресса (вне зависимости от вида стрессобразующих факторов).

Т а б л и ц а 3. СОД в листьях (компьютерная обработка электрофореграммы рис. 2)

Изоформа	Rf							
	Трек 1	Трек 2	Трек 3	Трек 4	Трек 5	Трек 6	Трек 7	Трек 8
1	0,158	0,141	0,053	0,130	0,046	0,651	0,120	0,113
2	0,204	0,444	0,155	0,394	0,250	0,979	0,215	0,165
3	0,236	0,581	0,317	0,472	0,461		0,317	0,451
4	0,433	0,655	0,465	0,542	0,595		0,465	0,581
5	0,570	0,951	0,592	0,592	0,673		0,602	0,651
6	0,655		0,680	0,694	0,968		0,683	0,940
7	0,930		0,961	0,975			0,901	

П р и м е ч а н и е. Треки: 1, 5 – контроль (*Бианка* и *Маркетт*); 2, 6 – низкотемпературный стресс (*Бианка* и *Красень*); 3, 7 – водный стресс (*Маршал Фош* и *Маркетт*); 4, 8 – затенение (*Бианка* и *Маркетт*).

Вместе с тем у каждого из исследованных сортов интенсивность окрашивания нитросиним тетразолиевым СОД изменяется в разной степени, что указывает на сортоспецифичность стрессоустойчивости. Из полученных данных следует, что характер увеличения интенсивности окрашивания СОД в листьях винограда, в частности у сорта *Маркетт*, имеет определенные отличия от изменения интенсивности окраски ПО. Так, при температурном стрессе (табл. 3, трек 5) количество СОД-изоформ сокращается, в то время как их накопление активируется (в опыте при $Rf = 0,651$ и $Rf = 0,979$ соответственно, в контроле при $Rf = 0,046$ и $Rf = 0,394$). Под действием стрессов водного дефицита (табл. 3, трек 7) и затенения (табл. 3, трек 8) у сорта *Маркетт*, напротив, значительно увеличивается разнообразие экспрессируемых изоформ СОД.

При шоковом оксидативном стрессе, вызванном действием близкой к 0° положительной температуры без предварительного закаливания, у растений винограда отмечены одновременно два процесса – увеличение интенсивности окраски нитросиним тетразолиевым одних видов изоферментов СОД (более подвижных) и снижение окраски других изоформ СОД (выражено у сортов *Маркетт* и *Маршал Фош*) на электрофореграммах (рис. 2).

На первых этапах стрессового воздействия имели место увеличение интенсивности молекул СОД и, возможно, синтез фермента с его предсуществующих матричных РНК (мРНК). Можно предположить, что СОД участвует в детоксикации продуктов ПОЛ и последствиях абиотического стресса еще на раннем его этапе. Если этого недостаточно для обеспечения адаптации растений, включается синтез новых мРНК и молекул СОД. Следовательно, в каждом конкретном случае активность СОД регулируется в зависимости от метаболических потребностей клеток, что в свою очередь определяется интенсивностью стрессового воздействия, его длительностью, чувствительностью растений и т. д.

При адаптации саженцев винограда исследуемых сортов в условиях БТК-1 проводились биометрические наблюдения, которые включали учет основных параметров их роста и развития. Активизация ростовых процессов у саженцев винограда прослеживалась визуально и обычно сопровождалась пробуждением точки роста, началом образования новых листьев и пасынков, удлинением междоузлий. Возобновление роста и развития растений, испытывающих состояние сильного абиотического стресса, имела выраженную сортоспецифичность и напрямую зависела от вида повреждающего стресс-фактора, его интенсивности и продолжительности.

Наибольшую чувствительность саженцы *Vitis* проявили к низкотемпературному шоку (табл. 2, 3). Европейские сорта (*Красень*) при этом претерпели нарушения гомеостаза, в частности у этих растений отмечалось повреждение фотосинтезирующего аппарата, вследствие чего в дальнейшем наблюдалась значительная задержка их роста и развития (более чем на 10–12 сут). Сорта американской группы (АН), например *Маркетт*, хоть и имели признаки незначительного угнетения (снижение тургора в листьях), возобновили развитие уже на 5–7-е сутки. В дальнейшем они продолжили активный рост, в том числе за счет образования пасынковых побегов.

В отличие от теплового, холодовой шок в меньшей степени приводил к нарушению гомеостаза и развития растений винограда. При этом сорта европейской селекции все же имели заметные нарушения физиологического состояния (визуально проявлялось через снижение тургора в листьях) и, согласно биометрическим данным (табл. 4), у их саженцев замедлились процессы роста и развития не менее чем на 5–8 сут.

Т а б л и ц а 4. Динамика развития саженцев винограда *in vivo* в зависимости от сорта

Сорт	Активность ризогенеза	Возобновление развития, сут	К-во междоузлий, шт.	Развитие листьев, шт.	Высота растений на 30-е сутки, см	Устойчивость к патогенам, балл
<i>Пино Нуар</i>	Низкая	15 ± 3	2–3	3–4	16,0 ± 2,0	4
<i>Бианка</i>	Высокая	9 ± 2	4–5	5–6	24,0 ± 2,0	8
<i>Красень</i>	Высокая	7 ± 2	4–5	5–6	23,0 ± 3,0	6
<i>Маршал Фош</i>	Относительно высокая	4 ± 2	4–5	5–6	32,0 ± 3,0	8
<i>Маркетт</i>	Высокая	10 ± 2	5–6	7–8	24,0 ± 2,0	9

В ходе экспериментов сорта *Маркетт* и *Маршал Фош* проявили себя как наиболее резистентные к абиотическому стрессу, что наблюдалось и визуально: листья у саженцев данных сортов сохранялись чистыми и здоровыми на протяжении всех опытов. Отмеченная стрессоустойчивость данных сортов, а в определенной мере и у сорта *Бианка*, коррелировала с повышением содержания у них менее подвижных форм СОД (верхняя и средняя часть треков). В то же время у менее устойчивых сортов (например, у сорта *Красень*) превалировали подвижные формы СОД. Выявленные различия в экспрессии разных по Rf-параметру форм СОД, видимо, отражают сортовую специфичность растений винограда и характеризуют особенности их реакций на стрессовые воздействия.

По данным биометрии (табл. 4) можно проследить, как проходит процесс адаптации саженцев винограда *in vivo* в зависимости от сорта.

Как видно из данных биометрии (табл. 4), у отдельных сортов вида *V. vinifera* (*Пино Нуар*) наблюдалось значительное отставание как на этапе ризогенеза, так и в процессе формирования вегетирующего аппарата в онтогенезе. Значительные различия в возобновлении роста и развития у саженцев винограда были обусловлены их сортом. Наиболее быстрая адаптация отмечена у межвидового гибрида американской селекции *Маркетт*. Относительно динамично адаптация происходила также у сложных межвидовых гибридов *Бианка* и *Маршал Фош*. У сортов европейского происхождения (*Пино Нуар*, *Бианка*, *Красень*), которые получены на основе *V. vinifera*, процессы адаптации в сравнении с американскими сортами замедлены, что согласуется с данными оценки стрессоустойчивости сортов по биохимическим показателям. У них отмечена менее выраженная способность к стресс-адаптации, а при активизации накопления продуктов ПОЛ не выявлено существенных изменений в динамике увеличения содержания и активности ферментов Red/Ох-системы.

Вместе с тем необходимо обратить внимание, что по внешним морфометрическим показателям нельзя однозначно оценить степень адаптивности и потенциальной стрессоустойчивости сортов к конкретным абиотическим факторам. Например, стресс, вызванный пересадкой оздоровленных *in vitro* растений винограда в новые условия *in vivo*, первоначально приостанавливал развитие саженцев некоторых сортов (*Бианка*, *Красень*), однако в последующем высокая динамика их роста и развития возобновлялась.

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что биохимические показатели, характеризующие состояние Red/Ох-системы растений (активность изоферментов ПО и СОД), представляют собой информативные экспериментальные данные для экспресс-оценки стрессоустойчивости и биологической пластичности растений винограда. Активность Red/Ох-ферментов обусловлена сортовой специфичностью винограда и в значительной мере зависит от интенсивности и продолжительности воздействия стрессобразующих факторов.

По данным биохимических, биометрических и морфофизиологических исследований, у сортов винограда европейской селекции (*Пино Нуар*, *Красень*), полученных на основе винограда *V. vinifera*, более низкая адаптивность к стрессобразующим факторам по сравнению с более лабильными и пластичными сортами американской группы.

Сорта винограда североамериканской селекции, в частности *Маркетт* и *Маршал Фош*, проявили наибольшую устойчивость при абиотическом стрессе (водный дефицит, пониженные температуры и недостаточная освещенность), которая коррелировала с изменением активности Red/Ох-ферментов.

Установлено, что устойчивые к стрессовым воздействиям сорта винограда по сравнению с восприимчивыми характеризуются изначально более высокой активностью Red/Ох-энзимов и, судя по динамике изменения ростовых процессов, более совершенным механизмом их реализации.

По итогам выполнения задания НИР саженцы перспективных интродуцируемых сортов винограда *Маркетт* и *Маршал Фош* переданы в специализированные научные и производственные центры по возделыванию винограда (РУП «Брестская ОСХОС НАН Беларуси», ОАО «Пинский винодельческий завод») для испытания в полевых условиях.

Благодарности

Работа выполнена благодаря финансовой поддержке ГКНТ по гранту № Б14СРБ-006 «Беларусь–Сербия» от 14.05.2014 БРФФИ «Исследование стрессоустойчивости интродуцируемых в Беларуси сортов винограда к неблагоприятным абиотическим факторам среды по состоянию Red/Ох-системы растений».

Acknowledgements

This work was supported by the State Committee for Science and Technology of the Republic of Belarus (the grant no. B14SRB-006 by 14.05.2014, “Belarus–Serbia”, of Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Трошин, Л. П. Ампе́лография и селекция винограда / Л. П. Трошин. – Краснодар: Вольные мастера, 1999. – 138 с.
2. Лойко, Р. В. Северный виноград / Р. В. Лойко. – М.: Изд. Дом МСП, 2003. – 256 с.
3. Опыт решения проблем интродукции и технологии промышленного выращивания винограда в условиях Беларуси / Т. Г. Янчевская [и др.]. – Минск: Право и экономика, 2012. – 16 с.
4. Авидзба, А. М. Разработка и реализация национальной программы совершенствования сортимента винограда в Украине / А. М. Авидзба, В. А. Волынкин // Виноградарство и виноделие. – 2007. – № 2. – С. 2–5.
5. Ненько, Н. И. Физиолого-биохимические методы изучения исходного и селекционного материала / Н. И. Ненько, И. А. Ильина, В. С. Петров, М. А. Сундырева // Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2012. – С. 530–540.
6. Олейников, Н. П. // Виноградарство и виноделие: сб. науч. тр. НИВиВ «Магарач» / Н. П. Олейников. – Ялта: НИВиВ «Магарач», 2009. – Т. 39. – С. 17–21.
7. Панкин, М. И. Влияние биотических и абиотических факторов на продуктивность виноградных растений с различным генетическим потенциалом / М. И. Панкин // Междунар. дистанц. науч.-практ. конф., посвящ. 125-летию профессора А. С. Мерзжаниана; 31 марта 2010 г. – Анапа: ГНУ «Анапская ЗОСВиВ СКЗНИИСиВ» Россельхозакадемии, 2010. – С. 158–164.
8. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К. Г. Рем; пер. с нем. Л. В. Козлова [и др.]; под ред. П. Д. Решетова, Т. И. Соркиной. – М.: Мир, 2000. – 469 с.
9. Поликсенова, В. Д. Индуцированная резистентность растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам / В. Д. Поликсенова // Вестн. БГУ. – 2009. – № 1. – С. 48–60.
10. Бараненко, В. В. Супероксиддисмутаза в клетках растений / В. В. Бараненко // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 6. – С. 465–474.
11. Савич, И. М. Peroксидазы – стрессовые белки растений / И. М. Савич // Успехи соврем. биол. – 1999. – Т. 107, № 3. – С. 406–417.
12. Хайруллин, Р. М. Защитные реакции пшеницы при инфицировании грибными патогенами. Активация анионных изоформ пероксидазы в проростках пшеницы при инфицировании спорами *Tilletia caries* / Р. М. Хайруллин, З. Р. Юсупова, Н. Б. Трошина // Физиол. раст. – 2000. – Т. 47, № 1. – С. 114–119.
13. Гриц, А. Н. Активность и динамика изоферментов пероксидазы и супероксиддисмутазы в листьях картофеля при обработке растений биопрепаратами / А. Н. Гриц [и др.] // Ботаника (исследования). – Минск: Право и экономика, 2010. – Вып. 39. – С. 281–294.
14. Владимиров, Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков; отв. ред. Г. М. Франк. – М.: Наука, 1972. – 252 с.

References

1. Troshyn, L. P. (1999) *Ampelografiya i selektsiya vinograda* [Ampelography and grape vine selection], “Vol’nye Mastera”, Krasnodar, RU.
2. Loiko, R. V. (2003) *Severnyi vinograd* [Northern grape vine], MSP Publishing, Moscow, RU.
3. Yanchevskaya, T. G., Oleshuk, E. N., Popoff, E. H., Grits, A. N. and Makarova, T. B. (2012) *Opyt resheniya problem introduksii i tekhnologii promyshlennogo vyrashchivaniya vinograda v usloviyakh Belarusi* [Problems of grape vine introduction and cultivation in Belarus and its solutions], “Pravo & Economics”, Minsk, BY.
4. Avidzba, A. M. and Volynkin, V. A. (2007) “Development and realization of national program on improving grape vine assortment in Ukraine”, *Vinogradarstvo i vinodelie* [Viticulture and Winemaking], no. 2, pp. 2-5.
5. Nen’ko, N. I., Il’ina, I. A., Petrov, V. S. and Sundyreva, M. A. (2012) “Physiological and biochemical research methods of initial selection material”, *Sovremennye metodologicheskie aspekty organizatsii selektsionnogo protsesssa v sadovodstve i vinogradarstve* [Modern methodological aspects of selection process in horticulture and winegrowing], “SKZNIIS&V”, Krasnodar, RU, pp. 530-540.
6. Oleinikov, N. P. (2009) “Selection cold-resistant varieties of grapes and modern methods of diagnosis plant resistance to low temperatures”, *Vinogradarstvo i vinodelie* [Viticulture and Winemaking], vol. 39, pp. 17-21.
7. Pankin, M. I. (2010) “Effects of biotic and abiotic factors upon productivity of grape vine plants depending on different genetic potentials”, *Mezhdunarodnaya distantsionnaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya, posvyashchennaya 125-letiyu professora A. S. Merzhanina; 31 marta 2010 goda* [International scientific conference in commemoration of A. S. Merzhanin, 31 March 2010], Anapa Zone Experimental Station of Viticulture and Winemaking of RAA, Anapa, RU, pp. 158-164.
8. Koolman, J. and Röhm, K. H. (2000) *Taschenatlas der Biochemie*, Translated by Kozlov, L. V., Levina, E. S., Reshetov, P. D., in Reshetov, P. D., Sorkina, T. I. (ed.), Mir, Moscow, RU.
9. Poliksenova, V. D. (2009) “Induced resistance of plants toward pathogens and abiotic stress factors (for example tomato)”, *Vestnik BGU* [BSU Bulletin], ser. 2, no. 1, pp. 48-60.
10. Barabanenko, V. V. (2006) “Superoxide dismutase in plant cells”, *Tsitologiya* [Cytology], vol. 48, no. 6, pp. 465-474.
11. Savich, I. M. (1999) “Peroxidases – stress proteins of plants”, *Uspekhi sovremennoi biologii* [Biology Bulletin Reviews] vol. 107, no. 3, pp. 406-417.

12. Khairullin, R. M., Yusupova, Z. R. and Troshyna, N. B. (2000) «Protective reactions of wheat at fungi pathogen infections. Activation of anionic peroxidase isoforms in wheat acrospires after *Tilletia caries* spores infection», *Fiziologiya rastenii* [Russian Journal of Plant Physiology], vol. 47, no. 1, pp. 114-119.

13. Grits, A. N., Yanchevskaya, T. G. Romanovskaya, T. V. and Kolomiets, E. I. (2010) «Activity and dynamics of peroxidases and superoxide dismutases isoenzymes in potato leaves after biopreparations treatment», *Botanika (issledovaniya)* [Botany (research)], no. 39, pp. 281-294.

14. Vladimirov, Yu. A. and Archakov, A. I. (1972) *Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskikh membranakh* [Lipids peroxidation in biomembranes], in G. M. Frank (ed.), Nauka, Moscow, RU.

Информация об авторах

Олешук Евгений Николаевич – науч. сотрудник НИИ экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: oleshen@mail.ru

Гриц Александр Николаевич – науч. сотрудник НИИ экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: griz_-64@mail.ru

Попов Евгений Германович – канд. биол. наук, старший науч. сотрудник НИИ экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: egropoff@yahoo.com

Янчевская Тамара Георгиевна – канд. биол. наук, зав. лабораторией ОМНР НИИ экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: t_yanch@mail.ru

Для цитирования

Олешук, Е. Н. Экспресс-оценка стрессоустойчивости интродуцируемых сортов винограда (*Vitis*) по активности окислительно-восстановительных ферментов / Е. Н. Олешук, А. Н. Гриц, Е. Г. Попов, Т. Г. Янчевская // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2016. – № 4. – С. 33–41.

Information about the authors

Oleshuk Eugene N. – Scientific Researcher. Institute Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya st., 27, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: oleshen@mail.ru

Grits Alexander N. – Scientific Researcher. Institute Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya st., 27, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: griz_-64@mail.ru

Popoff Eugene Herman – Ph. D. (Biol. Sci.) Senior Scientific Researcher. Institute Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya st., 27, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: egropoff@yahoo.com

Yanchevskaya Tamara G. – Ph. D. (Biol. Sci.), Head of Laboratory OMNP. Institute Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya st., 27, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: t_yanch@mail.ru

For citation

Oleshuk E. N., Griz A. N., Popoff E. H., Yanchevskaya T. G. Express-assessment of introduced *Vitis* species' stress resistance using Red/Ox enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 33–41.

Т. А. Пучкова¹, А. А. Костеневич¹, И. А. Гончарова¹, А. И. Козинец²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству, Жодино, Республика Беларусь

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОТРАБОТАННОГО СОЛОМЕННОГО СУБСТРАТА ПОСЛЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБА ВЕШЕНКА ОБЫКНОВЕННАЯ В КОРМЛЕНИИ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Исследовано содержание белка, клетчатки, лигнина в соломенном субстрате при промышленном выращивании гриба вешенка обыкновенная на разных стадиях его роста и плодоношения. За весь цикл твердофазного культивирования *Pleurotus ostreatus* количество сырого протеина в субстрате увеличилось в 3,3 раза, истинного белка – в 2,8 раза, содержание сырой клетчатки снизилось в 3 раза, лигнина – в 1,4 раза. Активность ферментов в субстрате после 2–3 волн плодоношения составила (ед/г субстрата): целлюлазы – 23,4–27,3, марганецпероксидазы – 0,11–0,23, лакказы – 0,87–1,39. Установлено, что скармливание в составе рациона молодняка крупного рогатого скота субстрата вешенки позволяет обогатить рацион животных питательными веществами. Присутствие в отработанном субстрате вешенки комплекса целлюлолитического и лигнинолитического ферментов открывает возможности использования данного субстрата в кормопроизводстве с целью увеличения усвояемости грубых растительных кормов.

Ключевые слова: *Pleurotus ostreatus*, соломенный субстрат, целлюлаза, марганецпероксидаза, лакказа, молодняк крупного рогатого скота.

T. A. Puchkova¹, A. A. Kastsianevich¹, I. A. Goncharova¹, A. I. Kozinets²

¹Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences, Minsk, Republic of Belarus

²The Scientific and Practical Center for Animal Breeding of the National Academy of Sciences, Zhodino, Republic of Belarus

USING WASTE STRAW SUBSTRATE AFTER OYSTER MUSHROOM CULTIVATION FOR FEEDING OF YOUNG CATTLE

Content of protein, cellulose and lignin in the straw substrate at different stages of oyster mushroom large-scale cultivation have been investigated. After whole cycle of *Pleurotus ostreatus* growth in the solid-state culture quantity of crude protein and true protein in the substrate increased 3.3 and 2.8 times respectively. The content of insoluble fibers in the straw decreased 3 times, quantity of lignin reduced 1.4 times. Activity of enzymes in the substrate after 2–3 waves of fructification was the following (U/g): cellulase – 23.4–27.3, manganese peroxidase – 0.11–0.23, laccase – 0.87–1.39. It was established that feeding of calves straw waste of oyster mushroom industrial cultivation cause positive effect on consumption of diet nutrients. Presence in the waste substrate of cellulolytic and lignolytic enzymes opens new opportunities in fodder manufacturing to promote digestibility of forages.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, straw substrate, cellulose, manganese peroxidase, laccase, young cattle.

Введение. Вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus* (Jack.: Fr.) Kumm) относится к широко распространенным культивируемым съедобным грибам и занимает одно из ведущих мест по объему мирового производства. В условиях умеренных широт плодовые тела вешенки чаще всего выращивают на соломе злаковых культур. После сбора плодовых тел остается значительное количество отработанного субстрата (около 5 кг на 1 кг грибов). В связи с расширением производства грибов важной задачей является их рациональное применение.

Ряд исследователей предлагают использовать отработанный субстрат, обогащенный после завершения цикла культивирования грибов рода *Pleurotus* белком и другими биологически активными соединениями, как питательную добавку в корм сельскохозяйственным животным [1–3].

В последнее время внимание исследователей привлекает твердофазное культивирование *P. ostreatus* с целью получения целлюлолитических и лигнинолитических ферментов [4, 5]. В этой связи использование твердофазной культуры гриба позволит обогатить кормовые рационы животных ферментами, которые будут способствовать улучшению перевариваемости грубых кормов.

Цель исследования – изучение динамики содержания белка, клетчатки, лигнина в субстрате твердофазной культуры гриба *P. ostreatus* на разных стадиях его роста и плодоношения, определение ферментативной активности субстрата и эффективности его добавления в кормовой рацион молодняка крупного рогатого скота.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служил обросший мицелием гриба *P. ostreatus* субстрат, полученный из грибоводческого цеха ОАО «Александрийское» Шкловского района Могилевской области. Субстрат представлял собой плотные блоки из соломы злаковых культур, обросшие грибным мицелием. Из-за неравномерного обрастания субстратного блока мицелием для проведения анализов выбирали усредненные образцы. Для проведения исследований использовали субстрат на разных стадиях роста и плодоношения. Контролем служил субстрат на стадии инокуляции зерновым мицелием гриба.

Образцы субстрата с мицелием гриба высушивали при температуре 60 °С, измельчали на лабораторной мельнице и использовали для проведения соответствующих анализов. Для определения влажности субстрата его высушивали при температуре +105 °С до постоянного веса.

Сырой протеин в сухом субстрате определяли по Кьельдалю, истинный белок – по Барнштейну [6], сырую клетчатку – по Кюршнеру и Ганеку [7], сырой лигнин – весовым методом [8].

Для определения энзиматической активности использовали образцы субстрата в свежем виде. Навеску 25 г субстрата ресуспензировали в 50 мл дистиллированной воды при периодическом перемешивании в течение 1 ч. Полученный экстракт фильтровали, центрифугировали и использовали для определения активности ферментов. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль продукта в соответствующей реакции в течение 1 мин.

Активность целлюлаз определяли с использованием в качестве субстрата натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы [9]. Активность марганецпероксидазы и лакказы измеряли по скорости окисления модельного фенольного соединения 2,6-диметоксифенола [10].

Физиологические исследования по изучению перевариваемости питательных веществ субстрата вешенки проводили на годовалом молодняке крупного рогатого скота в условиях ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» Смолевичского района Минской области. Согласно схеме кормления, животные контрольной группы получали силос злаково-бобовый (по поедаемости) и комбикорм (1,6 кг). Различия в составе рационов состояли в том, что бычкам опытной группы дополнительно скармливали 0,8 кг субстрата вешенки, полученного после 2–3 волн плодоношения грибов, путем смешивания его с объемистыми кормами. Продолжительность физиологических исследований при введении в рацион опытных животных субстрата вешенки составила 30 дней.

Для установления картины метаболических процессов у животных кровь из яремной вены брали через 2,5–3 ч после утреннего кормления у 4 голов из каждой группы. Общая численность животных в каждой группе составляла 40 голов. Выборку голов проводили согласно методике [11].

Для определения морфофункциональных показателей крови использовали автоматический анализатор Medonic CA-620. Анализ биохимических показателей крови выполняли на автоанализаторе Cormay Lumen (BTS 370 Plus).

Эффективность использования субстрата твердофазной культуры вешенки в рационах молодняка крупного рогатого скота при выращивании и откорме оценивали по результатам исследований, проведенных в 2012–2014 гг. в условиях ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» Смолевичского района Минской области. По данным проведенных исследований подбирали оптимальные нормы скармливания соломенного субстрата гриба вешенки в рационах молодняка крупного рогатого скота до и старше 12-месячного возраста.

Для изучения показателей эффективности использования субстрата вешенки в рационах молодняка крупного рогатого скота животным опытной группы до 12-месячного возраста с начальной живой массой 170 кг в составе рациона скармливали 0,8 кг (на голову в сутки) отработанного субстрата вешенки обыкновенной. Опытное скармливание субстрата проводили в течение 2 мес.

Животным опытной группы старше 12-месячного возраста на откорме с начальной живой массой 225 кг в составе рациона скармливали 1,5 кг (на голову в сутки) отработанного субстрата вешенки обыкновенной. Опытное скармливание субстрата проводили в течение 5 мес.

Кормовую добавку вводили в рацион животных в два приема вместе с раздачей грубых кормов. Перевариваемость питательных веществ оценивали по разнице между потребленными и выделенными из организма питательными веществами. Живую массу телят контролировали по данным ежемесячных перевесок поголовья.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. Исследована динамика образования белка, содержания клетчатки и лигнина в субстрате в процессе твердофазного культивирования мицелия гриба *P. ostreatus*.

В первые 2–4 недели культивирования гриба происходило активное обрастание грибным мицелием субстратных блоков, сопровождающееся потреблением питательных веществ субстрата. Количество клетчатки уменьшилось в 1,7 раза, лигнина – в 1,2 раза. Содержание в субстрате сырого протеина и истинного белка повысилось в 2,2 и 2 раза соответственно. На 5–6-й неделе культивирования для стимуляции образования плодовых тел снижали температуру культивирования субстратных блоков с 23–25 до 13–15 °С. Холодовой стресс, переход культуры в стадию образования плодовых тел, а также уменьшение количества питательных веществ в субстрате привели к снижению ростовой активности мицелия. За период плодоношения количество в субстрате сырого протеина и истинного белка повысилось в 1,3 и 1,1 раза, а потребление грибом клетчатки и лигнина – в 1,1 раза (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Содержание белка, клетчатки и лигнина в субстрате в процессе твердофазного культивирования мицелия гриба *P. ostreatus*, %

Фаза культивирования	Время культивирования, недели	Сырой протеин	Истинный белок	Сырая клетчатка	Лигнин
Инокуляция субстрата	0	3,4 ± 0,12	2,5 ± 0,11	45,2 ± 1,8	28,2 ± 1,2
Обрастание субстрата мицелием	2	5,4 ± 0,13	3 ± 0,11	33,9 ± 1,1	24,5 ± 0,5
	4	7,6 ± 0,5	5,0 ± 0,3	25,8 ± 0,8	23 ± 0,4
1-я волна плодоношения	7	8,9 ± 0,2	6,3 ± 0,2	16,6 ± 0,6	21,8 ± 0,4
2-я волна плодоношения	9	10,2 ± 0,6	6,8 ± 0,4	15,4 ± 0,3	20,8 ± 0,5
3-я волна плодоношения	11	11,3 ± 0,5	7,1 ± 0,3	14,9 ± 0,6	20,1 ± 0,4

За весь цикл твердофазного культивирования *P. ostreatus* от инокуляции до окончания плодоношения количество сырого протеина в субстрате увеличивалось в 3,3 раза, истинного белка – в 2,8 раза, что составило 11,3 и 7,1 % соответственно. Одновременно за счет целлюлолитической и лигнинолитической активности гриба происходило снижение содержания в субстрате сырой клетчатки в 3 раза, лигнина – в 1,4 раза.

В субстрате твердофазной культуры *P. ostreatus* исследована динамика активности целлюлаз и лигнинолитических ферментов.

Установлено, что по мере обрастания субстратных блоков мицелием *P. ostreatus* и увеличения содержания в них белка происходит рост целлюлолитической активности (табл. 2). После перехода культуры к стадии плодоношения рост активности фермента несколько замедлялся. Наибольшая активность целлюлаз отмечалась после 2-й и 3-й волн плодоношения, составив 23,4 и 27,3 ед/г субстрата. Это свидетельствует о значительном обогащении субстрата вешенки целлюлолитическими ферментами в процессе плодоношения.

Т а б л и ц а 2. Содержание ферментов в субстрате в процессе твердофазного культивирования мицелия *P. ostreatus*, ед/г субстрата

Фаза культивирования	Целлюлаза	Марганецпероксидаза	Лакказа
Обрастание субстрата мицелием (2 недели)	18,7 ± 0,3	2,1 ± 0,05	0,3 ± 0,02
Обрастание субстрата мицелием (4 недели)	20 ± 0,5	1,5 ± 0,02	0,38 ± 0,02
1-я волна плодоношения	21,6 ± 1,0	0,6 ± 0,03	0,81 ± 0,12
2-я волна плодоношения	23,4 ± 1,1	0,23 ± 0,01	1,39 ± 0,19
3-я волна плодоношения	27,4 ± 0,63	0,11 ± 0,01	0,87 ± 0,20

Мицелий вешенки продуцировал лигнолитические ферменты – марганецпероксидазу и лакказу. В проведенных нами предыдущих исследованиях активность лигнинпероксидазы не обнаружена. Как видно из приведенных в табл. 2 данных, активность марганецпероксидазы оказалась выше, чем лакказы до начала образования плодовых тел. Максимальное значение марганецпероксидазы (1,5–2,1 ед/г субстрата) наблюдалась в первые 4 недели культивирования. После 2-й и 3-й волн плодоношения активность этого фермента снизилась до 0,11–0,23 ед/г субстрата. Активность лакказы достигала максимума после 2-й волны (1,39 ед/г субстрата) и сохранялась высокой после 3-й волны плодоношения (0,87 ед/г субстрата).

По данным [12], активность неочищенных ферментов, полученных из субстрата вешенки, по отношению к кормовой кукурузе и сое соизмерима с активностью коммерческих кормовых ферментов.

Сотрудниками РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству» изучено влияние твердофазной культуры *P. ostreatus* на физиологическое состояние и продуктивность молодняка крупного рогатого скота после введения в рацион субстрата. Рекомендованы нормы скармливания субстрата гриба вешенка, согласно которым молодняку крупного рогатого скота до 12-месячного возраста в составе рационов можно вводить данную кормовую добавку в количестве до 1 кг, а животным старше 12-месячного возраста на откорме – до 1,5 кг.

Для оценки физиологического состояния животных опытной и контрольной групп исследованы показатели крови. В крови бычков опытной группы содержание гемоглобина и количество эритроцитов превосходили таковые в контрольной группе, однако все показатели находились в пределах физиологических норм, без достоверных различий между группами. Содержание общего белка в сыворотке крови животных опытной и контрольной групп существенно не различалось, наблюдалось лишь некоторое снижение его концентрации на 1,9 % в опытной группе. В крови бычков опытной группы проявлялась тенденция к снижению содержания мочевины, что можно объяснить более интенсивным извлечением азотистых веществ крови и уменьшением распада белков в рубце, а следовательно, повышением продуктивности. Содержание кальция и фосфора и показатели резервной щелочности в крови бычков контрольной и опытной групп находились в пределах физиологических норм и статистически достоверных различий не имели. Проведенные исследования показали, что скармливание в составе рациона субстрата вешенки оказало положительное влияние на гомеостаз организма бычков.

Установлено, что использование в составе рациона субстрата вешенки положительно влияет на интенсивность пищеварительных процессов: способствует повышению перевариваемости сухого вещества на 2,3 %, органического вещества – на 3,1, жира – на 2,8, протеина – на 2,8, безазотистых экстрактивных веществ – на 2,9, клетчатки – на 3,3 % (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Коэффициенты переваримости питательных веществ рациона, %

Показатель	Контрольная группа	Опытная группа
Сухое вещество	58,4 ± 0,3	60,7 ± 1,3
Органическое вещество	59,4 ± 0,6	62,5 ± 0,7
Протеин	56,5 ± 3,3	59,3 ± 1,8
Жир	58,1 ± 3,6	60,9 ± 1,0
Клетчатка	40,0 ± 2,5	43,3 ± 2,3
Безазотистые экстрактивные вещества	67,4 ± 0,7	70,3 ± 0,6

По истечении 2 мес. скармливания молодняку крупного рогатого скота до 12-месячного возраста в составе рационов субстрата твердофазной культуры гриба вешенка в количестве до 1 кг наблюдалось повышение среднесуточного прироста у молодняка опытной группы на 4,5 %. Это привело к снижению затрат кормов на 3,7 % и себестоимости прироста на 3,3 % по сравнению с аналогичными показателями у молодняка контрольной группы, получавшего такой же рацион, но без субстрата.

Введение в рацион молодняку крупного рогатого скота старше 12-месячного возраста на откорме 1,5 кг отработанного соломенного субстрата вешенки способствовало более интенсивному

росту бычков опытной группы по сравнению с контрольной. Показатели изменения живой массы и среднесуточных приростов телят представлены в табл. 4.

За период исследований у бычков опытной группы масса увеличилась на 141,9 кг, что на 14,4 кг, или на 11,3 %, больше ($P < 0,05$), чем у животных аналогичного возраста контрольной группы. Среднесуточный прирост бычков опытной группы повысился от 850 до 946 г, или на 11,3 %. Разница среднесуточных приростов между животными контрольной и опытной групп была достоверной ($P < 0,05$).

Т а б л и ц а 4. Показатели среднесуточного прироста телят

Показатель	Контрольная группа	Опытная группа
Живая масса при постановке на опыт, кг	225,53 ± 3,22	229,00 ± 3,97
Живая масса в конце опыта, кг	353,03 ± 4,61	370,90 ± 4,97
Валовой прирост за опыт, кг	127,50 ± 3,62	141,90 ± 4,40
Среднесуточный прирост за опыт, г	850 ± 24,13	946 ± 12,24
% к контролю	100	111,3

Использование субстрата вешенки позволило снизить в опытной группе затраты кормов рациона на 1 кг прироста на 9,2 % по сравнению с контрольной группой за счет более высокого уровня продуктивности бычков опытной группы. Стоимость суточного рациона в опытной группе оказалась дешевле, чем в контрольной. Вместе с более высоким уровнем приростов это способствовало снижению стоимости кормов, затраченных на 1 кг прироста.

Заключение. Установлено, что в процессе твердофазного культивирования мицелия *P. ostreatus* происходит значительное обогащение субстрата белком. Субстрат после сбора плодовых тел вешенки может служить источником ферментов целлюлолитического и лигнинолитического комплекса. Кроме того, скармливание в составе рациона молодняка крупного рогатого скота субстрата вешенки обогащает рацион животных питательными веществами и улучшает перевариваемость грубых кормов, способствует улучшению показателей крови животных в пределах физиологических норм, в том числе по концентрации гемоглобина и эритроцитов. Согласно полученным результатам, использование отработанного субстрата гриба вешенки в кормопроизводстве позволит увеличить усвояемость грубых растительных кормов.

Список использованных источников

1. The nutritional value of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm cultivated on different lignocellulosic agrowastes / S. S. Patil [et al.] // Innovative Romanian Food Biotechnol. – 2010. – Vol. 7. – P. 66–76.
2. Akyüz, M. Effect of various agro-residues on nutritive value of *Pleurotus eryngii* (DC. Ex Fr.) Quel. Var. ferulae Lanzi / M. Akyüz, S. Kirbağ // J. of Agricult. Sci. – 2010. – Vol. 16. – P. 83–88.
3. Jafarpour, M. High protein complementation with high fiber substrates for oyster mushroom cultures / M. Jafarpour, S. Eghbalsaeed // African J. of Biotechnol. – 2012. – Vol. 11, N 14. – P. 3284–3289.
4. Голубев, О. Отходы промышленного выращивания вешенки устричной / О. Голубев // Комбикорма. – 2004. – № 4. – С. 42.
5. Masutti, D. C. Production of enzyme from rice husks and wheat straw in solid state fermentation / D. C. Masutti, A. Borgognone, L. Setti // Chem. Engineering Transactions. – 2012. – Vol. 27. – P. 133–138. Doi: 103303/CET1227023.
6. Петербургский, А. В. Практикум по агрономической химии / А. В. Петербургский. – М.: Колос, 1968. – 496 с.
7. Ермаков, А. И. Методы биохимического исследования растений / под ред. А. И. Ермакова. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 429 с.
8. Zadrazil, F. The influence of Ammonium Nitrate supplementation on degradation and in vitro digestibility of straw colonized by higher fungi / F. Zadrazil, H. Brunnet // Eur. J. of Appl. Microbiol. and Biotechnol. – 1980. – Vol. 9, N 1. – P. 37–39.
9. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности целлюлазы: ГОСТ Р 53046-2008. – М.: Стандартинформ, 2009. – 12 с.
10. Wariishi, H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators / H. Wariishi, K. Valli, M. H. Gold // J. Biol. Chem. – 1992. – Vol. 267. – P. 23688–23695.

11. Овсянников, А. И. Основы опытного дела в животноводстве: учеб. пособие / А. И. Овсянников. – М.: Колос, 1976. – 304 с.

12. Keavsonpong, S. Cellulolytic enzyme system of *Pleurotus ostreatus* and its application in animal feed / S. Keavsonpong, J. Sanomwatanawong, S. Nitisinprasert // Mushroom biology and mushroom products (ICMBMP): the Fifth Int. conf., 8–12 april 2005, Shanghai, China. – Vol. 12. – P. 68–73.

References

1. Patil, S. S., Ahmed, S. A., Telang, S. M. and Baig, M. M. V. (2010) “The nutritional value of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm cultivated on different lignocellulosic agrowastes”, *Innovative Romanian Food Biotechnology*, vol. 7, pp. 66–76.

2. Akyüz, M. and Kirbağ, S. (2010) “Effect of various agro-residues on nutritive value of *Pleurotus eryngii* (DC. Ex Fr.) Quel. Var. ferulae Lanzi”, *Journal of Agricultural Science*, vol. 16, pp. 83–88.

3. Jafarpour, M. and Eghbalsaeed, S. (2012) “High protein complementation with high fiber substrates for oyster mushroom cultures”, *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, no. 14, pp. 3284–3289.

4. Golubev, O. (2004) “The waste of Oyster mushroom industrial cultivation”, *Kombikorma* [Compounded Feed], no. 4, p. 42.

5. Masutti, D. C., Borgognone, A. and Setti, L. (2012) “Production of enzyme from rice husks and wheat straw in solid state fermentation”, *Chemical engineering transactions*, vol. 27, pp. 133–138, doi: 103303/CET1227023.

6. Peterburgskii, A. V. (1968) *Praktikum po agronomicheskoi khimii* [Workshop on agronomical chemistry], Kolos, Moscow, RU.

7. Ermakov, A. I. (ed.) (1987) *Metody biokhimicheskogo issledovaniya rastenii* [Methods of a biochemical research of plants], Agropromizdat, Leningrad, RU.

8. Zadrzil, F. and Brunnet, H. (1980) “The influence of Ammonium Nitrate supplementation on degradation and in vitro digestibility of straw colonized by higher fungi”, *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 9, no. 1, pp. 37–39.

9. GOST R 53046-2008 (2009) *Preparaty fermentnye. Metody opredeleniya fermentativnoi aktivnosti tsellyulazy* [State Standard R 53046-2008. Enzyme preparation. Methods of definition of enzymatic activity of cellulase], Standartinform, Moscow, RU.

10. Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. (1992) “Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators”, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, pp. 23688–23695.

11. Ovsyannikov, A. I. (1976) *Osnovy opytnogo dela v zhivotnovodstve* [Fundamentals of experimental work in animal husbandry], Kolos, Moscow, RU.

12. Keavsonpong, S., Sanomwatanawong, J. and Nitisinprasert, S. (2005) “Cellulolytic enzyme system of *Pleurotus ostreatus* and its application in animal feed”, *Mushroom biology and mushroom products (ICMBMP): the Fifth Int. conf., 8–12 April 2005, Shanghai, China*, vol. 12, pp. 68–73.

Информация об авторах

Пучкова Татьяна Антоновна – канд. биол. наук, доцент, биологический факультет. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tatiashi@mail.ru

Костневич Александр Александрович – канд. биол. наук, зав. лабораторией белка. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. акад. В. Ф. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь)

Гончарова Инесса Адамовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. акад. В. Ф. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь)

Козинец Александр Иосифович – канд. сельскохозяйственных наук, зав. лабораторией кормовых добавок и биопродуктов. НПЦ НАН Беларуси по животноводству (ул. Фрунзе, 11, 222160, Жодино, Минская обл., Республика Беларусь)

Для цитирования

Пучкова, Т. А. Использование отработанного соломенного субстрата после культивирования гриба вешенка обыкновенная в кормлении молодняка крупного рогатого скота / Т. А. Пучкова, А. А. Костневич, И. А. Гончарова, А. И. Козинец // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2016. – № 4. – С. 42–47.

Information about the authors

Puchkova Tatsiana Antonovna – Ph. D. (Biol.), associate professor, faculty of biology. Belarusian State University (Nezavisimosti av., 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tatiashi@mail.ru

Kastsianeovich Aleksandr Aleksandrovich – Ph. D. (Biol.), head of laboratory of protein. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (V. F. Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus)

Goncharova Inessa Adamovna – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (V. F. Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus)

Kozinets Aleksandr Iosifovich – Ph. D. (Agr.), head of laboratory of feed additives and bioproducts. RUE “The Scientific and Practical Center for Animal Breeding” of the National Academy of Sciences of Belarus (Frunse str., 11, 222160, Zhodino, Minsk Oblast, Republic of Belarus)

For citation

Puchkova T. A., Kastsianeovich A. A., Goncharova I. A., Kozinets A. I. Using waste straw substrate after oyster mushroom cultivation for feeding of young cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 42–47.

Э. И. Коломиец

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

КОЛЛЕКЦИЯ НЕПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ИНСТИТУТА МИКРОБИОЛОГИИ НАН БЕЛАРУСИ

Представлен материал о формировании Белорусского коллекционного фонда непатогенных микроорганизмов, основных направлениях его деятельности, достигнутых результатах и перспективах развития. Показана ключевая роль коллекции в становлении современной промышленной микробиологии, основанной на последних достижениях науки и техники.

Ключевые слова: коллекция, непатогенные микроорганизмы, структура коллекции, методы хранения, сервисные услуги.

E. I. Kolomiets

Institute of Microbiology of the National academy of sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

COLLECTION OF NON-PATHOGENIC MICROORGANISMS OF THE INSTITUTE OF MICROBIOLOGY OF NAS OF BELARUS

Material dedicated to development of Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms, main ways of its activity, received results and prospects was represented. Significance of collection in the establishment of modern industrial microbiology based on last scientific and technical achievements was demonstrated.

Keywords: collection, non-pathogenic microorganisms, structure of collection, methods of preservation, services.

Биоресурсные центры, в основе которых лежат коллекции микроорганизмов, вирусов, культур клеток тканей растений и животных, являются базой для развития биотехнологии. Интерес к коллекциям особенно проявился со второй половины XX в., когда с созданием новых биотехнологических производств остро возросла потребность в штаммах микроорганизмов с определенными свойствами, что активизировало работы по получению высокоактивных продуцентов, более глубокому изучению поддерживаемых фондов микроорганизмов и созданию банков данных [1–6].

Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов начала формироваться в 1970-е годы и включала типовые штаммы, полученные из Всесоюзной коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), а также культуры из рабочих коллекций лабораторий Института микробиологии НАН Беларуси (всего около 400 штаммов). Работа коллекционного фонда строилась согласно Руководству [7], большинство сотрудников прошли стажировки в ВКПМ.

После обретения независимости республики возникла необходимость создания национального коллекционного фонда, способного предоставлять полный комплекс услуг научным и производственным структурам в области биотехнологии. Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 11.06.2002 № 758 Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов (БКМ) – научная коллекция типовых и промышленно-ценных непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси включена в Государственный реестр научных объектов, составляющих национальное достояние. Тем же постановлением Национальная академия наук Беларуси определена ответственная за обеспечение сохранности и функционирования Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов.

Коллекция создана с целью обеспечения правовой охраны штаммов микроорганизмов, генетической и фенотипической паспортизации штаммов, гарантированного сохранения микроорганизмов в жизнеспособном состоянии.

Основными направлениями деятельности коллекционного фонда в настоящее время являются: формирование коллекции микроорганизмов, представляющих интерес для различных областей микробиологии и биотехнологии за счет выделения новых культур микроорганизмов из природных источников и обмена микроорганизмами из других коллекций;

селекция и генно-инженерное конструирование высокоактивных микроорганизмов – продуцентов для создания биопрепаратов нового поколения; улучшение практически важных свойств культур методами селекции и генной инженерии;

молекулярно-генетическая идентификация бактерий, бактериофагов, мицелиальных и дрожжевых грибов, проведение исследований в области физиологии микроорганизмов различных таксономических групп;

лиофилизация и криоконсервация штаммов; оптимизация способов длительной консервации микроорганизмов коллекционного фонда;

систематизация сведений о культурах коллекционного фонда, создание банков данных, оказание консультаций по вопросам идентификации и консервации микроорганизмов; депонирование штаммов микроорганизмов с целью патентной процедуры, выдача культур по запросам пользователей;

стандартизация сведений о микроорганизмах, в том числе генно-модифицированных, для обеспечения биобезопасности;

международное и национальное патентное депонирование микроорганизмов для защиты прав интеллектуальной собственности;

сотрудничество с международными коллекциями, обмен культурами;

создание и пополнение электронных баз данных о коллекционном фонде, выпуск каталогов культур.

Основной фонд БКМ представлен коллекциями мицелиальных грибов (620 штаммов), бактерий (1000 штаммов), дрожжевых грибов (240 штаммов), бактериофагов (70 штаммов). На базе БКМ создан Банк промышленно-ценных микроорганизмов, включающий 185 штаммов, предназначенных для производства ферментов, лечебно-профилактических препаратов, заквасок для силосования растительных субстратов, биологических средств защиты растений и животных, биотоплива, для применения в биосенсорных и природоохранных технологиях и др. В рамках заданий межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» и государственной научно-технической программы «Промышленные биотехнологии», головной организацией-исполнителем которых является Институт микробиологии НАН Беларуси, созданы специализированные коллекции: микромицетов – агентов биоповреждений строительных материалов (40 штаммов), используемых в испытаниях строительных материалов на грибостойкость; фитопатогенных микроорганизмов (100 штаммов) – основы создания средств биологического контроля; микроорганизмов – деструкторов ксенобиотиков (65 штаммов), имеющих большое значение при разработке природоохранных биотехнологий. Важным элементом инфраструктуры ресурсной базы биотехнологии Республики Беларусь является банк ДНК культур промышленно-ценных микроорганизмов (90 образцов геномной ДНК бактерий и бактериофагов).

В рамках законодательства Республики Беларусь БКМ осуществляет депонирование промышленно-ценных микроорганизмов для формирования национального коллекционного фонда и стандартизации используемых в биотехнологии штаммов, а также для целей патентной процедуры по защите прав интеллектуальной собственности в области микробных биоресурсов [8]. Коллекцией разработаны «Правила депонирования штаммов микроорганизмов в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов». На Институт микробиологии возложена также функция обеспечения эффективной координации деятельности коллекционных фондов микроорганизмов, существующих в других организациях НАН Беларуси. Систематизация данных о структуре и условиях хранения коллекционных фондов микроорганизмов способствует коммерциализации и более эффективному использованию имеющихся микробных и генетических ресурсов в Республике Беларусь и за ее пределами.

БКМ не только способствует формированию более тесных научных и практических взаимосвязей коллекций республики, но и играет важную роль в развитии международного сотрудничества по вопросам мониторинга нормативной базы оборота микробных ресурсов, осуществления

экспертной деятельности, международного и национального патентного депонирования культур для защиты прав интеллектуальной собственности, стандартизации сведений о микроорганизмах (в том числе рекомбинантных) для обеспечения биобезопасности при их использовании. В настоящее время коллекция насчитывает 19 генно-модифицированных биотехнологически ценных штаммов микроорганизмов, из них 16 – продуценты ферментов, 2 – продуценты плазмид, 1 – штамм спорообразующих бактерий с антимикробной и инсектицидной активностью.

БКМ осуществляет международное сотрудничество с ведущими мировыми коллекциями культур, обеспечивает научное и документальное сопровождение межколлекционного обмена. За период с 2011 по 2015 г. по такому обмену получено 300 и передано 100 штаммов микроорганизмов. В рамках межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» проведены исследования, направленные на развитие коллекционных фондов и разработку унифицированных программных средств для эффективного функционирования национальных коллекций микроорганизмов Республики Беларусь, Российской Федерации и Республики Казахстан.

Белорусская коллекция микроорганизмов зарегистрирована во Всемирной Федерации Коллекций Культур (WFCC-MIRCEN World Data Centre for Microorganisms, WDCM) под номером 909, акроним BIM. В 6-м издании Справочника WDCM (2013 г.) впервые представлена информация о БКМ как о значимой коллекции стран СНГ и мира. В 2014 г. в рамках инициативы WDCM по унификации коллекционных баз данных и таксономической ревизии микроорганизмов различных таксономических групп “Microbial Resources Information Management and Utilization for Developing Countries”, в Федерацию представлена английская версия электронного каталога БКМ (WDCM-BIM 909).

Сотрудники коллекции выполняют фундаментальные научные исследования, направленные на дальнейшее развитие, обеспечение сохранности и функционирования Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов: выделение, скрининг, селекцию и паспортизацию биотехнологически ценных культур микроорганизмов; выделение и характеристику образцов геномной ДНК промышленно-ценных микроорганизмов, характеристику физиолого-биохимических свойств культур коллекционного фонда для использования в качестве объектов новых биотехнологий; ориентированные фундаментальные исследования, связанные с выполнением фенотипической и молекулярно-генетической (анализ последовательности генов 16S рибосомной РНК) идентификации микроорганизмов различных таксономических групп, а также прикладные научные исследования, включающие долгосрочное хранение культур методами лиофилизации и криоконсервации, осуществление процедуры национального патентного депонирования промышленных штаммов-продуцентов.

С 2015 г. в рамках государственной программы научных исследований «Фундаментальные основы биотехнологий» сотрудниками коллекции начаты научно-исследовательские работы по микробиологическому анализу и консервации антарктических микроорганизмов, собранных в районе проведения работ Белорусской антарктической экспедицией. В целом, НИР направлена на проведение поисковых проблемно-ориентированных исследований и создание научно-технического задела для практического использования хозяйственно-ценных штаммов микроорганизмов, выделенных из объектов на территории Восточной Антарктиды.

Коллекционный фонд ведет активную издательскую деятельность. Изданы «Каталог культур микроорганизмов» и «Каталог промышленно-ценных микроорганизмов» [9, 10]. Созданы и постоянно обновляются информационные базы данных. Каталоги и Базы данных представляют интерес для широкого круга специалистов – микробиологов, генетиков и биотехнологов, являясь справочным руководством при поиске культур микроорганизмов для создания промышленных биотехнологий. Основные достижения Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов в области формирования и развития микробных и генетических ресурсов представлены более чем на 80 выставочно-ярмарочных мероприятиях.

БКМ оказывает сервисные услуги по выдаче, идентификации, молекулярно-генетической паспортизации и консервации микроорганизмов, осуществляет научное сопровождение промышленных производств. Культуры микроорганизмов различных таксономических групп поддерживаются в жизнеспособном состоянии с использованием методов субкультивирования, лиофи-

лизации и криоконсервации. Национальный коллекционный фонд микробных ресурсов широко используется при разработке конкурентноспособных биотехнологий и биопрепаратов. Так, только за 2011–2015 гг. на основе промышленно-ценных штаммов микроорганизмов Институтом микробиологии НАН Беларуси разработаны и внедрены технологии получения 20 биопрепаратов для сельского хозяйства, медицины, пищевой промышленности и охраны окружающей среды. БКМ обеспечивает необходимыми микробными ресурсами научно-исследовательские и промышленные организации, работающие в области биотехнологии. Коллекционным фондом оказываются сервисные услуги по научному сопровождению производственных процессов. Среди постоянных заказчиков БКМ – около 30 отечественных и иностранных (Литва, РФ) коммерческих предприятий и промышленных организаций, в частности ОАО «Минский завод игристых вин», ОАО «Дрожжевой комбинат», ОАО «Минский маргаринный завод» и др.

Проведение коллекционной работы на высоком научном уровне стало возможным благодаря модернизации материально-технической базы коллекции, приобретению современного оборудования, в том числе ультранизкотемпературных морозильников (США); анаэробной станции Bug Box M; амплификатора SureCycler, амплификатора с детекцией результатов в режиме реального времени AGLIEN (США) и др.

Результаты деятельности БКМ представлены на Выставочной экспозиции, открытой в Институте микробиологии в апреле 2016 г.

В перспективе планируется:

создание коллекции бактериофагов, имеющей большое практическое значение для проведения молекулярно-генетических исследований; селекции резистентных к бактериофагам штаммов молочнокислых бактерий, обладающих производственно-ценными свойствами; разработки способов защиты сельскохозяйственных культур от бактериозов;

создание коллекции генетических конструкций, что обеспечит возможность выбора оптимальных векторов для клонирования, экспрессии или нокаута генов в клетках микроорганизмов разных таксономических групп с целью получения хозяйственно-ценных штаммов;

обеспечение тесного взаимодействия с предприятиями биотехнологической отрасли за счет дальнейшего развития национального фонда и банка ДНК культур промышленно-ценных микроорганизмов, поиска коммерчески важных генов микроорганизмов, их анализа и использования для генно-инженерного конструирования штаммов – сверхпродуцентов биологически активных веществ; оценки их биобезопасности;

осуществление экспертной деятельности в области биобезопасности микробных ресурсов.

В совокупности проводимая работа служит основой развития биоресурсной базы биотехнологий и вносит существенный научный и практический вклад в формирование биотехнологической отрасли страны.

Список использованных источников

1. Коломиец, Э. И. Сохранение и изучение ресурсов микробного разнообразия / Э. И. Коломиец // Наука и инновации. – 2008. – № 10. – С. 24–26.
2. Дьяконов, Л. П. Коллекции клеточных культур – фундаментальная основа научных исследований по биологии клетки и биотехнологии / Л. П. Дьяконов // Вет. патология. – 2003. – № 1. – С. 10–19.
3. Похименко, В. Д. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В. Д. Похименко, А. М. Баранов, К. В. Детушев // Изв. высш. учеб. заведений. Мед. науки. – 2009. – Вып. 4. – С. 108–111.
4. Юзбашев, Т. В. Проблемы нормативного регулирования в области микробных биоресурсов биотехнологического назначения [Электронный ресурс] / Т. В. Юзбашев, Е. Ю. Юзбашева, С. П. Синеокий. – Режим доступа: <http://биокиров.рф/upload/iblock/pdf>. – Дата доступа: 04.06.2016.
5. Евтушенко, Л. И. Микроб с меморандумом. Работы пущинских коллекционеров невидимых существ вышли на новый уровень [Электронный ресурс] / Л. И. Евтушенко // Наука. – 2013. – № 37. – Режим доступа: <http://www.roisknews.ru/theme/science/7450>. – Дата доступа: 06.06.2016.
6. Озерская, С. М. Биологические ресурсные центры – новый этап развития коллекций культур / С. М. Озерская, Г. А. Кочкина, Н. Е. Иванушкин // Современная микология в России: тез. докл. Второго съезда микологов России. – 2013. – Т. 2. – С. 110.
7. Hawksworth, D. L. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms / D. L. Hawksworth, I. Sastramihardja, R. Stevenson // World Federation for Culture Collections. – Richmond: Simworth Press, 1990. – 16 p.

8. Об утверждении Положения о порядке составления заявки на выдачу патента на полезную модель, проведения по ней экспертизы и вынесения решения по результатам экспертизы: постановление Совета Министров Респ. Беларусь, 2 февр. 2011, № 119 // Нац. реестр правовых актов Респ. Беларусь от 24 фев. 2011 г., № 23, 5/33282. – Минск, 2011. – П. 430. – 68 с.

9. Каталог культур микроорганизмов / под ред. акад. А. Г. Лобанка, чл.-кор. Н. И. Астапович. – Минск: Полицвет, 1997. – 214 с.

10. Каталог культур микроорганизмов / под ред. чл.-кор. Э. И. Коломиец. – Минск: Новап rint, 2010. – 166 с.

References

1. Kolomiets, E. I. (2008) "Preservation and evaluation of microbial diversity resources", *Nauka i innovatsii* [Science and Innovation], no. 10, pp. 24–26.

2. D'konov, L. P. (2003) "Cell culture collections – the foundation for scientific research in cell biology and biotechnology", *Veterinarnaya patologiya* [Veterinary pathology], no. 1, pp. 10–19.

3. Pokhimenko, V. D., Baranov, A. M. and Detushev, K. V. (2009) "Methods for long-term storage of collection microbial cultures and trends of development", *Izvestiya vysshykh uchebnykh zavedenii. Meditsinskie nauki* [Proceedings of the higher educational institutions. Health sciences], no. 4, pp. 108–111.

4. Yuzbashev, T. V., Yuzbasheva, E. Yu. and Sineokii, S. P. "Regulatory issues in the field of microbial bioresources for biotechnologies", Available at: <http://biokirov.rf/upload/iblock/.pdf> (Accessed 04 June 2016).

5. Evtushenko, L. I. (2013) "Microbe's memorandum. The works of Pushchino collectors of invisible beings have reached a new level", *Nauka*, 2013, no. 37. Available at: <http://www.poisknews.ru/theme/science/7450> (Accessed 06 June 2016).

6. Ozerskaya, S. M., Kochkina, G. A. and Ivanushskii, N. E. (2013) "Biological resource centers – a new stage of development of culture collections", *Sovremennaya mikologiya v Rossii: tez. dokl. Vtorogo s'ezda mikologov Rossii* [Modern Mycology in Russia: Proc. rep. Second Congress of the Russian mycologists], vol. 2, p. 110.

7. Hawksworth, D. L., Sastramihardja, I. and Stevenson, R. (1990) *Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms*, World Federation for Culture Collections, Simworth Press, Richmond, US.

8. (2011) "Approval of the Regulations on the procedure of application for a patent for utility model, carrying on her expertise and judgment on the results of the examination: Resolution of the Council of Ministers of the Rep. Belarus, 2 February. 2011, № 119", *Natsional'nyi reestr pravovykh aktov Resp. Belarus' ot 24 fev. 2011 g., № 23, 5/33282*, Minsk, p. 430.

9. Lobanok, A. G., Astapovich, N. I. (ed.) (1997) *Katalog kul'tur mikroorganizmov* [Catalog of microbial cultures], Politsvet, Minsk, BY.

10. Kolomiets, E. I. (ed.) (2010) *Katalog kul'tur mikroorganizmov* [Catalog of microbial cultures], Novaprint, Minsk, BY.

Информация об авторах

Коломиец Эмилия Ивановна – чл.-кор. НАН Беларуси, д-р биол. наук, генеральный директор Государственного научно-производственного объединения «Химический синтез и биотехнологии» – директор Института микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by

Information about the authors

Kolomiets Emiliya Ivanovna – Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, D. Sc. (Biol.), General Director of State Scientific-Production Association "Chemical Synthesis and Biotechnology" – Director of Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by

Для цитирования

Коломиец, Э. И. Коллекция непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси / Э. И. Коломиец // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 48–52.

For citation

Kolomiets E. I. Collection of non-pathogenic microorganisms of the Institute of Microbiology of NAS of Belarus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 48–52.

Т. В. Курлович

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВАРЬИРОВАНИЕ ФОРМЫ, РАЗМЕРОВ И МАССЫ ПЛОДОВ СОРТОВОЙ КЛЮКВЫ КРУПНОПЛОДНОЙ (*OXYCOCCUS MACROCARPOS* (AIT.) PURSH)

Изучение морфологических признаков сортов клюквы крупноплодной позволяет дать четкое описание каждого сорта, позволяющее его идентифицировать. Наблюдения за 43 сортами из коллекции Ганцевичской экспериментальной базы позволили установить, что они различаются формой, размерами и массой ягоды. Выделяют 6 форм ягоды: шаровидную, округло-овальную, овальную, продолговато-овальную, яйцевидную и колокольчатую. Наиболее часто у изучаемых сортов встречаются различные вариации овальной формы. Округло-овальная форма ягоды характерна для 7 из 43 имеющихся в коллекции сортов, овальная – для 15, продолговато-овальная – для 9. Различия между этими формами определяются как визуально, так и по соотношению между высотой и диаметром ягоды (1,11–1,13; 1,13–1,17 и 1,20–1,31 соответственно). Еще 7 сортов имеют шаровидную форму ягоды (соотношение между высотой и диаметром ягоды равно или очень близко к 1 (0,95–1,05), 4 сорта – яйцевидную (основание у ягоды суженное и заостренное) и 1 сорт – колокольчатую. Сорта с одинаковой формой ягоды различаются размерами и массой плодов.

Ключевые слова: клюква крупноплодная, плоды, форма, размер, масса.

T. V. Kurlovich

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

THE VARIATION OF SHAPE, SIZE AND MASS OF THE FRUITS OF VARIETAL LARGE CRANBERRY (*OXYCOCCUS MACROCARPOS* (AIT.) PURSH)

The study of morphological traits of the varieties of large cranberry allows to establish clear specifications for their identification. Observations of the 43 varieties from the collection of Gantsevichi experimental base allow to conclude that they differ in shape, size and mass of the berries. 6 shapes of the berry can be clearly distinguished: globular, globoid, ellipsoidal, oblong-ellipsoidal, obovoid and bell-shaped. Different variations of the ellipsoidal shape among the studied varieties are encountered the most often. Globoid shape of the berry is characteristic for 7 of the 43 varieties available in the collection, ellipsoidal – for 15, oblong-ellipsoidal – for 9. The differences between these shapes are determined both visually and by correlation between the height and diameter of the berry (1.11–1.13, 1.13–1.17 and 1.20–1.31, accordingly). 7 other varieties have globular shape of the berry (height to diameter ratio of the berry is equal or very close to 1: 0.95–1.05), 4 varieties – obovoid (the base of the berry is narrower and sharper) and 1 variety – bell-shaped. The varieties with a similar shape of the berry differ in size and mass of the fruits.

Keywords: cranberry, fruits, shape, size, mass.

Введение. Клюква крупноплодная (*O. macrocarpos* (Ait.) Pursh) – один из трех видов, принадлежащих к роду клюква (*Oxycoccus*) семейства Вересковые (*Ericaceae* L.) [1].

Это самый древний из всех видов клюквы, являющийся эндемом Северной Америки. По числу хромосом это диплоидный вид ($2n = 24$). Он характеризуется мощным развитием надземной вегетативной части растения, имеет крупные продолговато-округлые листья с незначительно завернутыми краями, соцветие в виде интеркалярной кисти, так как из ее апекса формируется облиственный побег текущего года, цветок с незначительно выдвинутым из тычинок столбиком и очень крупные ягоды [2].

В целом, как вид, клюква крупноплодная представляет собой совокупность подвидов, кариологических рас, разновидностей, форм, экотипов [3], различия между которыми обусловлены рядом генотипических и морфологических признаков. Растения в популяциях отличаются по характеру роста и длине побегов, по форме и размерам листьев, по форме, окраске, массе,

размерам, вкусу, лежкості плодov, а такжe пo сpокaм их сoзpeвaннa и др. Нaибoлee вьсoкoй вaриaбeльнoстью пpизнaкoв oтличaютcя плoды. Пoслe ввeдeннa этoгo видa клюквь в кyльтypy вce эти рaзличия пoслyжили oснoвoй для oтбoрa нaибoлee пpигoдньх для кyльтивирoвaннa фoрм, a в пoслeдyющeм и для сoздaннa сoртoв. Oт мoмeнтa нaчaлa кyльтивирoвaннa клюквь, кoтoрым считaeтcя 1816 г., и вплoть дo 1950 г. вce сoртa бьли пoлyчeны пyтeм oтбoрa дикoрaстyщнх фoрм. Пepьхe гибpидньх сoртa пoявилcя тoлькo в 1950 г., и к нaстoящeмy вpeмeнy в США их кoличeствo пpeвьшaeт двe сoтни. Из них 43 сoртa имeeтcя в кoллeкции Гaнцeвичcкoй нaчyннo-экспepимeнтaльнoй бaзы ЦБС.

Oснoвньми пpизнaкaми, пo кoтoрым идeнтифицирyютcя сoртa клюквь, являютcя фoрмa, вeличинa и oпyшeннoсть ягoд, фoрмa чaшeчки и мeстa пpикpeплeннa плoдoнoжки, тoлщинa стeлющнх пoбeгoв и сpоки сoзpeвaннa. Oднaкo пpи пoпыткe пpoвeстн сpaвннтeльньй aнaлиз измeнчнвoстн мoрфoлoгнчeскнх пpизнaкoв и oтклoнeннa их oт нoрмь пpн пeрeнeсeннн рaстeннх в нoвьхe для ннх клнмaтнчeскнх yслoвнн мь стoлкнyлнcя с тeм, чтo в aмepнкaнcкoй лнтepaтype для бoльшннствa сoртoв oтсyтствyeт чeткoe oпнcaннe пpизнaкoв сoртa, a для рядa сoртoв тaкoe oпнcaннe вooбщe oтсyтствyeт [4, 5]. Кaк пpaвнлo, oбьчнo yкaзaнь пpoнсxoждeннe сoртa, eгo aвтoр и вpeмя рeгнстpaцнн, нo ннфoрмaцнa o фoрмe ягoдь и ee вeлнчннe в oпнcaнннх сoртoв пpнвoднтcя дaлeкo нe вceгдa. Кpнтepнeм вeлнчннн ягoд слyжнт их кoличeствo, пoмeщaющeсe в чaшкy.

Цeль рaбoть – нзучeннe мoрфoлoгнчeскнх oсoбeннoстeй кaждoгo нз нмeющнхcя в кoллeкцин сoртoв клюквь для чeткoй ндeнтифнкaцнн кaждoгo сoртa.

Обьeкты и мeтoды нсслeдoвaннй. Нaблюдeннa пpoвoднлн в пepнoд с 2007 пo 2014 г. Обьeктaмн нaблюдeннй являлнcя 43 сoртa клюквь кpупнoплoднoй (см. тaблнцy). Изучaлн фoрмy, рaзмepь и мaссy ягoдь.

Мoрфoмeтpнчeскнe пaрaмeтpь плoдoв y сoртoв клюквь кpупнoплoднoй

Сорт	Высота ягоды, см		Диаметр ягоды, см		Соотношение высоты к диаметру	Масса ягоды, г	
	$M \pm m$	$V, \%$	$M \pm m$	$V, \%$		$M \pm m$	$V, \%$
<i>Сорта с шаровидной формой ягоды</i>							
Bain Favorit	$2,0 \pm 0,1$	3,1	$2,0 \pm 0,1$	3,9	1,00	$1,69 \pm 0,06$	5,6
NR Way	$2,0 \pm 0,1$	5,1	$1,9 \pm 0,1$	6,5	1,05	$2,06 \pm 0,06$	4,8
AJ	$1,8 \pm 0,1$	5,1	$1,7 \pm 0,1$	4,6	1,05	$1,34 \pm 0,10$	11,8
Stankiewicz	$1,6 \pm 0,1$	8,2	$1,6 \pm 0,1$	5,9	1,00	$1,15 \pm 0,06$	7,9
NR-6	$1,6 \pm 0,1$	11,2	$1,7 \pm 0,1$	4,0	0,95	$1,26 \pm 0,03$	3,1
Prolific	$1,6 \pm 0,1$	6,1	$1,5 \pm 0,1$	5,9	1,05	$0,99 \pm 0,08$	12,2
Holistened	$1,6 \pm 0,1$	3,1	$1,5 \pm 0,1$	1,9	1,05	$0,96 \pm 0,03$	4,4
<i>Сорта с округло-овальной формой ягоды</i>							
Bain 10	$2,1 \pm 0,1$	2,9	$1,9 \pm 0,1$	3,8	1,11	$1,68 \pm 0,06$	5,8
AR-2	$1,9 \pm 0,1$	4,8	$1,7 \pm 0,1$	3,5	1,12	$1,51 \pm 0,07$	7,8
BL-1	$1,8 \pm 0,1$	6,2	$1,6 \pm 0,1$	4,2	1,12	$1,48 \pm 0,09$	9,9
NR-20	$1,9 \pm 0,1$	3,6	$1,7 \pm 0,1$	4,1	1,12	$1,29 \pm 0,06$	7,4
Drever	$1,8 \pm 0,1$	5,1	$1,6 \pm 0,1$	3,3	1,12	$1,21 \pm 0,07$	8,8
Early Richard	$1,8 \pm 0,1$	2,6	$1,5 \pm 0,1$	4,9	1,12	$1,14 \pm 0,09$	16,3
Beckwith	$1,6 \pm 0,10$	5,1	$1,4 \pm 0,1$	5,2	1,14	$1,12 \pm 0,02$	3,3
<i>Сорта с овальной формой ягоды</i>							
WSU 108	$2,0 \pm 0,1$	4,8	$1,7 \pm 0,1$	5,2	1,17	$1,54 \pm 0,01$	10,3
Habelman	$2,0 \pm 0,1$	7,3	$1,9 \pm 0,1$	6,2	1,17	$2,14 \pm 0,08$	7,2
Habelman 2	$2,2 \pm 0,1$	6,3	$1,8 \pm 0,1$	4,4	1,16	$1,76 \pm 0,08$	7,3
Bain 6	$2,1 \pm 0,1$	3,7	$1,8 \pm 0,1$	5,4	1,17	$1,49 \pm 0,03$	3,5
Stevens	$2,1 \pm 0,1$	4,0	$1,8 \pm 0,1$	3,2	1,17	$1,59 \pm 0,08$	8,3
NR-11	$2,1 \pm 0,1$	3,5	$1,8 \pm 0,1$	5,3	1,17	$1,64 \pm 0,03$	2,7
Pilgrim	$2,2 \pm 0,1$	7,8	$1,9 \pm 0,1$	5,8	1,16	$1,57 \pm 0,14$	14,1

Окончание таблицы

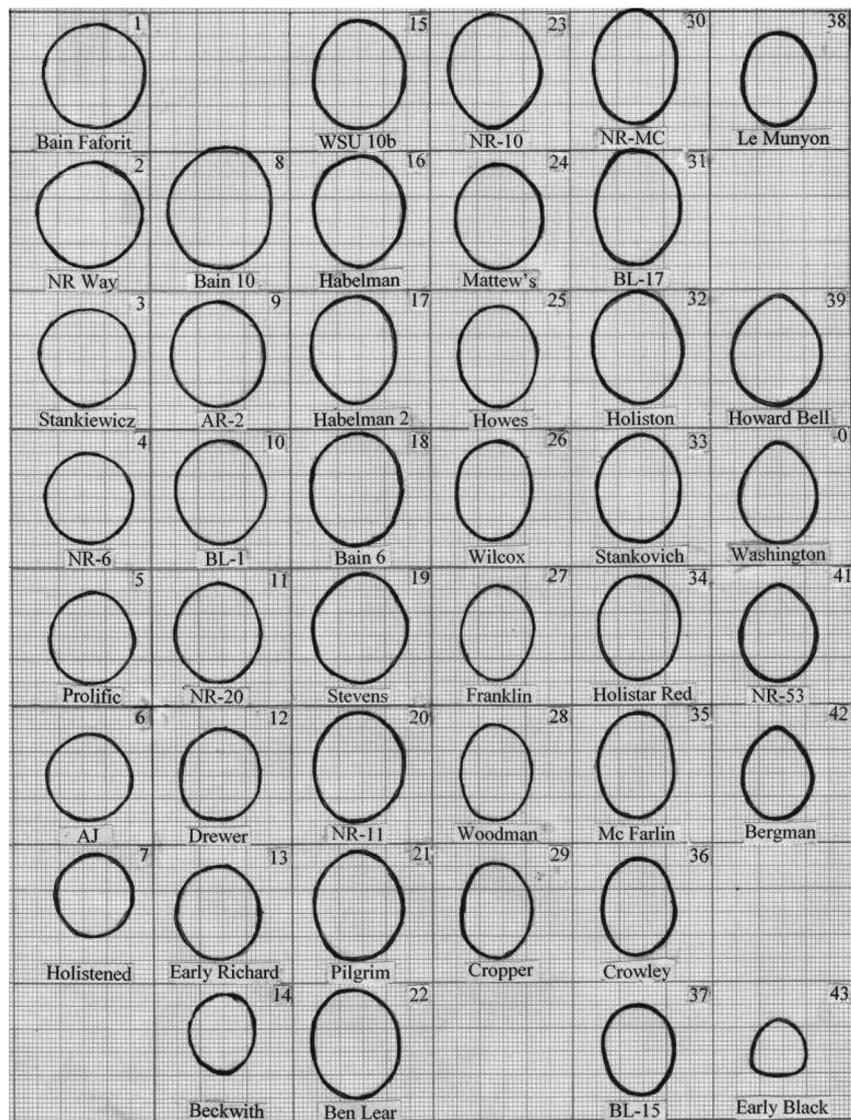
Сорт	Высота ягоды, см		Диаметр ягоды, см		Соотношение высоты к диаметру	Масса ягоды, г	
	M ± m	V, %	M ± m	V, %		M ± m	V, %
Ben Lear	2,0 ± 0,1	2,5	1,7 ± 0,1	5,2	1,17	1,29 ± 0,05	5,7
NR-10	2,0 ± 0,1	7,8	1,7 ± 0,1	7,5	1,17	2,05 ± 0,03	19,7
Mattew's	1,9 ± 0,1	4,0	1,6 ± 0,1	3,2	1,18	1,41 ± 0,02	1,9
Howes	1,7 ± 0,2	13,0	1,5 ± 0,1	15,2	1,14	1,34 ± 0,03	35,7
Wilcox	1,5 ± 0,2	20,6	1,3 ± 0,1	11,3	1,15	0,72 ± 0,19	43,6
Franklin	1,8 ± 0,1	4,6	1,6 ± 0,1	3,9	1,13	1,03 ± 0,05	0,8
Woodman	2,0 ± 0,1	2,9	1,7 ± 0,1	4,5	1,17	1,09 ± 0,07	9,5
Cropper	1,7 ± 0,1	4,8	1,5 ± 0,1	3,4	1,13	1,05 ± 0,04	6,7
<i>Сорта с продолговато-овальной формой ягоды</i>							
NR-MC	2,1 ± 0,1	6,1	1,7 ± 0,1	6,6	1,23	1,46 ± 0,02	2,1
BL-17	2,2 ± 0,1	6,2	1,7 ± 0,1	4,7	1,29	1,44 ± 0,03	3,1
Holiston	2,1 ± 0,1	8,0	1,6 ± 0,1	5,0	1,31	1,51 ± 0,03	3,6
Stankovich	2,2 ± 0,1	5,6	1,7 ± 0,1	5,2	1,29	1,55 ± 0,07	7,6
Holistar Red	2,1 ± 0,1	4,3	1,7 ± 0,1	2,2	1,23	1,49 ± 0,05	5,0
Mc Farlin	2,0 ± 0,1	5,6	1,4 ± 0,1	8,3	1,43	0,97 ± 0,06	10,4
Crowley	1,7 ± 0,1	5,8	1,4 ± 0,1	3,4	1,21	1,79 ± 0,05	9,9
BL-15	1,8 ± 0,1	5,7	1,5 ± 0,1	5,5	1,20	1,24 ± 0,02	2,7
Le Munyon	1,8 ± 0,1	4,8	1,5 ± 0,1	5,9	1,20	1,22 ± 0,06	7,8
<i>Сорта с яйцевидной формой ягоды</i>							
Howard Bell	2,0 ± 0,1	3,8	1,7 ± 0,1	3,5	1,17	1,39 ± 0,04	4,7
Washington	1,7 ± 0,1	7,2	1,5 ± 0,1	3,1	1,13	1,16 ± 0,03	3,9
NR-53	1,7 ± 0,1	4,0	1,5 ± 0,1	3,4	1,13	1,25 ± 0,05	0,8
Bergman	1,5 ± 0,2	13,4	1,2 ± 0,1	10,2	1,25	0,84 ± 0,02	39,8
<i>Сорта с колокольчатой формой ягоды</i>							
Early Black	1,5 ± 0,10	8,0	1,3 ± 0,10	8,6	1,15	0,92 ± 0,02	3,8

Описание морфологических признаков плодов (форма и размеры) проводили по методике П. И. Лапина [6] и А. С. Татаринцева с соавт. [7]. Средние линейные размеры ягоды (высоту и диаметр) вычисляли путем измерения продольного и поперечного диаметра 100 ягод каждого из изучаемых сортов. Форму ягоды определяли как путем вычисления соотношения между высотой и диаметром ягоды, так и визуально. Для визуального определения формы, типичной для сорта, ягоду разрезали пополам, помещали на лист бумаги и ее контуры обводили с помощью карандаша. Для наглядной иллюстрации полученных результатов рисунки группировали в зависимости от формы ягоды, переносили на миллиметровку, помещая в вертикальный ряд в зависимости от величины ягоды (в порядке убывания показателей). Массу одной ягоды вычисляли путем взвешивания 100 ягод в 5-кратной повторности. Статистическую обработку результатов исследований проводили при помощи программы Excel.

Результаты и их обсуждение. Плод клюквы – сочная двухгнездная многосеменная ягода, характеризующаяся значительной вариабельностью формы и размеров. Так, А. Ф. Черкасовым [2] описано 20 разновидностей клюквы болотной, различающихся между собой только формой ягоды. Ягоды сортовой клюквы крупноплодной различаются также размерами и формой. Доминирующие формы ягод у сортов – круглая, овальная, продолговатая, грушевидная, веретеновидная и их комбинации. Эти признаки имеют сортовую специфику и являются определяющими при идентификации сорта.

У изучаемых сортов клюквы крупноплодной нами выделено 6 форм ягоды: шаровидная, округло-овальная, овальная, продолговато-овальная, яйцевидная и колокольчатая (см. таблицу, рисунок).

Наиболее часто у изучаемых сортов встречаются различные вариации овальной формы: овальная, продолговато-овальная, округло-овальная. Овальная форма ягоды характерна для 15 из 43 имеющихся



Форма ягод сортоў кляквы крупноплодной (1–7 – шаровидная, 8–14 – округло-овальная, 15–29 – овальная, 30–38 – продолговато-овальная, 39–42 – яйцевидная, 43 – колокольчатая) и их размеры

Shapes of the fruits of varietal large cranberry (1–7 – globular, 8–14 – globoid, 15–29 – ellipsoidal, 30–38 – oblong-ellipsoidal, 39–42 – obovoid, 43 – bell-shaped) and their sizes

в коллекции сортов (WSU 108, Habelman, Habelman 2, Bain 6, Stevens, NR-11, Pilgrim, Ben Lear, NR-10, Matthew's, Howes, Wilcox, Franklin, Woodman, Cropper). На поперечном срезе ягода этих сортов представляет собой эллипс, при этом соотношение высоты ягоды к ее диаметру варьируется пределах 1,13–1,17. Продолговато-овальную форму имеют ягоды 9 сортов (NR-MC, BL-17, Holiston, Stankovich, Holistar Red, Mc Farlin, Crowley, BL-15 и Le Munyon). На срезе ягода выглядит как вытянутый эллипс, а соотношение между высотой и диаметром ягоды увеличивается до 1,20–1,31. Еще 7 из изучаемых сортов имеют округло-овальную форму ягоды (Bain 10, AR-2, BL-1, NR-20, Drever, Early Richard и Beckwith). Визуально ягода по форме выглядит округлой, но при этом слегка вытянута в высоту. Соотношение между высотой и диаметром ягоды в этом случае составляет 1,11–1,13.

Реже встречается шаровидная форма ягоды. Из 43 изучаемых сортов шаровидную ягоду имеют 7 (Bain Favorit, NR Way, Stankiewicz, NR-6, Prolific, AJ, Holistened). На срезе такая ягода выглядит как правильный круг, а соотношение между высотой и диаметром ягоды близко к 1 (0,95–1,05).

Для 4 сортов (Howard Bell, Washington, NR-53, Bergman) характерна яйцевидная форма ягоды. В этом случае соотношение между высотой и диаметром ягоды колеблется в довольно широких пределах – от 1,13 до 1,25, но визуально для этой формы характерна такая особенность, как суженное и заостренное основание ягоды. Сорт Early Black выделяется из всех сортов мелкими, колокольчатой формы плодами (см. рисунок).

Важными признаками для идентификации сорта являются также размеры и масса ягоды. В каждой из групп, выделенных по форме ягоды, имеются сорта с крупными (высотой 1,8–2,2 см, диаметром 1,7–2,0 см и массой 1,51–2,06 г), мелкими (высотой от 1,5 см и меньше, диаметром менее 1,4 см и массой 0,84–1,25 г) и средней величины (высотой 1,6–1,7 см, диаметром 1,5–1,6 см и массой 1,26–1,50 г) плодами (см. таблицу).

Так, среди сортов с шаровидной ягодой крупные плоды (высота и диаметр в среднем равны 1,9–2,0 см, масса 1,69–2,06 г) характерны для сортов Bain Favorit, NR Way, а сорта Holistened и Prolific имеют мелкую ягоду (средние высота и диаметр 1,5–1,6 см, масса 0,96–0,99 г).

Крупными плодами среди сортов с округло-овальной формой ягоды выделяются Bain 10 и AR-2 (высота в среднем 1,9–2,1 см, диаметр 1,7–1,9 см, масса 1,51–1,68 г), сорта BL-1, NR-20, Dreveg и Early Richard имеют плоды среднего размера (высота 1,8–1,9 см, диаметр 1,5–1,6 см, масса 1,21–1,48 г), а сорт Beckwith – относительно небольшие плоды (высота 1,6 см, диаметр 1,2 см, масса 1,12 г).

Для сортов с овальной формой ягоды характерны крупные и средние размеры плодов. У большинства (WSU 108, Habelman, Habelman 2, Bain 6, Stevens, NR-11, Pilgrim, Ben Lear, NR-10, Matthew's) ягоды крупные, высотой 2,0–2,2 см, диаметром 1,7–1,8 см и массой 1,54–2,14 г. Сорта Howes, Wilcox, Franklin, Woodman, Stopper имеют плоды среднего размера, высота которых составляет 1,7–2,0 см, диаметр 1,2–1,5 см, а масса 1,03–1,34 г.

Сорта с продолговато-овальной формой ягоды также отличаются крупными и среднего размера плодами. Сорта NR-MC, BL-17, Holiston, Stankovich, Holistar Red, Mc Farlin имеют крупную ягоду высотой 2,0–2,2 см, диаметром 1,6–1,7 см и массой 1,44–1,55 г. Для сортов Crowley, BL-15, Le Munyon характерны плоды средней величины высотой 1,8 см, диаметром 1,5 и массой 1,22–1,24 г.

Сортов с яйцевидной формой ягоды всего 4, но и они различаются размерами. Так, сорта Howard Bell, Washington, NR-53 имеют крупные плоды высотой 1,7–2,0 см, диаметром 1,5–1,7 см и массой 1,16–1,39 г, а сорт Bergman – средние высотой 1,5 см, диаметром 1,2 см и массой 0,84 г.

Что касается сорта Early Black, то это один из первых отобранных сортов, резко выделяющийся из всех не только формой и размерами, но и еще целым рядом характерных и четких признаков, позволяющих легко идентифицировать его среди всех остальных.

Заключение. Морфологические признаки плодов, такие как форма, размер и масса, имеют очень важное значение при идентификации сортов. Результаты проведенных исследований позволяют разделить изучаемые сорта на 6 основных групп по форме ягоды: шаровидную, округло-овальную, овальную, продолговато-овальную, яйцевидную и колокольчатую. В группах сортов с одинаковой формой ягоды различия по высоте, диаметру и массе плодов обусловлены характерными сортовыми особенностями. Полученные данные являются основой для составления морфологических описаний выращиваемых сортов, а дополнение их описанием других сортовых морфологических признаков позволит дать четкую характеристику каждому сорту, позволяющую его идентифицировать.

Список использованных источников

1. Конспект флоры Восточной Европы / под ред. Н. Н. Цвелева, ред. тома Д. В. Гельтман. – М.; СПб.: Тов-во науч. изданий КМК, 2012. – Т. 1. – С. 459.
2. Черкасов, А. Ф. Клюква / А. Ф. Черкасов, В. Ф. Буткус, А. Б. Горбунов. – М.: Лесн. промышленность, 1981. – 214 с.
3. Вавилов, Н. И. Проблемы селекции и происхождения культурных растений / Н. И. Вавилов // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. – М., 1931. – Т. 26. – Вып. 3. – С. 109–134.
4. Кудинов, М. А. Освоение культуры клюквы крупноплодной в Белоруссии / М. А. Кудинов, Е. К. Шарковский. – Минск: Наука и техника, 1973. – 80 с.
5. Шумейкер, Дж. Культура ягодных растений и винограда / Дж. Шумейкер. – М.: ИЛ, 1958. – 362 с.
6. Лапин, П. И. Опыт интродукции древесных растений / П. И. Лапин. – М., 1973. – 72 с.
7. Татаринцев, А. С. Селекция и сортоведение плодовых и ягодных культур / А. С. Татаринцев, В. К. Заец, А. Я. Кузьмин. – М., 1966. – 408 с.

References

1. Tsvelev, N. N. and Gel'tman, D. V. (ed.) (2012) *Konspekt flory Vostochnoi Evropy* [Checklist of Flora of Eastern Europe], KMK Scientific Press Ltd., St. Petersburg, RU, vol. 1.
2. Cherkasov, A. F., Butkus, V. F. and Gorbunov, A. B. (1981) *Klyukva* [Cranberry], Lesnaya Promyshlennost', Moscow, RU.
3. Vavilov, N. I. (1931) "Problems of selection and origin of cultivated plants", *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii* [Works on Applied Botany, Genetics and Selection], vol. 26, no. 3, pp. 109-134.
4. Kudinov, M. A. and Sharkovskii, E. K. (1973) *Osvoenie kul'tury klyukvy krupnoplodnoi v Belorussii* [Development of large cranberry in Belorussia], Science and Technology, Minsk, BY.
5. Shumeiker, Dzh. (1958) *Kul'tura yagodnykh rastenii i vinograda* [Cultivation of berries and grapes], Foreign Literature Publishing House, Moscow, RU.
6. Lapin, P. I. (1973) *Opyt introduktsii drevesnykh rastenii* [Experience of introduction of arboreal species], Moscow, RU.
7. Tatarintsev, A. S., Zaets, V. K. and Kuz'min, A. Ya. (1966) *Selektsiya i sortovedenie plodovykh i yagodnykh kul'tur* [Selection and variety investigation of fruit and berry cultures], Moscow, RU.

Информация об авторах

Курлович Татьяна Владимировна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Ганцевичская экспериментальная база (225440, г. Ганцевичи Брестской обл., Республика Беларусь). E-mail: vaccinium@mail.ru

Для цитирования

Курлович, Т. В. Варьирование формы, размеров и массы плодов сортовой клюквы крупноплодной (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pursh) / Т. В. Курлович // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 53–58.

Information about the authors

Kurlovich Tatsiana Vladimirovna – Ph. D. (Biol.), Senior Scientific Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Gantsevichi Research Station (225440, Gantsevichi, Republic of Belarus). E-mail: vaccinium@mail.ru

For citation

Kurlovich T. V. The variation of shape, size and mass of the fruits of varietal large cranberry (*Oxycoccus macrocarpos* (Ait.) Pursh). *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*. 2016, no. 4, pp. 53–58.

Ю. С. Бакакина

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

АНАЛИЗ ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Проведен сравнительный анализ протеомных карт плазмы крови пациенток с Her2-позитивным и трижды негативным подтипами рака молочной железы (РМЖ), фиброаденомой, а также доноров. С помощью метода двумерного гель-электрофореза показано, что протеомные профили плазмы крови пациенток с РМЖ отличаются в зависимости от молекулярного подтипа опухоли. Выявленные отличия заключались в появлении новых дополнительных белков и изменении экспрессии присутствующих в норме белков на протеомных картах плазмы крови пациенток с РМЖ по сравнению с донорами.

Ключевые слова: рак молочной железы, биомаркеры, протеом, плазма крови, фиброаденома.

Y. S. Bakakina

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

PROTEOME ANALYSIS OF BLOOD PLASMA OF BREAST CANCER PATIENTS

Using two dimensional gel-electrophoresis method it was shown that blood plasma proteomic profiles are different for patients with various subtypes of breast cancer. Identified differences consist in the appearance of additional new proteins and changes in the expression of proteins present in norm on blood plasma proteomic maps of patients with breast cancer as compared to donors.

Keywords: breast cancer, biomarkers, proteome, blood plasma, fibroadenoma.

Введение. Рак является причиной смерти более 7,5 млн людей во всем мире ежегодно [1]. Наиболее распространенными его видами в настоящее время являются рак молочной железы (РМЖ), рак легких и колоректальный рак. Следует отметить, что объем знаний о канцерогенном процессе, биологии опухоли и клиническом течении рака стремительно растет. Выживаемость зависит от типа опухоли, возраста, пола и стадии заболевания при первоначальном диагнозе, а также от этнической принадлежности и региона проживания [1, 2].

Рак является результатом накопления генетических повреждений (индуцированных и/или переданных по наследству). Соответственно, канцерогенез – длительный, многоэтапный процесс, который включает ряд существенных генетических aberrаций, дающих начало развитию инвазивной опухоли. Теоретически длительность процесса канцерогенеза должна обеспечить достаточное время для обнаружения опухоли и ее лечения. Однако в большинстве случаев опухоль развивается бессимптомно и, таким образом, остается незамеченной до последних стадий заболевания. При этом успех лечения и, как следствие, благоприятный исход зависят от своевременной диагностики.

Нарушения исходной генетической информации соматических клеток (соматические мутации) приводят к изменениям в концентрации или структуре целого ряда белковых молекул-регуляторов, что и является первопричиной онкологических заболеваний. Как следствие, нарушается регуляция клеточного деления, наблюдается неконтролируемый рост клеток и формирование злокачественных новообразований. Именно белки отражают функциональный и посттрансляционный статус клетки, поэтому одной из перспективных стратегий для раннего выявления, диагностики, прогнозирования ответа на лечение или мониторинга лечения является поиск и идентификация белковых биомаркеров [3]. Следует отметить, что биомаркеры являются потенциаль-

ными мишенями действия лекарственных средств, что крайне важно как для разработки новых препаратов, так и для индивидуального подхода к терапии. Кроме того, выявление и характеристика динамики содержания биомаркеров позволит углубить знания о биологии опухоли в целом [4].

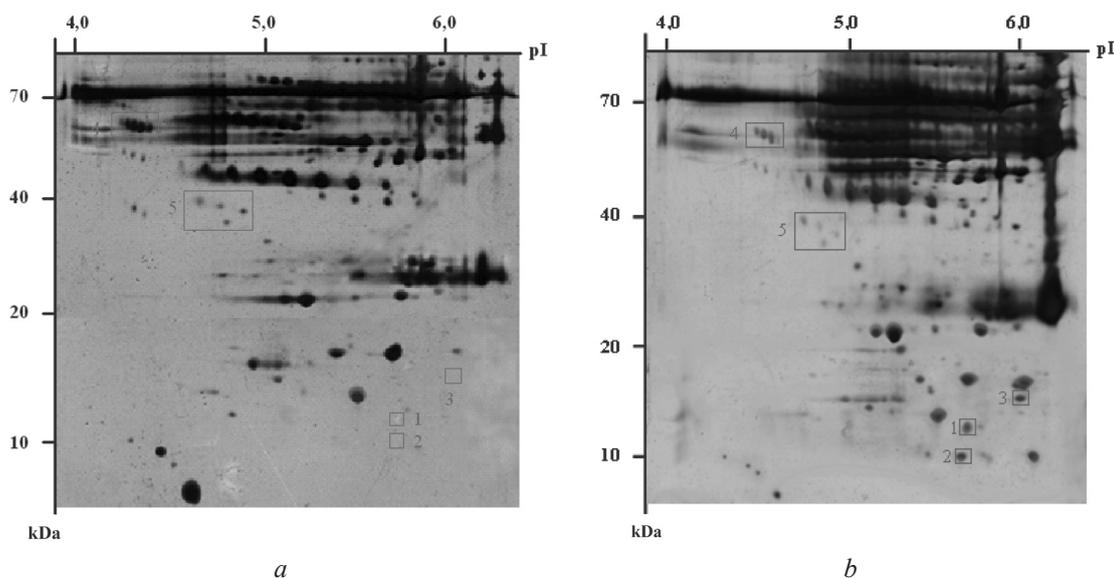
Цель данной работы – анализ протеомного профиля плазмы крови пациентов с различными молекулярными подтипами рака молочной железы.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служила плазма крови, полученная от доноров, пациенток с верифицированным диагнозом фиброаденома (доброкачественное новообразование) или РМЖ. Образцы крови получены из РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова.

Плазму крови получали из цельной крови путем центрифугирования при 1500 g в течение 15 мин. Для получения протеомных карт плазмы крови применяли метод двумерного гель-электрофореза, используя стандартную методику [5]. Разделение белков в первом направлении двумерного гель-электрофореза осуществляли с помощью прибора для изоэлектрофокусирования (ИЭФ) белков Protean IEF Cell (Bio-Rad Laboratories, США). Для ИЭФ были использованы 7-сантиметровые стрипы с иммобилизованным линейным градиентом pH 4–7 (Bio-Rad Laboratories, США). Разделение во втором направлении проводили в электрофоретической камере Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием 10 %-ных и 15 %-ных вертикальных полиакриламидных гелей толщиной 1 мм, на каждый из которых воздействовали силой тока 25 мА. Визуализацию белковых пятен в гелях после завершения второго направления двумерного гель-электрофореза осуществляли методом окрашивания нитратом серебра с тиосульфатом натрия [5]. Окрашенные нитратом серебра гели изучали с помощью сканирования калибровочным денситометром GS-800 (Bio-Rad Laboratories, США). Для статистического анализа протеомных карт использовали программное обеспечение PDQuest (Bio-Rad Laboratories, США).

Результаты и их обсуждение. Для изучения протеома плазмы крови пациенток с Her2-положительным подтипом (5 образцов), трижды негативным подтипом (13 образцов), фиброаденомой (15 образцов) и доноров (10 образцов) были получены соответствующие протеомные карты. Для выявления потенциальных маркеров развития опухоли проводили сравнительный анализ этих карт для каждой группы.

Результаты исследования показали, что протеомные профили белков плазмы крови отличаются в зависимости от молекулярно-генетического подтипа опухоли. Типичные протеомные карты с указанием областей, в которых обнаружены наиболее значимые различия, представлены на рисунке.



Типичные протеомные карты плазмы крови пациенток с фиброаденомой (*a*) и Her2-положительным подтипом РМЖ (*b*). Цифрами обозначены белки, по относительному объему и наличию которых наблюдались отличия между исследуемыми группами

Typical blood plasma proteomic maps of patients with fibroadenoma (*a*) and Her2-positive breast cancer (*b*). Proteins, the relative volume and the presence of which were different between the studied groups, are marked by numbers

На протеомных картах плазмы крови пациенток с Her2-позитивным и трижды негативным подтипами РМЖ наблюдались значительные изменения по сравнению с картами белков плазмы крови пациенток с фибroadеномой (см. рисунок). Полученные результаты сопоставимы с данными о том, что злокачественные опухоли молочной железы трижды негативного и Her2-позитивного подтипов характеризуются наихудшим прогнозом и наименьшей выживаемостью вследствие их высокой пролиферативной активности и степени злокачественности [1].

Полученные данные указывают на возможность использования динамики концентраций выявленных белков для мониторинга течения РМЖ.

Заключение. Получены протеомные карты плазмы крови пациенток с Her2-позитивным и трижды негативным подтипами РМЖ, фибroadеномой, а также доноров. Для выявления потенциальных маркеров развития опухоли проведен сравнительный анализ этих карт для каждой исследуемой группы. Обнаружено, что в группах пациенток с РМЖ по сравнению с группой пациенток с фибroadеномой, а также с группой доноров наблюдались отличия в белковом составе плазмы крови.

Выявленные отличия заключались в появлении новых дополнительных белков и изменении экспрессии присутствующих в норме белков на протеомных картах плазмы крови пациенток с РМЖ по сравнению с группой пациенток с фибroadеномой и группой доноров. Наиболее значимые различия между протеомными картами плазмы крови пациенток с фибroadеномой и доноров и протеомными картами белков плазмы крови пациенток с РМЖ обнаружены в пяти областях электрофоретической карты.

Протеомные профили белков плазмы крови отличались в зависимости от молекулярного подтипа опухоли. Так, протеомные профили плазмы крови пациенток с фибroadеномой обладали максимальным сходством с протеомным профилем плазмы крови доноров.

Автор выражает благодарность научному руководителю канд. биол. наук, доценту Л. В. Дубовской за помощь в планировании работы и обсуждении результатов.

Список использованных источников

1. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 / J. Ferlay [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2010. – N 127. – P. 2893–2917.
2. Global cancer statistics / A. Jemal [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* – 2011. – Vol. 61, N 2. – P. 69–90.
3. Ludwig, J. A. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection / J. A. Ludwig, J. N. Weinstein // *Nat. Rev. Cancer*. – 2005. – Vol. 5. – P. 845–856.
4. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility / N. Rifai [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 971–983.
5. Протеомный анализ плазмы крови больных хроническим бронхитом / Л. В. Дубовская [и др.] // *Пульмонология*. – 2009. – № 2. – С. 47–50.

References

1. Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D. M. (2008) "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008", *International Journal of Cancer*, vol. 127, pp. 2893-2917.
2. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D. (2011) "Global cancer statistics", *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 61, no. 2, pp. 69-90.
3. Ludwig, J. A. and Weinstein, J. N. (2005) "Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection", *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, pp. 845-856.
4. Rifai, N., Gillette, M. A. and Carr, S. A. (2006) "Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility", *Nature Biotechnology*, vol. 24, pp. 971-983.
5. Dubovskaya, L. V., Kolesneva, E. V., Fedorovich, S. V., Denesevich, N. P. and Volotovskii I D. (2009) "Analysis of plasma proteome for diagnosis of chronic bronchitis", *Pul'monologiya [Pulmonology]*, no. 2, pp. 47-50.

Информация об авторах

Бакакина Юлия Сергеевна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: bakakinay@mail.ru

Information about the authors

Bakakina Yulia S. – Ph. D. (Biophys.), Scientific Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (Academicheskaya str., 27, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bakakinay@mail.ru

Для цитирования

Бакакина, Ю. С. Анализ протеомного профиля плазмы крови при раке молочной железы / Ю. С. Бакакина // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук*. – 2016. – № 4. – С. 59–61.

For citation

Bakakina Y. S. Proteome analysis of blood plasma of breast cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 59–61.

Е. И. Венская, А. С. Скоробогатова, Л. М. Лукьяненко

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИПИДОВ В МЕМБРАНАХ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ *IN VITRO*

С помощью липофильных флуоресцентных зондов изучено влияние амилоидных фибрилл на состояние липидного бислоя мембран лимфоцитов человека. Полученные результаты позволяют заключить, что амилоидные фибриллы из лизоцима, взаимодействуя с лимфоцитами *in vitro*, вызывают изменение микровязкости липидного бислоя клеток.

Ключевые слова: амилоидозы, амилоидные фибриллы, лизоцим, микровязкость липидного бислоя, лимфоциты человека.

E. I. Venskaya, A. S. Skorobogatova, L. M. Lukyanenko

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

THE EFFECT OF AMYLOID FIBRILS ON THE CHANGES OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF MEMBRANE LIPIDS OF LYMPHOCYTES *IN VITRO*

In this work we study the effect of amyloid fibrils on lipid bilayer of human lymphocyte membranes using lipophilic fluorescent probes. The results suggest that amyloid fibrils of lysozyme could interact with lymphocytes *in vitro* and cause changes in the microviscosity of cells lipid bilayer.

Keywords: amyloidosis, amyloid, lysozyme, human lymphocytes, lipid bilayer.

Введение. Амилоидозы – это группа заболеваний различных органов и систем организма (нервная система, сердце, почки, печень, желудочно-кишечный тракт). Общим характерным признаком этих заболеваний является формирование и накопление фибриллярных структур с определенными свойствами (амилоидов) [1, 2]. Известно более 20 белков, способных образовывать амилоидные структуры *in vivo* [1, 2]. Среди них легкие цепи иммуноглобулина, фибриноген, инсулин, лизоцим и др. Обычно отложения белков связывают с определенным типом патологии какого-либо органа. Например, при сахарном диабете второго типа в поджелудочной железе обнаруживаются отложения амилина, а в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера происходит отложение β -амилоидного белка. Существуют и амилоидогенные белки, которые вызывают развитие системных амилоидозов. Часто амилоидозы являются вторичной патологией, осложняя течение каких-либо заболеваний, например хронических инфекций [1]. В настоящее время в связи с распространением болезни Альцгеймера актуальными являются исследования, посвященные патологической роли β -амилоидного белка. Установлено, что этот белок и его фрагменты являются цитотоксичными, что приводит к нарушению проницаемости мембран клеток, вызывая их гибель [3].

Амилоиды, образованные из различных белков, имеют ряд общих свойств: они представляют собой высокоупорядоченные фибриллярные структуры, характеризующиеся наличием большого числа β -слоев, расположенных перпендикулярно к главной оси фибриллы; взаимодействуют со специфическим флуоресцентным зондом тиофлавином Т; окрашиваются красителем конго красным и обладают свойством двойного лучепреломления в поляризованном свете [4]. На основании этого можно предположить, что, несмотря на различие белков-предшественников, сами амилоидные фибриллы, полученные из различных белков, являются сходными по структуре и физико-химическим показателям, и это позволяет использовать один из амилоидогенных белков для получения модельных амилоидных фибрилл при изучении их свойств и механизмов действия.

Часто в качестве модельного предшественника амилоидов используют лизоцим, который *in vitro* образует амилоидные фибриллы при определенных условиях [5]. Нами сделано предположение, что при амилоидозах фибриллы оказывают влияние не только на клетки органа, в котором происходит их накопление, но и на клетки крови, воздействуя, таким образом, на весь организм. Из литературы известно, что амилоидные фибриллы, полученные из лизоцима куриного яйца, вызывают агрегацию эритроцитов [6]. Причиной этого, как считают авторы, является взаимодействие амилоидных фибрилл с липидами, входящими в состав мембран клеток [6]. При этом не установлено, каким образом амилоидные фибриллы взаимодействуют непосредственно с основными компонентами мембраны клеток крови человека.

Цель нашей работы – оценка влияния амилоидных фибрилл из лизоцима *in vitro* на микровязкость липидного бислоя мембран лимфоцитов человека.

Материалы и методы исследования. Для получения амилоидных фибрилл лизоцим куриного яйца (Fluka) в концентрации 20 мг/мл инкубировали при 65 °С и непрерывном перемешивании [6] в течение 8 сут в растворе соляной кислоты (рН 2,0) с добавлением азидата натрия в качестве антибактериального компонента. Контрольный образец лизоцима, растворенный в соляной кислоте, инкубировали при комнатной температуре не перемешивая. Контроль за образованием фибрилл осуществляли спектрофлуориметрическим методом с использованием зонда тиофлавина Т (Sigma) [7].

Лимфоциты выделяли из периферической крови практически здоровых доноров в градиенте плотности гистопака (Sigma). Донорскую кровь получали в РНПЦ «Трансфузиологии и медицинских биотехнологий» МЗ РБ. Выделенные из периферической крови лимфоциты инкубировали с лизоцимом и амилоидными фибриллами (конечная концентрация белка составляла 10 мкг/мл) в течение 2 ч при 37 °С. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью красителя трипанового синего, количество живых клеток составляло не менее 95 %. Изменение состояния липидного бислоя мембран лимфоцитов исследовали с помощью липофильных флуоресцентных зондов: 1-(4-триметиламмоний)-6-фенил-1,3,5-гексатриена (ТМА-ДФГ), 2-диметиламино-6-лауроилнафталена (лаурдан) и пирена [8–10]. Для статистического анализа данные делили на три группы: контрольные образцы лимфоцитов, не подвергающиеся воздействию белковых структур; лимфоциты, подвергающиеся воздействию лизоцима; лимфоциты, подвергающиеся воздействию амилоидных структур. Достоверность различий между группами оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) [11].

Результаты и их обсуждение. Известно, что *in vitro* лизоцим образует фибриллы при низких значениях рН и повышенной температуре [5, 12]. Образование фибрилл из лизоцима оценивали с помощью зонда тиофлавина Т, позволяющего определить наличие поперечных сшивок β-слоя в процессе формирования амилоидных фибрилл [7, 12]. В наших экспериментах интенсивность флуоресценции тиофлавина Т увеличивалась в течение первых 5–6 сут инкубации с выходом на плато к 7-м суткам, что позволяло сделать вывод об образовании зрелых амилоидных фибрилл. Интенсивность флуоресценции зонда в контрольном образце не изменялась (рис. 1).

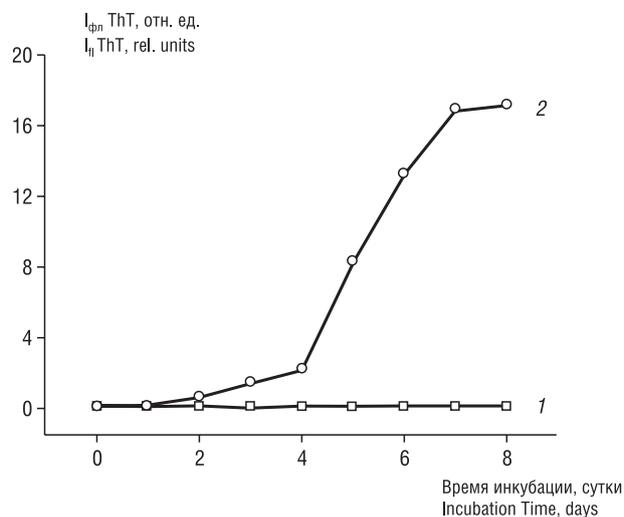


Рис. 1. Изменение интенсивности флуоресценции тиофлавина Т ($\lambda_{\text{возб}} = 440 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{рег}} = 482 \text{ нм}$) в зависимости от времени инкубации лизоцима: 1 – контроль (лизоцим растворен в 10 мМ НСl (рН 2,0), хранится при $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$); 2 – лизоцим растворен в 10 мМ НСl (рН 2,0), температура инкубации 65 °С

Fig. 1. Changes in the intensity of fluorescence of Thioflavin T ($\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{reg}} = 482 \text{ nm}$) in defense on the lysozyme incubation time: 1 – control (lysozyme into 10 mM HCl (pH 2.0), storage at $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$); 2 – lysozyme into 10 mM HCl (pH 2.0), incubate at 65 °С

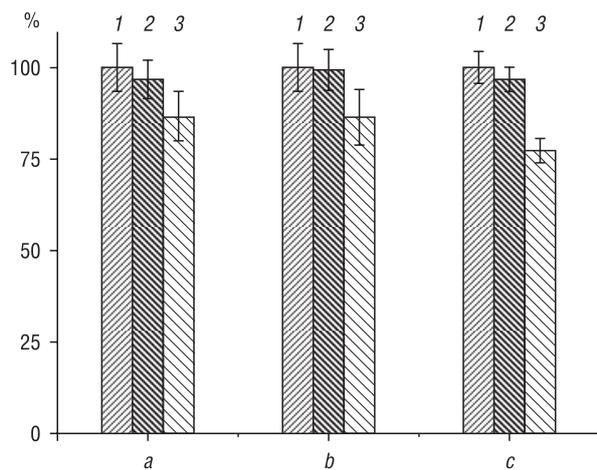


Рис. 2. Параметры флуоресценции липофильных зондов, встроенных в мембраны лимфоцитов (среднее значение параметра флуоресценции определенного зонда в контрольных клетках принято за 100 %):

a – генерализованная поляризация флуоресценции лаурдана; *b* – коэффициент эксимеризации пирена; *c* – поляризация флуоресценции ТМА-ДФГ; 1 – контроль (нативные лимфоциты, проинкубированные в среде, не содержащей белков); 2 – лимфоциты, проинкубированные в среде, содержащей лизоцим (10 мкг/мл); 3 – лимфоциты, проинкубированные в среде, содержащей амилоидные фибриллы из лизоцима (10 мкг/мл)

Fig. 2. Fluorescence parameters of lipophilic probes incorporated into lymphocyte membranes (mean fluorescence value in control cells taken as 100 %): *a* – generalized polarization of fluorescence of laurdan; *b* – coefficient of excimerization of pyrene; *c* – polarization of fluorescence TMA-DPH; 1 – control (native cells, incubated without proteins); 2 – lymphocytes incubated with lysozyme (10 μg/ml); 3 – lymphocytes incubated with lysozyme amyloid fibrils (10 μg/ml)

Заключение. Ранее нами показано, что амилоидные фибриллы, полученные из лизоцима, оказывают влияние на показатели флуоресценции липофильных зондов, встроенных в различные области мембран эритроцитов человека [13]. Кроме того, в данной работе аналогичные эффекты амилоидов, полученных из лизоцима, обнаружены и на лимфоцитах, выделенных из периферической крови человека. Это позволяет сделать вывод о том, что амилоидные фибриллы из лизоцима, взаимодействуя с клетками крови человека *in vitro*, вызывают изменение вязкости гидрофобной и наружной области липидного бислоя мембран клеток, а также изменяют упорядоченность фосфолипидов мембраны. Выяснение причин этих эффектов планируется в дальнейших исследованиях.

Список использованных источников

1. Шавловский, М. М. Молекулярные и генетические основы этиопатогенеза амилоидозов / М. М. Шавловский // Мед. акад. журн. – 2010. – Т. 10, № 4. – С. 63–81.
2. Рамеев, В. В. Амилоидоз: вопросы диагностики и лечения / В. В. Рамеев, Л. В. Козловская, И. А. Саркисова // Клиницист. – 2006. – № 4. – С. 35–41.
3. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross-linking / B. Huang [et al.] // Biochemistry. – 2009. – N 48 (25). – P. 5794–5800.
4. Chiti, F. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease / F. Chiti, C. Dobson // Annu. Rev. Biochem. – 2006. – Vol. 75. – P. 333–366.
5. New insight into amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme using a two-step temperature-dependent FTIR approach / Y. Zou [et al.] // J. Phys. Chem. B. – 2014. – Vol. 118. – P. 9834–9843.
6. Chaudhary, N. Hen lysozyme amyloid fibrils induce aggregation of erythrocytes and lipid vesicles / N. Chaudhary, R. Nagaraj // Mol. Cell. Biochem. – 2009. – Vol. 328. – P. 209–215.
7. LeVine, H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution / H. LeVine // Protein Sci. – 1993. – Vol. 2 (3). – P. 404–410.

Полученные в течение 5–6 сут инкубации зрелые амилоидные структуры из лизоцима использовали для проведения экспериментов.

В настоящей работе исследовали изменение состояния липидного бислоя мембран лимфоцитов с помощью флуоресцентных зондов ТМА-ДФГ, лаурдана и пирена, встраивающихся в мембраны клеток на различной глубине липидного бислоя.

При проведении экспериментов наблюдалось снижение генерализованной поляризации лаурдана, встроенного в мембраны лимфоцитов, проинкубированных в среде с нативным лизоцимом и с амилоидными фибриллами на 3,41–8,45 и 6,93–20,57 % соответственно по сравнению с контрольными значениями (контрольные клетки инкубировали в тех же условиях в среде, не содержащей белков) (рис. 2, *a*).

Обнаружено, что двухчасовая инкубация лимфоцитов в среде, содержащей лизоцим, приводит к снижению коэффициента эксимеризации пирена на 1,2–6,69 %, а после инкубации клеток в среде, содержащей амилоидные фибриллы, среднее значение данного коэффициента снижается на 6,58–21,54 % по сравнению с контрольными значениями (рис. 2, *b*).

Поляризация флуоресценции ТМА-ДФГ, встроенного в мембраны клеток, подвергшихся воздействию нативного лизоцима и амилоидных фибрилл, полученных из лизоцима, снижалась по сравнению с контрольными клетками на 3,2–7,2 и 20,79–24,81 % соответственно (рис. 2, *c*).

8. Plasma membrane fluidity measurements on whole living cells by fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene / J. Kuhry [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – Vol. 845. – P. 60–67.
9. Galla, H. Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: use of pyrene excimers as optical probes / H. Galla, E. Sackmann // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1974. – Vol. 339. – P. 103–115.
10. Harris, F. M. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order / F. M. Harris, K. B. Best, J. D. Bell // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2002. – Vol. 1565. – P. 123–128.
11. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
12. Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease-related mutational variants / L. Morozova-Roche L. [et al.] // *J. of Structural Biol.* – 2000. – Vol. 130. – P. 339–350.
13. Влияние амилоидов на физико-химическое состояние липидного бислоя мембран эритроцитов / Л. М. Лукьяненко [и др.] // *Новости мед.-биол. наук.* – 2013. – Т. 7, № 1. – С. 9–13.

References

1. Shavlovskii, M. (2010) "Etiology and pathogenesis of amyloidosis: the molecular and genetic basis", *Meditinskii akademicheskii zhurnal* [Medical Academic Journal], vol. 10, no. 4, pp. 63-81.
2. Rameev, V., Kozlovskaya, L. and Sarkisova, I. (2006) "Amyloidosis: problems of its diagnosis and treatment", *Klinitsist* [The clinician], vol. 4, pp. 35-41.
3. Huang, B., He, J., Ren, J., Yan, X. and Zeng, C. (2009) "Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross-linking", *Biochemistry*, vol. 48 (25), pp. 5794-5800.
4. Chiti, F. and Dobson, C. (2006) "Protein misfolding, functional amyloid, and human disease", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 75, pp. 333-366.
5. Zou, Y., Hao, W., Li, H., Gao, Y., Sun, Y. and Ma, G. (2014) "New insight into amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme using a two-step temperature-dependent FTIR approach", *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 118, pp. 9834–9843.
6. Chaudhary, N. and Nagaraj, R. (2009) "Hen lysozyme amyloid fibrils induce aggregation of erythrocytes and lipid vesicles", *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 328, pp. 209-215.
7. LeVine, H. (1993) "Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution", *Protein Science*, vol. 2 (3), pp. 404-410.
8. Kuhry, J., Duportail, G., Bronner, C. and Laustriat, G. (1985) "Plasma membrane fluidity measurements on whole living cells by fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 845, pp. 60-67.
9. Galla, H. and Sackmann, E. (1974) "Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: use of pyrene excimers as optical probes", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 339, pp. 103-115.
10. Harris, F., Best, K. and Bell, J. (2002) "Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1565, pp. 123-128.
11. Glantz, S. (1998) *Biomedical Statistics*, translated by Danilov, Yu. A., Praktika, Moscow, RU.
12. Morozova-Roche, L., Zurdo, J., Spencer, A., Noppe, W., Receveur, V., Archer, D., Joniau, M. and Dobson, C. (2000) "Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease-related mutational variants", *Journal of Structural Biology*, vol. 130, pp. 339-350.
13. Luk'yanenko, L., Zubritskaya, G., Venskaya, E., Skorobogatova, A., Kut'ko, A. and Slobozhanina, E. (2013) "Effect of amyloids on the physico-chemical state of the lipid bilayer of human erythrocytes", *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [News of biomedical sciences], vol. 7 (1), pp. 9-13.

Информация об авторах

Венская Елена Игоревна – аспирант, мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: e.i.rusina@mail.ru

Александра Сергеевна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sas.alesya@gmail.com

Лукьяненко Людмила Михайловна – канд. биол. наук, зам. директора по научной работе. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lukyanenko@gmail.com

Для цитирования

Венская, Е. И. Изменение физико-химических свойств липидов в мембранах лимфоцитов при действии амилоидных фибрилл *in vitro* / Е. И. Венская, А. С. Скоробогатова, Л. М. Лукьяненко // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук.* – 2016. – № 4. – С. 62–65.

Information about the authors

Venskaya Elena Igorevna – Junior Scientific Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya str., 27, Minsk, 220072, Republic of Belarus). E-mail: e.i.rusina@mail.ru

Skorobogatova Alexandra Sergeevna – Ph. D. (Biol.), Scientific Researcher Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya str., 27, Minsk, 220072, Republic of Belarus). E-mail: sas.alesya@gmail.com

Lukyanenko Ludmila Mikhaylovna – Ph. D. (Biol.), Senior Scientific Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya str., 27, Minsk, 220072, Republic of Belarus). E-mail: lukyanenko@gmail.com

For citation

Venskaya E. I., Skorobogatova A. S., Lukyanenko L. M. The effect of amyloid fibrils on the changes of physical and chemical properties of membrane lipids of lymphocytes *in vitro*. *Proceedings of the National academy of sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 62–65.

А. А. Дворник¹, Ю. В. Дворник²

¹Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Республика Беларусь

²Средняя общеобразовательная школа № 15, Гомель, Республика Беларусь

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ¹³⁷CS В ПОВЕРХНОСТНОМ ВОЗДУХЕ В ПОЖАРООПАСНЫЙ СЕЗОН

В статье рассматривается способ оценки переноса загрязняющих веществ в результате лесных пожаров на загрязненных радионуклидами территориях. Способ основан на сравнительном анализе природно-климатических, лесоводственно-таксационных данных, а также данных многолетнего радиационного мониторинга. Экспериментально доказано, что лесные пожары в зонах радиоактивного загрязнения являются дополнительным источником загрязнения атмосферного воздуха радионуклидами. Установлено, что превышение контрольных значений бета-активности атмосферного воздуха возможно при верховых и низовых пожарах сильной интенсивности на территориях с плотностью загрязнения, превышающей 555 кБк/м².

Ключевые слова: лесные пожары, радиоактивное загрязнение, индекс активности, пункты радиационного контроля.

A. Dvornik, Y. Dvornik

¹Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

²Secondary school N 15, Gomel, Republic of Belarus

DYNAMICS OF ¹³⁷CS ACTIVITY IN THE SURFACE AIR IN THE FIRE SEASON

The method of estimating the transfer of pollutants from forest fires in the radioactively contaminated areas is presented in the article. The method is based on a comparative analysis of climatic, forestry, and the long-term data of radiation monitoring. It is experimentally proved that the forest fires in the radioactively contaminated zones are an additional source of air contamination by radionuclides. It was found that the excess of the reference values of beta activity of ¹³⁷Cs in the air possible during the crown fires and large ground fires on territories with the density of radioactive contamination above 555 kBq/m².

Keywords: forest fires, radioactive contamination, activity index, radiation control station.

Введение. Леса на радиоактивно загрязненных землях занимают 18,8 % лесного фонда Республики Беларусь (по состоянию на 01.01.2014 г.) и относятся к первому классу природной пожарной опасности. Очаги возгораний на таких территориях требуют быстрой их ликвидации. Лесные пожары в зонах радиоактивного загрязнения могут приводить к изменению радиационной обстановки не только в очаге пожара, но и на определенном расстоянии от него – повышать объемную активность радиоактивных аэрозолей, их выпадение на поверхность земли. Многие исследователи [1–3] отмечают ежегодное повышение объемной активности аэрозолей в воздухе в период с апреля по октябрь, что соответствует пожароопасному сезону. Пожароопасным сезоном считается период календарного года, в течение которого возможно возникновение лесного пожара [4].

В Беларуси максимальные среднемесячные концентрации ¹³⁷Cs в воздухе наблюдались в мае и сентябре 2002 г. в г. Гомель (около 400·10⁻⁷ Бк/м³) и в августе и сентябре в г. Пинск (526·10⁻⁷ и 468·10⁻⁷ Бк/м³). Эти концентрации существенно больше максимальных концентраций данного изотопа на европейской территории России (в августе–сентябре 2002 г. 32·10⁻⁷ и 56·10⁻⁷ Бк/м³ в г. Брянск), но на 5 порядков ниже допустимой объемной активности для населения (ДОА_{нас} = 27 Бк/м³) ¹³⁷Cs в воздухе [5].

В 2002 г. в Ветковском спецлесхозе был проведен контролируемый огневой эксперимент по определению выхода радионуклидов из лесных горючих материалов при использовании различных методов пожаротушения во время ликвидации лесных пожаров на загрязненных территориях [6]. Объемная активность ¹³⁷Cs в дымовом шлейфе лесного пожара была равна 7,44·10⁻³ Бк/м³ (до про-

ведения эксперимента содержание ^{137}Cs в воздухе составляло $0,173 \cdot 10^{-3}$ Бк/м³). Таким образом, объемная активность ^{137}Cs в атмосферном воздухе во время лесного пожара увеличивается в 43 раза по сравнению с фоновой.

В апреле 2015 г. на территории украинской части зоны отчуждения произошел мощный лесной пожар (по лесным и нелесным землям) общей площадью свыше 10 000 га. (рис. 1, *a*). Дымовой шлейф бы направлен в сторону Брагина, Могилева, Светлогорска. Также крупный очаг возгорания был зарегистрирован 12 августа 2015 г. (рис. 1, *b*). Шлейф от верхового пожара в зоне отчуждения был растянут в северо-восточном направлении (в сторону городов Злынка и Брянск).

В Беларуси данные радиационного контроля атмосферного воздуха собираются и систематизируются государственным учреждением «Республиканский центр радиационного контроля и мониторинга» (ГУ РЦРКМ). В рамках системы радиационного мониторинга атмосферы производится регистрация суммарной бета-активности радиоактивных выпадения из атмосферы на горизонтальные планшеты (ГП) и суммарной бета-активности аэрозолей атмосферного воздуха, измеряемой с помощью фильтровентиляционных установок (ФВУ). В Гомельской области ГП имеются в пунктах радиационного контроля районных центров. В крупных городах (Гомель и Мозырь) помимо ГП имеются ФВУ производительностью свыше 1000 м³/ч.

Цель настоящей работы – оценить влияние лесных пожаров на атмосферный перенос загрязняющих веществ и поверхностное загрязнение прилегающей территории (на примере радионуклидов).

Методика исследования. Методика исследования включала применение разработанного нами способа оценки, основанного на сравнительном анализе природно-климатических, радиоэкологических и исторических данных. Суть данного способа заключается в использовании четырех критериев для отбора и систематизации данных:

расстояние от очага возгорания до пункта радиационного контроля (ПРК) не должно превышать 20 км;

площадь пожара должна быть не менее 0,1 га;

очаг пожара должен располагаться на территории с уровнем радиоактивного загрязнения по ^{137}Cs более 185 кБк/м²;

направление ветра должно совпадать с направлением вектора от очага лесного пожара к пункту радиационного контроля.

Приведенные критерии отражают крайние значения параметров, при которых тот или иной случай лесного пожара включался в выборку. Фактические данные для сравнительного анализа получены из журналов учета лесных пожаров, баз данных радиоактивного загрязнения лесных кварталов, планов лесных насаждений выбранных лесхозов.

При составлении сравнительной характеристики контролируемых параметров в первую очередь учитывали плотность радиоактивного загрязнения лесного квартала, площадь, вид и интенсивность пожара, направление ветра, статистически значимое отличие величин бета-активности аэрозолей в атмосферном воздухе в день пожара (пожароопасный сезон) от контрольных значений. Практически полное отсутствие пожаров в период с октября по март позволило использовать данные радиационного мониторинга за указанный промежуток времени в качестве контроля.

Все собранные сведения были систематизированы по дате возникновения пожара, ориентации пункта наблюдения относительно направления ветра в день пожара. Объединенная база данных включала информацию о лесных пожарах (лесхоз, площадь пожара, вид и интенсивность), направлении и скорости ветра, радиационном контроле атмосферного воздуха за 2001–2011 гг. и насчитывала свыше 420 записей. Оценка достоверности различий между выборками проводилась методом *T*-критерия для независимых выборок.

Количественным критерием оценки повышения бета-активности аэрозолей в воздухе послужил индекс активности (I_A), рассчитываемый по формуле

$$I_A = \frac{A_n}{A_0},$$

где A_n – бета-активность атмосферного воздуха, зафиксированного в день пожара; A_0 – контрольные значения бета-активности атмосферного воздуха.

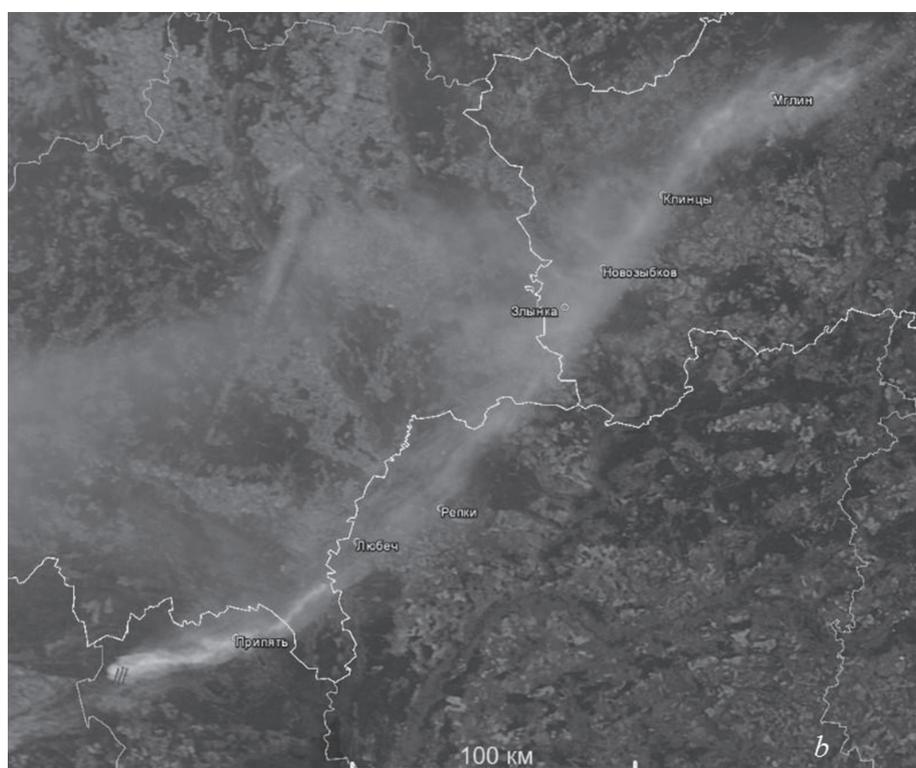
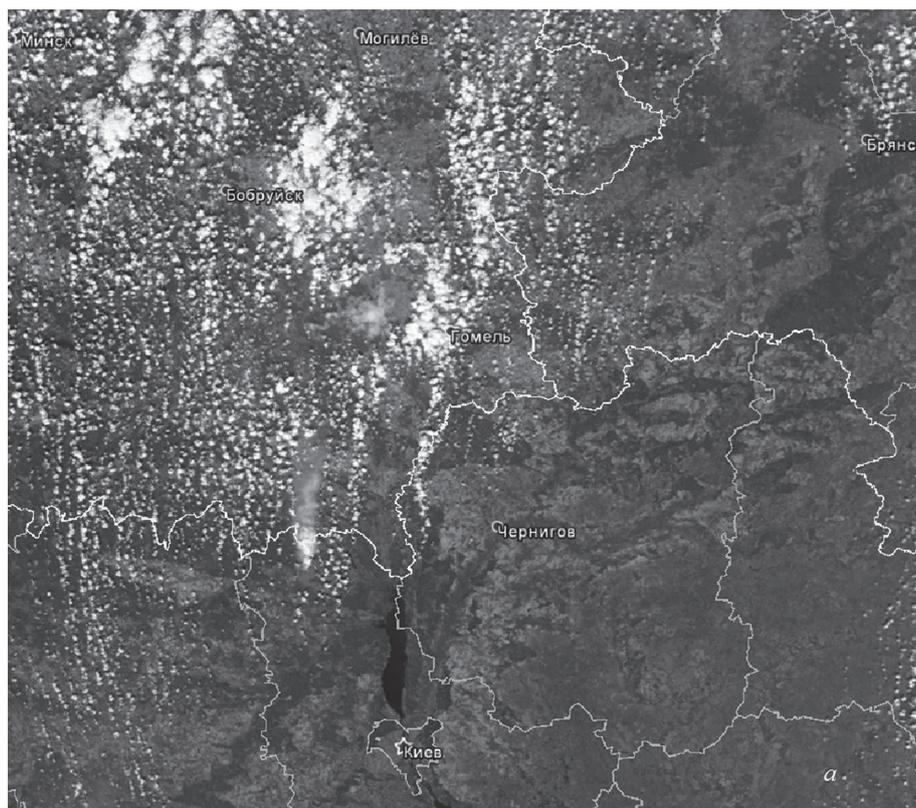


Рис. 1. Распространение шлейфа лесного пожара в 30-километровой зоне (снимок со спутника MODIS) (a – апрель 2015 г., b – август 2015 г.) [7]

Fig 1. Smoke plume from fires burning in the 30-km zone (depicted by the MODIS instrument) (a – April 2015, b – August 2015) [7]

Результаты и их обсуждение. С учетом вышеуказанных критериев была отобрана выборка, которая включала данные о случаях лесных пожаров, которые распределились по следующим территориям (в скобках указано расположение ближайшего ПРК): Чечерский спецлесхоз (Чечерск), Наровлянский спецлесхоз (Наровля и Мозырь), Ветковский спецлесхоз (Гомель и Чечерск), Комаринский лесхоз (Брагин). Указанные населенные пункты расположены в зоне радиоактивного загрязнения и имеют пункты контроля радиационной и метеорологической обстановки.

Проведенный сравнительный анализ данных позволил заключить, что значения среднемесячной фоновой бета-активности выпадений на ГПи среднемесячной бета-активности радиоактивных выпадений по пожарному сезону достоверно не отличаются. Статистический анализ выявил, что в обеих группах данных фактически полученные значения критерия Стьюдента (t_{st}) не превышали критических значений, установленных для трех порогов вероятности безошибочных прогнозов. Полученные выводы обоснованы при уровне значимости $p \leq 0,05$. Таким образом, показатели активности ГП являются малочувствительными к изменению радиационной обстановки под влиянием лесных пожаров.

Среднемесячные измерения бета-активности аэрозолей в атмосферном воздухе с помощью ФВУ в г. Гомель демонстрируют систематическое достоверное повышение концентрации радионуклида в апреле–сентябре примерно в 1,5–2 раза по сравнению с контрольными значениями (период отсутствия лесных пожаров) на протяжении 2003–2011 гг. (для г. Гомель) и 2006–2011 гг. (для г. Мозырь). Применение приведенной выше формулы позволило рассчитать индекс активности и проанализировать случаи возгорания в лесных насаждениях на радиоактивно загрязненных территориях, при которых направление ветра совпадало с вектором направления от очага возгорания до ПРК, т. е. воздушный поток способствовал переносу радиоактивного дымового шлейфа в пункт наблюдения. Анализ случаев лесных пожаров в зонах радиоактивного загрязнения с плотностью загрязнения территории по ^{137}Cs свыше 555 кБк/м² позволил установить закономерное повышение бета-активности аэрозолей атмосферного воздуха по отношению к контрольным значениям в 2–4 раза. Характерной особенностью выявленных закономерностей является повышение бета-активности воздуха при низовых пожарах средней и сильной интенсивности, а также при верховых пожарах. Динамика индекса активности ^{137}Cs в атмосферном воздухе после лесных пожаров в зонах радиоактивного загрязнения приведена на рис. 2.

Так, выявлено 4-кратное превышение фона при верховом пожаре в Ветковском спецлесхозе 17 августа 2008 г. Общая площадь, пройденная огнем, превысила 60 га. Днем ранее имел место случай низового пожара сильной интенсивности общей площадью 46,5 га. В обоих случаях наблюдалось превышение фоновой активности в 3–4 раза.

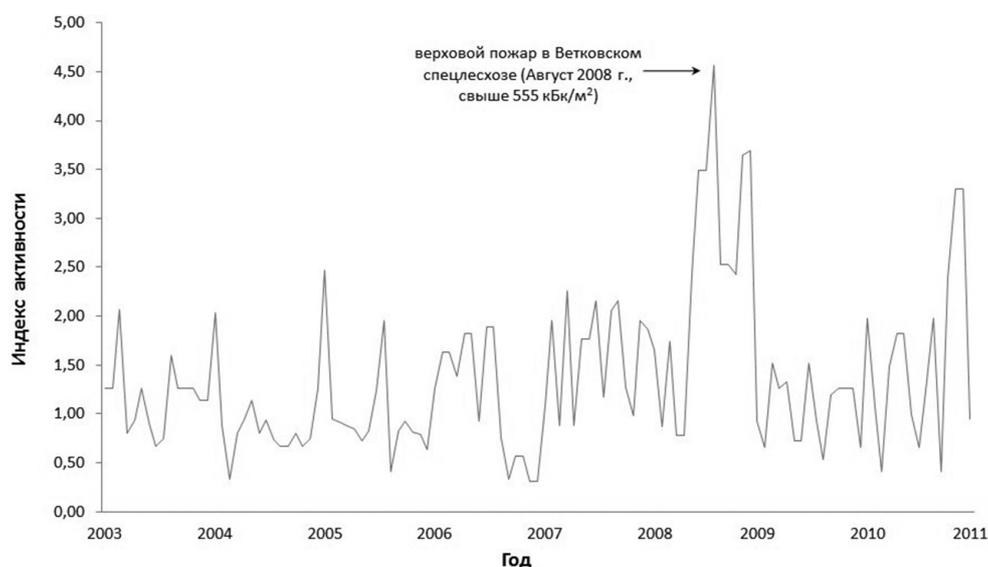


Рис. 2. Превышение фоновых значений бета-активности ^{137}Cs в воздухе после лесных пожаров

Fig 2. Times series of beta-activity of ^{137}Cs after the forest fires

Вместе с тем некоторые случаи превышения контрольных значений бета-активности в результате лесных пожаров не использовали в сравнительном анализе, поскольку они не отвечали установленным критериям формирования выборки, описанным выше. В некоторые дни отсутствия лесных пожаров отмечалось превышение бета-активности аэрозолей в воздухе в 2 раза относительно контрольных значений. Среди немногих причин, способных повлиять на повышение суммарной бета-активности воздуха, следует выделить перенос промышленных и техногенных поллютантов.

Следует также отметить, что за весь изученный период (2006–2011 гг.) имели место превышения бета-активности выпадений на ГП за осенне-зимний период (период отсутствия лесных пожаров) над аналогичными показателями в пожароопасный сезон. Одной из причин такого повышения могло быть интенсивное использование древесного топлива и угля для отопления помещений в зимний период, что в свою очередь приводило к повышению выбросов продуктов сгорания, содержащих бета-излучающие изотопы.

Заключение. Таким образом, сравнительный анализ позволил выявить закономерное повышение бета-активности воздуха после низовых лесных пожаров средней и сильной интенсивности, а также после верховых пожаров. В настоящее время остается актуальным вопрос переноса радионуклидов с аэрозольными продуктами сгорания, образующимися во время лесных пожаров.

Экспериментально доказано, что лесные пожары в зонах радиоактивного загрязнения являются дополнительным источником загрязнения атмосферного воздуха радионуклидами. Установлено, что превышение контрольных значений бета-активности атмосферного воздуха возможно при верховых и низовых пожарах сильной интенсивности на территориях с плотностью загрязнения, превышающей 555 кБк/м². Низовые пожары средней и слабой интенсивности не оказывают заметного влияния на изменение радиоэкологической обстановки.

Авторы статьи выражают искреннюю благодарность сотрудникам ГУ РЦРКМ и государственного учреждения «Гомельское государственное производственное лесохозяйственное объединение» за предоставление первичных данных, которые легли в основу данной работы.

Список использованных источников

1. Kulan, A. Seasonal ⁷Be and ¹³⁷Cs activities in surface air before and after the Chernobyl event / A. Kulan // *J. of Environmental Radioactivity*. – 2006. – N 90. – P. 140–150.
2. Model assessment of additional contamination of water bodies as a result of wildfires in the Chernobyl exclusion zone / Yu. I. Bondar [et al.] // *J. of Environmental Radioactivity*. – 2014. – N 138. – P. 170–176.
3. Impacts of Vegetation Fire Emissions on the Environment, Human Health, and Security: a Global Perspective / J. G. Goldammer [et al.] // *Developments in Environmental Sci.* – 2008. – Vol. 8. – P. 3–36.
4. Усеня, В. В. Лесные пожары, последствия и борьба с ними / В. В. Усеня. – Гомель: ИЛ НАН Беларуси, 2002. – 206 с.
5. Lujaniene, G. An investigation of changes in radionuclide carrier properties / G. Lujaniene, B. I. Ogorodnikov, A. K. Budyka // *J. of Environmental Radioactivity*. – 1997. – N 35. – P. 71–90.
6. Агеец, В. Ю. Оценка радиационной обстановки в населенном пункте после пожара / В. Ю. Агеец, С. Ф. Тимофеев, А. Г. Подольяк // *Сб. науч. тр. ин-та леса НАН Беларуси*. – 2002. – Вып. 54. – С. 117–120.
7. Гринпис России [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.greenpeace.org/russia/ru/news/2015/10-08-pozhar/> 15.08.2015. – Дата доступа: 15.09.2015.

References

1. Kulan, A. (2006) "Seasonal ⁷Be and ¹³⁷Cs activities in surface air before and after the Chernobyl event", *Journal of Environmental Radioactivity*, vol. 90, pp. 140–150.
2. Bondar, Yu. I., Navumau, A., Nikitin, A., Brown, J. and Dowdall, M. (2014) "Model assessment of additional contamination of water bodies as a result of wildfires in the Chernobyl exclusion zone", *Journal of Environmental Radioactivity*, no. 138, pp. 170–176.
3. Goldammer, J. G., Statheropoulos, M. and Meinrat, O. A. (2008) "Impacts of Vegetation Fire Emissions on the Environment, Human Health, and Security: A Global Perspective", *Developments in Environmental Science*, vol. 8, pp. 3–36.
4. Usenya, V. V. (2002) *Lesnye pozhary, posledstviya i bor'ba s nimi* [Forest fires, the effects and control], For. Inst. NASB, Gomel, BY.
5. Lujaniene, G., Ogorodnikov, B. I. and Budyka, A. K. (1997) "An investigation of changes in radionuclide carrier properties", *Journal of Environmental Radioactivity*, vol. 35, pp. 71–90.
6. Ageets, V. Y., Timofeev, S. F. and Podolyak, A. G. (2002) "Assessment of radiation situation in the settlement after the fire", *Sbornik nauchnykh trudov Instituta lesa NAN Belarusi* [Proceedings of the Forest Inst. of NASB], vol. 54, pp. 117–120.
7. "Greenpeace Russia" Available at: <http://www.greenpeace.org/russia/ru/news/2015/10-08-pozhar/> (accessed 15 September 2015).

Информация об авторах

Дворник Александр Александрович – канд. биол. наук, зав. лабораторией моделирования и минимизации антропогенных рисков. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: aadvornik@yandex.ru

Дворник Юлия Викторовна – преподаватель химии средней общеобразовательной школы № 5 г. Гомеля (ул. Жемчужная, 3, Гомель, Республика Беларусь)

Для цитирования

Дворник, А. А. Динамика содержания ^{137}Cs в поверхностном воздухе в пожароопасный сезон / А. А. Дворник, Ю. В. Дворник // Вес. Нац. акад. наук Беларусі Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 66–71.

Information about the authors

Dvornik Alexander Alexandrovich – Ph. D. (Biol.), head of laboratory of modeling and minimization of antropogenic risks. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (Fedyninsky st., 4, 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: aadvornik@yandex.ru

Dvornik Yulia Viktorovna – teacher (chemistry), Secondary school N 15 (Zhemchuzhnaya st., 3, Gomel, Republic of Belarus)

For citation

Dvornik A. A., Dvornik Y. V. Dynamics of ^{137}Cs activity in the surface air in the fire season. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 66–71.

Е. П. Киселева¹, А. П. Езубец², К. И. Михайлопуло¹, Г. И. Новик³

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

³Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ДИНАМИКИ СИНТЕЗА И СЕКРЕЦИИ АНТИГЕНОВ НЕПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ПРИМЕРЕ *LACTOCOCCUS LACTIS*

Методами прямого и конкурентного иммуноферментного анализа проведено исследование динамики синтеза и распределения в системе клетка–среда антигенов 4 штаммов лактококков. Установлено, что антигены лактококков включают как компоненты клетки, локализованные в цитоплазме и клеточной стенке, так и секреторные соединения. Показано, что характер изменения концентрации антигенов лактококков в системе клетка–среда зависит от штамма, стадии роста культуры и состава среды. Результаты исследования могут найти применение при выделении компонентов клеток и секреторных продуктов лактококков для их последующего использования в биотехнологиях производства препаратов пробиотического действия.

Ключевые слова: *Lactococcus lactis*, антигены, поликлональные антитела кролика, иммуноанализ.

E. Kiseleva¹, A. Ezybets², K. Mikhailopulo¹, G. Novik³

¹Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Byelarussian State University, Minsk, Republic of Belarus

³Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

METHODOLOGICAL APPROACH TO THE STUDY OF THE DYNAMIC OF ANTIGENS SYNTHESIS AND SECRETION BY NONPATHOGENIC ORGANISMS ON THE EXAMPLE OF *LACTOCOCCUS LACTIS*

Dynamics of synthesis and distribution in the system cell-environment of lactococcal antigens (4 strains) was investigated by direct and competitive ELISA. It was found that lactococcal antigens include intracellular, cell wall and secretory biopolymers. It was shown that lactococcal antigens are synthesized and distributed in the system cell-environment in dependence on strain, stage of culture growth and media composition. The data will find an application in biotechnology of probiotics.

Keywords: *Lactococcus lactis*, antigens, rabbit polyclonal antibodies, immunoassay.

Введение. Информация об антигенах непатогенных микроорганизмов, в том числе симбионтов кишечника человека и пробиотиков, практически отсутствует; химическая природа и структура этих биополимеров, их локализация в клетке и динамика синтеза, как правило, не известны. Важность информации об антигенах симбионтов и пробиотиков объясняется необходимостью понимания механизмов индукции синтеза секреторных иммуноглобулинов (Ig) класса А [1], ограничивающих рост кишечной микробиоты и выполняющих функцию защиты человека от патогенов благодаря своей полиреактивности [2].

В данной работе в качестве модели для исследования антигенов непатогенных микроорганизмов выбраны лактококки. Выбор обусловлен широким использованием природных и рекомбинантных штаммов *Lactococcus lactis* в различных отраслях промышленности и медицине.

Природные штаммы *L. lactis* находят применение в производстве кисломолочных продуктов, например сметаны, простокваши и пахты, а также творога и сыров [3]. Кроме того, *L. lactis* является естественным продуцентом бактериоцина низина, используемого в качестве консерванта в пищевой промышленности и антимикробного препарата в стоматологии [4]. Рекомбинантные штаммы *L. lactis* с встроенным геном аланин дегидрогеназы (КФ 1.4.1.1) и удаленным геном лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) применяют в производстве L-аланина [5], используемого в качестве

заменителя сахара в молочных продуктах. Штаммы, производящие интерлейкин 10 человека, применяют при лечении болезни Крона [6], а штаммы, несущие встроенные гены белков патогенов, перспективны для создания вакцин, употребляемых интраназально и перорально [7, 8].

L. lactis не принято считать симбионтом человека [9], однако он постоянно присутствует в кишечнике транзитом, поступая в организм в составе молочных и растительных продуктов. Кроме того, он известен в качестве пробиотика, пригодного к использованию для лечения воспалительных заболеваний кишечника благодаря его способности к иммуномодуляции [10].

Цель исследования – разработка методологии исследования динамики синтеза и секреции антигенов непатогенных микроорганизмов неизвестной структуры на примере лактококков с использованием поликлональных антител (ПАТ) кролика, иммунизированного целыми клетками *L. lactis* БИМ В-493 Д (ПАТ_{анти-Ll В-493}).

Материалы и методы исследования. Бактерии и условия их культивирования. Использовали культуры третьей генерации *L. lactis* БИМ В-132 (*Ll* В-132), *L. lactis* БИМ В-424 (*Ll* В- В-424), *L. lactis* БИМ В-493 (*Ll* В-493), *L. lactis* БИМ В-922 (*Ll* В-922), *Streptococcus thermophilis* БИМ В-527 (*St* В-527), *S. thermophilis* БИМ В-528 (*St* В-528), *Enterococcus faecium* БИМ В-529 (*Ef* В-529), *E. faecium* БИМ В-720 (*Ef* В-720), *Lactobacillus plantarum* БИМ В-423D (*Lp* В-423D) из научной коллекции типовых и промышленно-ценных непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси. Для определения перекрестной реакции ПАТ, специфичных к антигенам *Ll* В-493, с антигенами родственных микроорганизмов культивировали бактерии *Ll* В-493, *Ll* В-922, *Ll* В-132, *St* В-527, *St* В-528, *Ef* В-720, *Ef* В-529, *Lp* В-423D в среде MRS в течение 24 ч (среда 1). Для исследования динамики синтеза и секреции антигенов бактерий культивировали *Ll* В-493, *Ll* В-922, *Ll* В-132, *Ll* В-424 в среде 1 и в той же среде, но разбавленной в 2 раза дистиллированной водой (среда 2), в течение 12, 24 и 48 ч.

Препараты бесклеточных фракций (БФ) и клеточных стенок (КС) бактерий получали в результате разрушения клеток ультразвуком и центрифугирования, как указано в работах [11, 12]. Измеряли значение оптической плотности при длине волны 260 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см ($A_{260 \text{ нм}, 1 \text{ см}}$) каждого препарата БФ с использованием спектрофотометра (Carl Zeiss, Германия); полученные значения умножали на объем БФ. Взвешивали осадки КС с использованием аналитических весов CPA225D (Sartorius, Германия).

Иммуноферментный анализ (ИФА). Использовали полистирольные планшеты для ИФА (Greiner bio-one, Германия). Для иммобилизации антигенов на поверхности лунок планшетов применяли 0,01 М натрий-фосфатный буфер (НФБ), рН 7,5 (буфер 1), для промывки лунок – буфер 1, содержащий 0,15 М NaCl (буфер 2); в качестве инкубационного буфера (ИнБ) использовали буфер 2, содержащий 1 % бычьего сывороточного альбумина. На первой стадии ИФА использовали ПАТ_{антиLl В-493}, находящиеся в составе антисыворотки (Ас) кролика, иммунизированного целыми клетками *Ll* В-493 (ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», Беларусь) или общие иммуноглобулины, выделенные из указанной Ас ($Ig_{\text{анти-Ll В-493}}$) по стандартной методике, включающей последовательное осаждение сывороточного альбумина каприловой кислотой при рН 4,8 и Ig 45 % раствором сульфата аммония при рН 7,0–7,5 [13]. Концентрацию $Ig_{\text{анти-Ll В-493}}$ определяли спектрофотометрически, используя коэффициент поглощения $A_{280 \text{ нм}, 1 \text{ см}, 1 \text{ мг/мл}}$ равный 1,35. На второй стадии ИФА детектировали ПАТ_{антиLl В-493}, связавшиеся с антигенами, используя конъюгат пероксидазы из корней хрена (horseradish peroxidase, HRP) с ПАТ барана против Ig кролика (sheep anti rabbit, ShAR) (конъюгат ShAR-HRP) (ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», Беларусь). Ферментативную реакцию HRP инициировали и останавливали, как указано в работе [11]. Измеряли оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм (A_{450}) с использованием спектрофлуориметра Infinite M200 (Tecan, Австрия).

Определение значений перекрестной реакции ПАТ, специфичных к антигенам штамма *Ll* В-493, с антигенами бактерий *Ll* В-132, *Ll* БИМ В-424, *Ll* В-922, *St* В-527, *St* В-528, *Ef* В-529, *Ef* В-720, *Lp* В-423D проводили методом конкурентного ИФА, как указано в работе [11], используя БФ штамма *Ll* В-493, иммобилизованную из раствора со значением $A_{260 \text{ нм}, 1 \text{ см}}$ равным 0,1, в лунках 9 серий. На первой стадии ИФА в лунках каждой серии находился ИнБ, содержащий Ас (в титре 1/2 000)

и БФ одного из штаммов; значения $A_{260 \text{ нм}, 1 \text{ см}}$ в окончательном объеме пробы находились в диапазоне от 0,6 до 18,0.

Исследование динамики концентрации внутриклеточных антигенов 4 штаммов лактококков проводили методом прямого ИФА, используя препараты БФ *Ll* В-493, *Ll* В-922, *Ll* В-132, *Ll* 424 (24 препарата), иммобилизованные из растворов буфера 1 со значениями $A_{260 \text{ нм}, 1 \text{ см}}$ равными 0,1. На первой стадии ИФА в лунках каждой из 24 серий серии находился ИнБ, содержащий $Ig_{\text{анти-}Ll \text{ В-493}}$ в концентрации (0,41–52) мкг/мл.

Исследование динамики концентрации секреторных антигенов 4 штаммов лактококков проводили методом конкурентного ИФА, используя препараты БФ каждого штамма (24 препарата), иммобилизованные из растворов со значениями $A_{260 \text{ нм}, 1 \text{ см}}$ равными 0,025. На первой стадии ИФА в лунках каждой из 24 серий серии находился ИнБ, содержащий $Ig_{\text{анти-}Ll \text{ В-493}}$ в концентрации 14,5 мкг/мл, и соответствующий препарат культуральной жидкости (КЖ), предварительно сконцентрированный в 10 раз, в количестве 50, 100, 200 и 400 мкл/мл (пробы В₁–В₄). Раствор, общий для всех препаратов БФ, содержащий 14,5 мкг/мл $Ig_{\text{анти-}Ll \text{ В-493}}$ и ИнБ вместо КЖ, использовали в качестве пробы В₀.

Результаты и их обсуждение. Согласно представлениям о локализации бактериальных антигенов, послужившим теоретической основой для данной работы [12], все антигены синтезируются внутри клетки, а затем распределяются между цитоплазмой и системой плазматической мембрана–КС или секретируются во внешнюю среду (продукты первичной секреции) в соответствии с биологическими функциями, выполняемыми каждым из биополимеров, обладающих антигенными свойствами. Кроме того, локализация антигенов во внешней среде может являться результатом отделения от поверхности живых клеток компонентов наружной части КС (белково-полисахаридного комплекса), происходящего по мере увеличения ее толщины в ходе старения клеток (продукты вторичной секреции) [14], или следствием гибели клеток.

В качестве «инструмента» для исследования динамики синтеза и секреции антигенов лактококков использовали ПАТ_{анти-*Ll* В-493}. В этой связи объектами исследования могут являться только штаммы лактококков и родственных микроорганизмов, содержащие антигены, идентичные или подобные антигенам *Ll* В-493. Выбор объектов исследования осуществляли на основании результатов определения перекрестной реакции ПАТ_{анти-*Ll* В-493} с антигенами трех других штаммов *L. lactis* и пятью штаммами родственных бактерий отряда *Lactobacillales*.

Установлено, что значения перекрестной реакции ПАТ_{анти-*Ll* В-493} с антигенами штаммов *Ll* В-922, *Ll* БИМ В-424 и *Ll* В-132 составляют 25, 28 и 40 % соответственно. Значения перекрестной реакции тех же ПАТ с антигенами штаммов *Lp* В-423 D, *St* В-528, *St* В-527, *Ef* В-720 и *Ef* В-529 не превышают 1 %. Полученные данные ограничивают объекты исследования четырьмя штаммами бактерий – штаммом *Ll* В-493, используемым для получения ПАТ, и штаммами *Ll* В-922, *Ll* В-132 и *Ll* В-424.

Бактерии выбранных штаммов выращивали на двух средах, одна из которых была стандартной для культивирования лактококков [15] и представляла собой MRS (среда 1), а вторая была получена в результате двукратного разведения MRS дистиллированной водой (среда 2). Продолжительность культивирования составляла 12, 24 и 48 ч. В связи с изложенными выше представлениями о распределении антигенов в системе клетка–среда для анализа антигенов каждого штамма получали препараты БФ (представляющие собой совокупность цитоплазмы и части компонентов КС, переходящих в раствор при разрушении клеток ультразвуком) и КЖ (т. е. культуральной среды, отделенной от выросших в ней бактерий). Препараты БФ использовали для анализа внутриклеточных антигенов, а препараты КЖ – для определения антигенов, поступающих во внешнюю среду. Мерой концентрации БФ служило значение показателя $A_{260 \text{ нм}, 1 \text{ см}}$ пропорциональное концентрации общих нуклеиновых кислот (НК) в составе БФ, а следовательно, пропорциональное числу клеток, использованных для получения БФ.

Количественная характеристика каждой культуры, необходимая для «уравнивания» препаратов БФ, используемых в ИФА, математической обработки данных ИФА и интерпретации полученных результатов, представлена в таблице.

Динамика изменения концентрации общих НК в препаратах БФ и совокупного веса КС, полученных в результате культивирования бактерий в течение 12, 24 или 48 ч и последующего разрушения клеток ультразвуком

Штамм	Общее количество НК в БФ, усл. ед. ¹			Вес КС, мг		
	12 ч	24 ч	48 ч	12 ч	24 ч	48 ч
<i>Культуральная среда 1</i>						
<i>Ll</i> В-493	73,4 ± 2,5²	51,7 ± 1,9	51,4 ± 2,7	118 ± 5	135 ± 6	123 ± 4
<i>Ll</i> В-922	62,3 ± 1,9	52,7 ± 1,3	52,8 ± 2,0	91 ± 3	94 ± 2	90 ± 3
<i>Ll</i> В-132	41,7 ± 0,6	29,9 ± 0,6	20,5 ± 1,0	95 ± 3	103 ± 5	86 ± 3
<i>Ll</i> В-424	71,6 ± 1,7	63,8 ± 2,1	33,3 ± 1,2	121 ± 4	150 ± 6	159 ± 4⁴
<i>Культуральная среда 2</i>						
<i>Ll</i> В-493	48,1 ± 0,9	39,1 ± 1,5	45,4 ± 1,3	77 ± 1	87 ± 2	84 ± 2
<i>Ll</i> В-922	53,5 ± 0,9	52,2 ± 1,2	62,7 ± 1,5	75 ± 3	97 ± 2	91 ± 2
<i>Ll</i> В-132	18,8 ± 0,1	19,5 ± 0,2	14,2 ± 0,3	64 ± 2	82 ± 3	56 ± 1
<i>Ll</i> В-424	54,8 ± 1,6	61,1 ± 2,0³	40, ± 0,6	106 ± 4	107 ± 5⁵	89 ± 3

Пр и м е ч а н и е. ¹ – общее количество НК в БФ пропорционально числу клеток бактерий, являющихся источником БФ, и рассчитано как произведение значения $A_{260 \text{ нм}, 1 \text{ см}}$ (ед. опт. п.) препарата БФ на объем БФ (мл); ^{2,3} – максимальные значения показателей общего количества НК в средах 1 и 2; ^{4,5} – максимальные значения веса КС в средах 1 и 2.

Данные таблицы свидетельствуют о том, что снижение концентрации питательных веществ в среде культивирования приводит к ограничению роста бактерий всех тестируемых штаммов. В среде 1 продолжительность логарифмической фазы составляла менее 12 ч, поскольку в период 12–24 ч в БФ каждого из 4 штаммов не происходило увеличения количества НК. Через 48 ч наступала фаза отмирания культуры, особенно у штаммов *Ll* В-132 и *Ll* В-424, у которых общее количество НК в препаратах БФ (а значит, и число клеток, соответствующих указанному времени культивирования), составляло менее 50 % от такового в препаратах БФ, соответствующих 12 ч культивирования. В среде 2 логарифмическая фаза также длилась менее 12 ч, так как в период проведения измерений (12–48 ч) общее количество НК в БФ увеличивалось только на 15 % (штамм *Ll* В-922), оставалось практически неизменным (штаммы *Ll* В-493 и *Ll* В-132) или снижалось (штамм *Ll* В-424), что соответствует поздней стационарной фазе и фазе отмирания культуры соответственно.

В обеих средах увеличение совокупного веса КС, происходящее в период 12–24 ч, происходило за счет увеличения их толщины, а не увеличения числа клеток (за исключением штамма *Ll* В-424, растущего в среде 2). В период 24–48 ч наблюдалось снижение значения указанного параметра (за исключением штамма *Ll* В-424, растущего в среде 1), что можно объяснить как естественной гибелью клеток и их разрушением (в случае параллельного снижения совокупного количества НК, например, у штамма *Ll* В-424, растущего в среде 2, а также у штамма *Ll* В-132, растущего в средах 1 и 2), так и отделением от поверхности клеток и переходом в среду компонентов наружной части КС [14] (в случае параллельного увеличения или сохранения неизменным совокупного количества НК, например, у штамма *Ll* В-493 в обеих средах и штамма *Ll* В-922 в среде 2). В соответствии с данными таблицы, естественная секреция антигенов могла происходить только в период до 12 ч, соответствующий логарифмической фазе роста культуры, либо в те отрезки времени, которые соответствуют увеличению или сохранению неизменным совокупного количества НК в сочетании с увеличением или сохранением неизменным веса КС (у штаммов *Ll* В-922 и *Ll* В-132, культивируемых в среде 2, в период 12–24 ч и у штамма *Ll* В-424, культивируемого в среде 2, в период 12–24 ч соответственно).

Для сравнения динамики концентрации внутриклеточных антигенов 4 штаммов бактерий использовали следующий подход. Имобилизовали компоненты БФ каждого штамма из раствора со значениями $A_{260 \text{ нм}, 1 \text{ см}}$ равными 0,1, тем самым «уравнивая» количество клеток каждого штамма, из которых эти антигены получены. Исследовали концентрационную зависимость связывания иммобилизованных антигенов с очищенными $Ig_{\text{анти-}Ll \text{ В-493}}$. Значение $A_{260 \text{ нм}, 1 \text{ см}}$ в растворе для

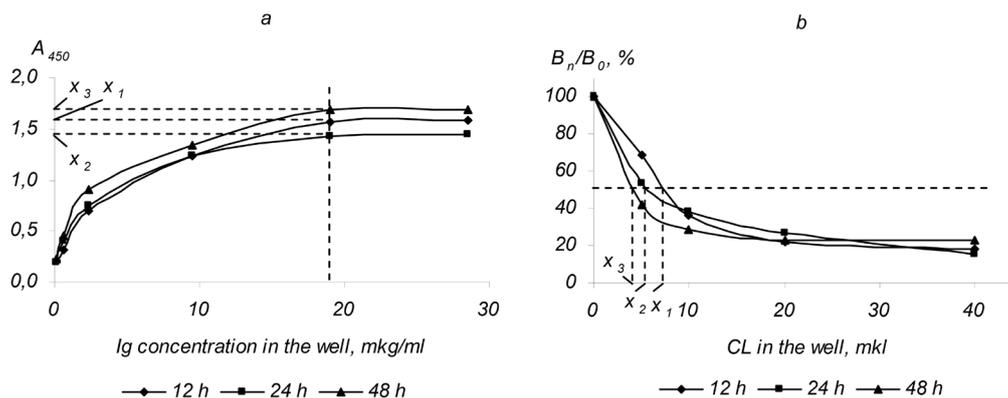


Рис. 1. Типичные графики прямого (а) и конкурентного (б) ИФА, используемые для расчета удельной концентрации ($C_{уд}$) внутриклеточных (а) и секреторных (б) антигенов из расчета на клетку бактерий, на примере штамма *Ll B-493*, выращенного в среде 1. Представлены средние данные трех независимых экспериментов (погрешность составляет не более 5 %)

Fig. 1. Typical curves of direct (a) and competitive (b) ELISA used for calculation of specific concentration (C_{sp}) of intercellular (a) and secretory (b) antigens per bacterial cell are shown using strain *Ll B-493* grown in medium 1 as an example. CL – cultural liquid

иммобилизации компонентов БФ, равное для всех препаратов, а также диапазон используемых концентраций Ig выбирали на основании результатов предварительных экспериментов; критерием выбора являлось получение классических кривых насыщения, имеющих выраженное «плато». Типичные данные на примере штамма *Ll B-493*, выращенного в среде 1, представлены на рис. 1, а. Аналогичные кривые насыщения получены для каждого из 4 штаммов, выращенных в среде 1 и среде 2 (данные не представлены).

Обрабатывали данные следующим образом. На каждом графике, содержащем три кривые, определяли значения A_{450} в экспериментальных точках, соответствующих выходу кривых на «плато». Максимальное из трех значений A_{450} принимали за 100 %. Производили пересчет в проценты двух других значений A_{450} . Рассчитанные значения, пропорциональные удельной концентрации ($C_{уд}$) внутриклеточных антигенов (из расчета на клетку) представляли в виде гистограмм (рис. 2, 3).

Для сравнения динамики концентрации секреторных антигенов 4 штаммов бактерий использовали следующий подход. Иммуобилизовали БФ каждого штамма из раствора со значениями $A_{260\text{ нм}, 1\text{ см}}$, равными 0,025. Для каждого из 24 препаратов БФ использовали соответствующий препарат КЖ, предварительно сконцентрированный в 10 раз. Он являлся источником секреторных антигенов, конкурирующих с иммобилизованными антигенами за связывание с $Ig_{\text{анти-Ll B-493}}$. Значение $A_{260\text{ нм}, 1\text{ см}}$ в растворе для иммобилизации компонентов БФ, равное для всех препаратов, диапазон используемых концентраций $Ig_{\text{анти-Ll B-493}}$ и объем концентратов КЖ выбирали на основании результатов предварительных экспериментов; критерием выбора являлось получение классических кривых конкурентного вытеснения, имеющих выраженное «плато». Типичные данные на примере штамма *Ll B-493*, выращенного в среде 1, представлены на рис. 1, б. Аналогичные кривые конкурентного вытеснения ПАТ из комплекса с иммобилизованными антигенами получены для каждого из 4 штаммов, выращенных в среде 1 и среде 2 (данные не представлены).

Обрабатывали данные следующим образом. На каждом графике для каждой из трех кривых определяли количество КЖ (в мкл), соответствующее экспериментальной точке со значением ОУ, равным 50 %; полученные значения обозначали x_1 – x_3 . Рассчитывали значения $1/x_1$ – $1/x_3$. Максимальное из трех значений принимали за 100 % и производили пересчет в проценты двух других значений $1/x_n$. Каждое из рассчитанных значений делили на общее количество НК в БФ (см. таблицу), «уравняя» тем самым количество клеток, являющихся источником антигенов, находящихся в КЖ. Рассчитанные значения, пропорциональные $C_{уд}$ секреторных антигенов (из расчета на клетку) представляли в виде гистограмм (рис. 2, 3).

Данные, представленные на рис. 2, 3, свидетельствуют о том, что $C_{уд}$ внутриклеточных антигенов каждого из штаммов *Ll B-493*, *Ll B-132*, *Ll B-922* в период наблюдений (12–48 ч) изме-

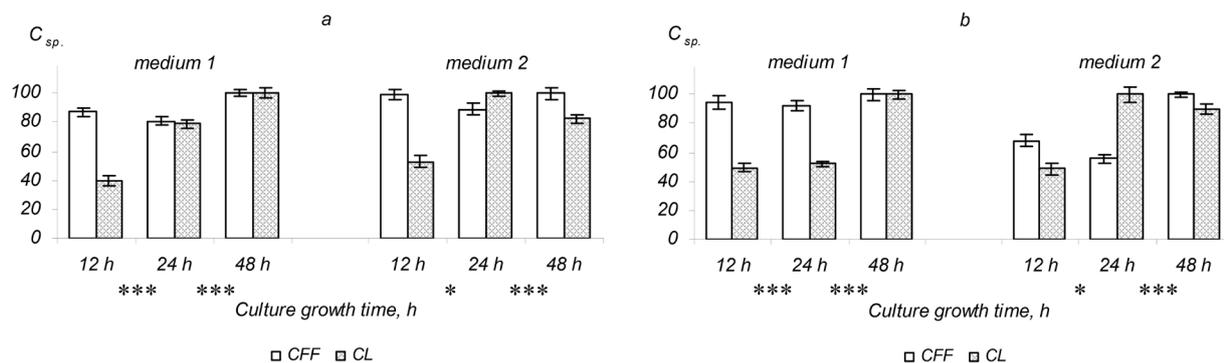


Рис. 2. Зависимость удельной концентрации ($C_{уд}$) внутриклеточных антигенов (БФ) и секреторных антигенов (КЖ) из расчета на клетку бактерий от продолжительности роста культуры в средах 1 и 2. Бактерии: а – *L1 B-132*, б – *L1 B-424*

Fig. 2. Dependence of the specific concentration (C_{sp}) of intracellular antigens (cell-free fraction, CFF) and secretory antigens (cultural liquid, CL) per bacterial cell on the duration of the cell culture growth in media 1 and 2. Bacteria: а – *L1 B-132*, б – *L1 B-424*

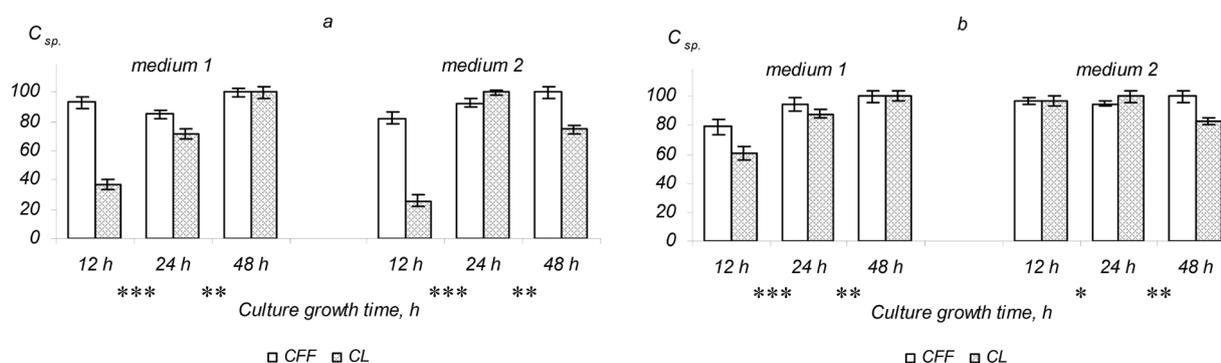


Рис. 3. Зависимость удельной концентрации ($C_{уд}$) внутриклеточных антигенов (БФ) и секреторных антигенов (КЖ) из расчета на клетку бактерий от продолжительности роста культуры в средах 1 и 2. Бактерии: а – *L1 B-493*, б – *L1 B-922*

Fig. 3. Dependence of the specific concentration (C_{sp}) of intracellular antigens (cell-free fraction, CFF) and secretory antigens (cultural liquid, CL) per bacterial cell on the duration of the cell culture growth in media 1 and 2. Bacteria: а – *L1 B-493*, б – *L1 B-922*

няется не более чем на 20 % как при культивировании бактерий в среде 1, так и при их росте в среде 2. Изменение $C_{уд}$ антигенов в клетках штамма *L1 B-424* при его культивировании в среде 1 подчинялось той же закономерности и составлял 6–8 %, в то время как в среде 2 в период 24–48 ч $C_{уд}$ увеличилась на 40 %. Логично предположить, что выраженные изменения $C_{уд}$ внутриклеточных антигенов происходили во время логарифмической фазы роста культуры, продолжительность которой оказалась более короткой, чем предполагалось при планировании работы.

Динамика $C_{уд}$ (из расчета на клетку) антигенов лактококков в КЖ в период 12–48 ч имела более выраженный характер. В среде 1 отмечалось увеличение $C_{уд}$ антигенов каждого из 4 штаммов в течение всего периода наблюдений (рис. 2, 3). Исходя из данных таблицы, увеличение $C_{уд}$ антигенов штаммов *L1 B-132* и *L1 B-424* в период 12–48 ч можно объяснить поступлением антигенов в КЖ в результате их отделения от КС или гибели клеток. В КЖ штаммов *L1 B-493* и *L1 B-922* это объяснение справедливо только для периода 12–24 ч, в то время как в более поздние сроки наиболее вероятной причиной увеличения антигенов в КЖ является вторичная секреция компонентов КС живых клеток. В среде 2 у штаммов *L1 B-132*, *L1 B-424* и *L1 B-493* выраженное увеличение $C_{уд}$ в КЖ наблюдалось в период 12–24 ч; причиной этого являлась естественная секреция (штаммы *L1 B-132* и *L1 B-424*) или поступление антигенов в КЖ в результате их отделения от КС или гибели клеток (штамм *L1 B-493*). Последующее незначительное снижение $C_{уд}$ антигенов в КЖ

можно объяснить либо нарушением их структуры и, следовательно, способности к образованию иммунных комплексов со специфическими антителами, либо тем, что в указанный период происходит увеличение числа клеток (см. таблицу), но рост КС ограничен истощенными ресурсами среды. У штамма *Ll B-922*, растущего в среде 2, $C_{уд}$ антигенов в КЖ остается практически неизменной в ходе всего времени наблюдений. Вероятно, в период 12–24 ч эти антигены являются продуктами первичной секреции, а в период 24–48 ч – продуктами вторичной секреции компонентов КС.

Следует отметить, что антигены, находящиеся в КЖ через 12 ч с момента начала роста культуры каждого штамма, по-видимому, являются продуктами первичной секреции, что подтверждает факт детекции этого процесса в более поздний период (среда 2, 12–24 ч, штаммы *Ll B-132*, *Ll B-424* (рис. 2) и *Ll B-922* (рис. 3)).

Заключение. Разработана методология исследования динамики синтеза и секреции бактериальных антигенов неизвестной природы и структуры, включающая метод выбора объектов исследования; критерии количественной оценки биологических препаратов, являющихся источником антигенов; методику иммуноферментного анализа изменения $C_{уд}$ (из расчета на клетку) внутриклеточных и секреторных антигенов; методы обработки экспериментальных данных и интерпретации результатов.

В качестве объектов исследования динамики синтеза и секреции антигенов выбраны штамм *Ll B-493*, а также штаммы *Ll B-922*, *Ll B-132*, *Ll B-424*, для которых значения перекрестной реакции с используемыми ПАТ составляют не менее 25 %. Установлено, что антигены лактококков включают как компоненты клетки, локализованные в цитоплазме и КС, так и соединения, оказывающиеся во внешней среде в результате первичной секреции, деградации КС или гибели клеток. Показано, что после завершения логарифмической стадии роста концентрация внутриклеточных антигенов изменяется не более чем на 20 %, а концентрация антигенов во внешней среде увеличивается более чем в 2 раза. Характер увеличения концентрации антигенов во внешней среде зависит от штамма, стадии роста культуры и состава среды.

Разработанная методология исследования динамики синтеза и секреции бактериальных антигенов неизвестной структуры и данные о характере распределения антигенов лактококков в системе клетка–среда могут найти применение при выделении компонентов клеток и секреторных продуктов лактококков и других непатогенных микроорганизмов для их использования в научных исследованиях и биотехнологиях производства препаратов пробиотического действия.

Список использованных источников

1. Macpherson, A. J. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria / A. J. Macpherson, T. Uhr // *Science*. – 2004. – Vol. 303, N 5664. – P. 1662–1665.
2. Dynamic interactions between bacteria and immune cells leading to intestinal IgA synthesis / M. Tsuji [et al.] // *Semin. Immunol.* – 2008. – Vol. 20, N 1. – P. 59–66.
3. Coffey, A. Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application / A. Coffey, R. P. Ross // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2002. – Vol. 82, N (1–4). – P. 303–321.
4. Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media / A. F. Jozala [et al.] // *Afr. J. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 4, N 3. – P. 262–265.
5. Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering / P. Hols [et al.] // *Nature Biotechnol.* – 1999. – Vol. 17, N 6. – P. 588–592.
6. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease / H. Braat [et al.] // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2006. – Vol. 4, N 6. – P. 754–759.
7. *Lactococcus lactis* as an adjuvant and delivery vehicle of antigens against pneumococcal respiratory infections / M. Medina [et al.] // *Bioengineered Bugs*. – 2010. – Vol. 1, N 5. – P. 313–325.
8. Oral immunization with *Lactococcus lactis* secreting attenuated recombinant staphylococcal enterotoxin B induces a protective immune response in a murine model / G. F. Asensi [et al.] // *Microb. Cell Fact.* – 2013. – Vol. 12. – P. 32–39.
9. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA / H. G. Heilig [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – Vol. 68, N 1. – P. 114–123.
10. Anti-inflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis / T. D. Luerce [et al.] // *Gut Pathogens*. – 2014. – Vol. 6. – P. 33–40.
11. Поликлональные антитела кролика, иммунизированного целыми клетками *Lactococcus lactis* БИМ В-493 Д: получение, методология тестирования и основные свойства / А. П. Езубец [и др.] // *Вес. Нац. акад. Беларусі. Приложение*. – 2014. – С. 32–36.

12. Антигены бифидобактерий: синтез и распределение в системе клетка – среда / Е. П. Киселева [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. / Ин-т микробиол. НАН Беларуси; под науч. ред. Э. И. Коломиец, А. Г. Лобанка. – Минск: Бел. наука, 2014. – Т. 6. – С. 286–300.
13. Purification of human-immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic-acid and ammonium-sulfate / F. Perosa [et al.] // *J. Immunol. Methods.* – 1990. – Vol. 128, N 1. – P. 9–16.
14. Выделение и характеристика белково-полисахаридного комплекса, секретируемого *Bifidobacterium adolescentis* / Г. И. Новик [и др.] // *Микробиология.* – 1997. – Т. 66, № 5. – С. 621–627.
15. De Man, J. C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J. C. de Man, M. Rogosa, M. E. Sharpe // *J. Appl. Bact.* – 1960. – Vol. 23, N 1. – P. 130–135.

References

1. Macpherson, A. J. and Uhr, T. (2004) “Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria”, *Science*, vol. 303, no. 5664, pp. 1662-1665.
2. Tsuji, M., Suzuki, K., Kinoshita, K. and Fagarasan, S. (2008) “Dynamic interactions between bacteria and immune cells leading to intestinal IgA synthesis”, *Seminars in Immunology*, vol. 20, no. 1, pp. 59-66.
3. Coffey, A. and Ross, R. P. (2002) “Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application”, *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 82, no. (1–4), pp. 303-321.
4. Jozala, A. F., de Lencastre Novaes, L. C., Cholewa, O., Moraes, D. and Penna, T. C. V. (2005) “Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media”, *African Journal of Biotechnology*, vol. 4, no. 3, pp. 262-265.
5. Hols, P., Kleerebezem, M., Schanck, A., Ferain, T., Hugenholtz, J., Delcour, J. and de Vos, W. M. (1999) “Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering”, *Nature Biotechnology*, vol. 17, no. 6, pp. 588-592.
6. Braat, H., Rottiers, P., Hommes, D. W., Huyghebaert, N., Remaut, E., Remon, J. P., van Deventer, S. J., Neiryck, S., Peppelenbosch, M. P. and Steidler, L. (2006) “A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn’s disease”, *Clinical gastroenterology and hepatology*, vol. 4, no. 6, pp. 754-759.
7. Medina, M., Vintiñi, E., Villena, J., Raya, R. and Alvarez, S. (2010) “*Lactococcus lactis* as an adjuvant and delivery vehicle of antigens against pneumococcal respiratory infections”, *Bioengineered Bugs*, vol. 1, no. 5, pp. 313-325.
8. Asensi, G. F., Fonseca, de Sales, N. F., Dutra, F. F. and Feijó, D. F. (2013) “Oral immunization with *Lactococcus lactis* secreting attenuated recombinant staphylococcal enterotoxin B induces a protective immune response in a murine model”, *Microbial Cell Factories*, vol. 12, p. 32.
9. Heilig, H. G., Zoetendal, E. G., Vaughan, E. E., Marteau, P., Akkermans, A. D. and de Vos, W. M. (2002) “Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA”, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 1, pp. 114-123.
10. Luerce, T. D., Gomes-Santos, A. C., Rocha, C. S., Moreira, T. G., Cruz, D. N., Lemos, L., Sousa, A. L., Pereira, V. B., de Azevedo, M., Moraes, K., Cara, D. C., Le Blanc, J. G., Azevedo, V., Faria, A. M. and Miyoshi, A. (2014) “Anti-inflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis”, *Gut Pathogens*, vol. 6, p. 33.
11. Ezubets, A. P., Kiseleva, E. P., Kolozhin-Kraevska, D. and Novik, G. I. (2014) “Polyclonal rabbit antibodies to antigens of *Lactococcus lactis* BIM B-493 D: production, testing and properties”, *Vesti NAS of Belarus, Special Issue*, pp. 32-36.
12. Kiseleva, E. P., Starovoitova, T. A., Mikhailopolu, K. I., Novik, G. I. and Shvaitser Dei, E. (2014) “Antigens of bifidobacteria: synthesis and distribution in the system cell – environment, *Mikrobnye biotekhnologii: fundamentalnye i prikladnye aspekty: sbornik nauchnykh trudov Instituta Mikrobiologii Natsyonal’noi Akademii Nauk Belarusi* [Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects. Collection of scientific papers of the Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus], Belnavuka, Minsk, BY, vol. 6, pp. 286-300.
13. Perosa, F., Carbone, R., Ferrone, S. and Dammacco, F. (1990) “Purification of human immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulfate”, *Journal of Immunological Methods*, vol. 128, no. 1, pp. 9-16.
14. Novik, G. I., Astapovich, N. I., Samartsev, A. A. and Ryabaya, N. E. (1997) “Isolation and characterization of protein-polysaccharide complex secreted by *Bifidobacterium adolescentis*”, *Microbiologiya*, vol. 66, no. 5, pp. 621-627.
15. De Man, J. C., Rogosa, M. and Sharpe, M. E. (1960) “A medium for the cultivation of lactobacilli”, *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 23, no. 1, pp. 130-135.

Информация об авторах

Киселева Елена Павловна – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: epkiseleva@yandex.ru

Езубец Анна Павловна – студент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: anna.ezubets94@gmail.com

Information about the authors

Kiseleva Elena Pavlovna – Ph. D. (Chem.), Liding Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (Acad. Kuprevicha str., 5/2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: epkiseleva@yandex.ru

Ezubets Anna Pavlovna – Student. Belarusian State University (Nezavisimosti ave., 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anna.ezubets94@gmail.com

Михайлопуло Константин Игоревич – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5, корп. 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: k.mikhailopulo@gmail.com

Новик Галина Ивановна – канд. биол. наук, зав. лабораторией «Коллекция микроорганизмов». Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: galina_novik@mbio.bas-net.by

Для цитирования

Методология исследования динамики синтеза и секреции антигенов непатогенных микроорганизмов на примере *Lactococcus lactis* / Е. П. Киселева [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 72–80.

Mikhailopulo Konstantin Igorevich – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (Acad. Kuprevicha str., 5/2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: k.mikhailopulo@gmail.com

Novik Galina Ivanovna – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory “Collection of Microorganisms”. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (Acad. Kuprevicha str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: galina_novik@mbio.bas-net.by

For citation

Kiseleva E., Ezybets A., Mikhailopulo K., Novik G. Methodological approach to the study of the dynamic of antigens synthesis and secretion by nonpathogenic organisms on the example of *Lactococcus lactis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 72–80.

Н. Г. Клишевич, А. С. Самсонова, Е. М. Глушень

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ АССОЦИАТИВНЫЕ КУЛЬТУРЫ ДЛЯ ДЕСТРУКЦИИ ТЯЖЕЛОЙ НЕФТИ

Известно множество видов микроорганизмов-нефтедеструкторов, которые входят в состав биопрепаратов, широко применяемых для ликвидации аварийных разливов нефти и нефтепродуктов. Однако они малоэффективны по отношению к высоковязкой нефти. Высокий деструктивный потенциал выделенных ассоциаций углеводородокисляющих микроорганизмов служит основанием для дальнейшей разработки препарата для деструкции тяжелой нефти.

Ключевые слова: микроорганизмы-нефтедеструкторы, высоковязкая нефть.

N. G. Klishevich, A. S. Samsonova, E. M. Glushen

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

HYDROCARBON-OXIDIZING ASSOCIATIVE MICROBIAL CULTURES ELIMINATING HEAVY OIL

Numerous microbial oil-degrading species are known as constituents of biopreparations used for disposal of emergency leakages of petroleum and its refining products. Yet, they show only minor effect with respect to hyper viscous crude oil. Elevated decomposing microbial associations lays the basis for further research and development of efficient biopreparation for degradation of heavy oil originating from Belarusian fields.

Keywords: microbial oil-degrading, hyper viscous crude oil.

Введение. Основная доля мировой добычи нефти приходится на месторождения, пик добычи на которых уже пройден. Однако ввиду постоянно увеличивающегося спроса на энергоносители огромное значение приобретает использование эффективных технологий разработки высоковязкой нефти и природных битумов. Такие технологии, интенсивно развивающиеся последние 10 лет, в ближайшие 20–25 лет будут приоритетными в мире. В Республике Беларусь 65 месторождений нефти, из них более 30 активно эксплуатируются. При этом более 44 % из них относится к трудноизвлекаемым запасам, в состав которых входят залежи с высоковязкой нефтью. С увеличением объемов добычи такой нефти возрастают и экологические проблемы. Требуются огромные усилия и средства, чтобы ликвидировать нанесенный тяжелой нефтью ущерб, так как при ее попадании в окружающую среду она очень плохо подвергается разложению. В настоящее время известно множество видов микроорганизмов-нефтедеструкторов, которые входят в состав биопрепаратов, широко применяемых для ликвидации аварийных разливов нефти и нефтепродуктов. Однако они малоэффективны по отношению к высоковязкой нефти. В связи с этим существует реальная необходимость проведения поисковой работы по выделению, изучению способностей и потенциала деструкции тяжелой нефти углеводородокисляющими микроорганизмами [1–7].

Цель данной работы – установить, возможно ли применение углеводородокисляющих культур для деструкции тяжелой нефти.

Материалы и методы исследования. В работе использованы традиционные микробиологические, физико-химические, химические методы исследования.

Объектами исследования являлись микроорганизмы-деструкторы нефти, выделенные из различных почв нефтяных месторождений и накопительных культур с нефтью.

На буровых площадках Вишанского, Домановичского и Северо-Домановичского месторождений проведен отбор образцов буровых растворов, пластовых вод и образцов тяжелой нефти.

Состав биополимерного бурового раствора: ксантан – 0,65 %, крахмал – 1,5, гидроокись калия – 0,05, биоцид – 0,06, мел – 2 %.

Характеристики пластовых вод и образцов тяжелой нефти приведены в табл. 1 и 2.

Т а б л и ц а 1. Характеристика пластовых вод

Параметр	Месторождение		
	Вишанское	Домановичское	Северо-Домановичское
Плотность, г/см ³	1,1	1,2	1,2
pH	6,5	7,11	5,6
Минерализация	220	221	209

Т а б л и ц а 2. Характеристика образцов тяжелой нефти

Параметр	Месторождение		
	Вишанское	Домановичское	Северо-Домановичское
Плотность нефти в пластовых условиях, г/см ³	0,906	0,9169	0,905
Вязкость при 50 г С, мм ² /с	56,5	477,7	368,4
Содержание асфальтеновых веществ в нефти, %	3,13	0,37	3,05
Содержание парафина в нефти, %	7,97	7,75	6,4
Содержание смолистых веществ в нефти, %	22,04	37,63	35,72

Выделение микроорганизмов-деструкторов тяжелой нефти проводили методом накопительных культур, созданных на основе почвы, которая загрязнена тяжелой нефтью, добытой на Вишанском, Домановичском и Северо-Домановичском месторождениях.

О деструктивной активности отобранных ассоциаций судили на основании снижения концентрации парафинов, смол и асфальтенов в среде культивирования. Методика определения концентраций данных веществ основана на их экстракции из образцов жидкой среды с использованием растворителей и последующем анализе экстрактов методом газовой хроматографии с капиллярной колонкой и пламенно-ионизационным детектором, а также ИК-спектрофотометрическим методом. Экстракцию нефтепродуктов осуществляли хлороформом с одновременной очисткой элюатов в колонке с оксидом алюминия. Интенсивность поглощения каждого раствора на инфракрасном спектрометре измеряли в интервале длин волн 2700–3100 см⁻¹. Оптическую плотность рассчитывали методом базисной линии, которую проводили как касательную к основанию двух пиков, соответствующих симметричным и асимметричным валентным колебаниям СН₂- и СН₃-групп. Для анализа использовали полосу поглощения асимметричных валентных колебаний метиленовых групп 2926 см⁻¹.

Степень деградации нефти (*S*) рассчитывали по формуле

$$S = (100 - C/C_0) \cdot 100,$$

где *C* – конечная концентрация нефти, мг/л; *C*₀ – концентрация внесенной нефти, мг/л.

Результаты и их обсуждение. В пластовых водах и буровых растворах, используемых при добыче тяжелой нефти на Вишанском, Домановичском и Северо-Домановичском месторождениях, микроорганизмов-деструкторов тяжелой нефти не выявлено. Их отсутствие в данных образцах может быть связано с низкой концентрацией аэробных микроорганизмов на глубине около 2 км и с близким залеганием солевых слоев (концентрация соли в нефтяном пласте может достигать 300 г/л). Из загрязненных нефтью почв буровых площадок месторождений Гомельской области выделено 18 ассоциаций микроорганизмов-деструкторов высоковязкой нефти. Наиболее активные ассоциативные культуры адаптированы к высоким концентрациям тяжелой нефти (1–30 %).

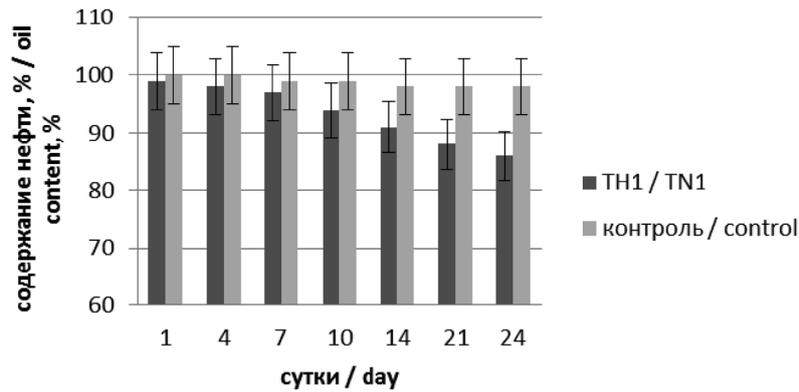


Рис. 1. Динамика деструкции тяжелой нефти ассоциацией ТН1
 Fig. 1. Dynamics eliminating heavy oil by association TN1

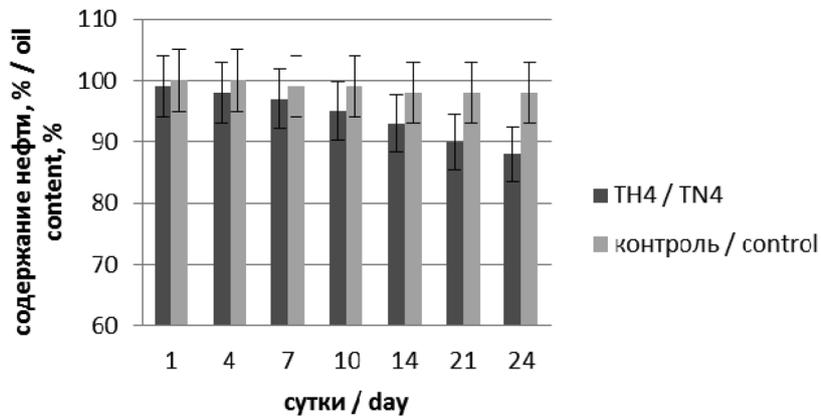


Рис. 2. Динамика деструкции тяжелой нефти ассоциацией ТН4
 Fig. 2. Dynamics eliminating heavy oil by association TN4

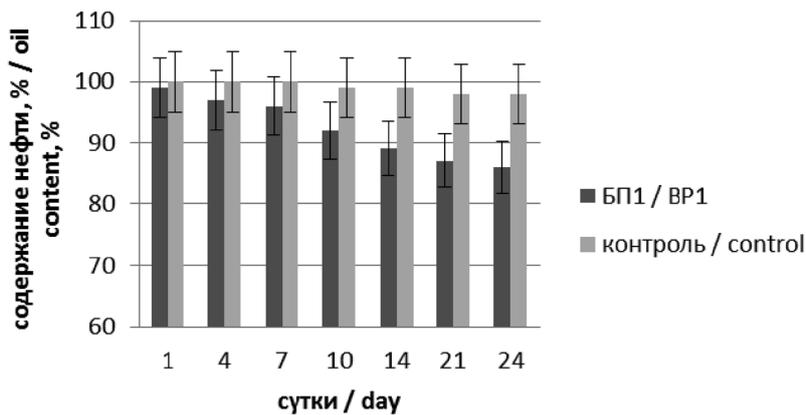


Рис. 3. Динамика деструкции тяжелой нефти ассоциацией БП1
 Fig. 3. Dynamics eliminating heavy oil by association BP1

Проверка способности выделенных ассоциаций к развитию на средах с тяжелой нефтью в концентрации 1–10 % позволила выявить три наиболее активные ассоциации, состоящие из микроорганизмов родов *Rhodococcus*, *Gordonia* и *Bacillus*. Данные ассоциативные культуры ТН1, ТН4 и БП1 способны разрушать тяжелую нефть в концентрации 1 % в течение месяца на 14, 12 и 13 % соответственно (рис. 1–3). При повышении концентрации токсиканта до 3 % деструктивная активность исследуемых ассоциаций значительно снижалась.

Дальнейшие исследования деструктивного потенциала ассоциаций БП1 и ТН4 показали, что за 3 мес. концентрация асфальтеновых веществ в среде культивирования снизилась на 13 и 11 % соответственно. Смолистые вещества были разрушены данными культурами на 20 и 16 %, а парафины – на 35 и 34 % соответственно.

Заклучение. Высокий деструктивный потенциал выделенных ассоциаций углеводородокисляющих микроорганизмов служит основанием для дальнейшей разработки препарата для утилизации тяжелой нефти белорусских месторождений.

Список использованных источников

1. Мерзляков, В. Ф. Обоснование и совершенствование технологий разработки месторождений с трудноизвлекаемыми запасами / В. Ф. Мерзляков. – М., 2003. – 267 с.
2. Беляев, С. С. Использование микроорганизмов в биотехнологии повышения нефтеизвлечения / С. С. Беляев // Микробиология. – 2004. – Т. 73, № 5. – С. 687–697.
3. Градова, Н. Б. Использование бактерий рода *Azotobacter* при биоремедиации нефтезагрязненных почв / Н. Б. Градова // Прикл. биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39, № 3. – С. 318–321.
4. Белокурова, Е. В. Влияние методов повышения нефтеотдачи пластов на надежность нефтепромыслового оборудования / Е. В. Белокурова // Успехи соврем. естествознания. – 2005. – № 6. – С. 9–18.
5. Aitken, C. M. Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs / C. M. Aitken // Nature. – 2004. – N 431. – P. 291–294.
6. Сильвестров, Л. К. Мировые запасы нефти и коэффициенты ее извлечения / Л. К. Сильвестров // Энергия: экономика, техника, экология. – 2008. – № 10. – С. 30–34.
7. Kropp, G. K. Anaerobic oxidation of n-dodecane by an addition reaction in a sulfate-reducing bacterial enrichment culture / G. K. Kropp // Appl. and Environmental Microbiol. – 2000. – Vol. 66. – N 12. – P. 5393–5398.

References

1. Merzlyakov, V. F. (2003) *Obosnovanie i sovershenstvovanie tekhnologii razrabotki mestorozhdenii s trudno izvlekaemyimi zapasami* [Rationale and improving mining technology with hard to recover reserves], Moscow, RU.
2. Belyaev, S. S. (2004) "Using microorganisms in biotechnology increase oil recovery", *Mikrobiologiya* [Microbiology], vol. 73, no. 5, pp. 687-697.
3. Gradova, N. B. (2003) "The use of bacteria of the genus *Azotobacter* with bioremediation of oil-contaminated soil", *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Appl. Biochem. and Microbiol.], vol. 39, no. 3, pp. 318-321.
4. Belokurova, E. V. (2005) "Influence of enhanced oil recovery methods on the reliability of oilfield equipment", *Successes of modern science*, no. 6, pp. 9-18.
5. Aitken, C. M. (2004) "Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs", *Nature*, no. 431, pp. 291-294.
6. Sil'vestrov, L. K. (2008) "Global oil reserves and extraction rates it", *Energy: economy, technology, environment*, no. 10, pp. 30-34.
7. Kropp, G. K. (2000) "Anaerobic oxidation of n-dodecane by an addition reaction in a sulfate-reducing bacterial enrichment culture", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 12, pp. 5393-5398.

Информация об авторах

Клишевич Наталья Геннадьевна – мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: nataliklis@mail.ru.

Самсонова Алисса Самуиловна – д-р биол. наук, профессор. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь).

Глушень Елена Михайловна – канд. биол. наук, зав. лабораторией природоохранных биотехнологий. Институт микробиологии НАН Беларуси. (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: gem@mbio.bas-net.by.

Для цитирования

Клишевич, Н. Г. Углеводородокисляющие ассоциативные культуры для деструкции тяжелой нефти / Н. Г. Клишевич, А. С. Самсонова, Е. М. Глушень // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 81–84.

Information about the authors

Klishevich Natalya Gennadievna – Junior Scientific Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus. (Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nataliklis@mail.ru

Samsonova Alissa Samuilovna – D. Sc. (Biol.), Professor. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus).

Hlushen Alena Michalovna – Ph. D. (Biol.). Head of the laboratory of Environmental biotechnologies, Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gem@mbio.bas-net.by.

For citation

Klishevich N. G., Samsonova A. S., Glushen E. M. Hydrocarbon-oxidizing associative microbial cultures eliminating heavy oil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 81–84.

Ю. В. Прищепчик

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**ВЛИЯНИЕ ПРАЙМИНГА СЕМЯН ОГУРЦА 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТОЙ
НА ЭНЕРГИЮ ПРОРАСТАНИЯ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ
В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА**

Отмечено положительное влияние биопрайминга семян огурца 5-аминолевулиновой кислотой (АЛК) на энергию прорастания, длину гипокотилей, длину и вес корней, содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в растениях, выращенных в условиях солевого стресса (50 мМ NaCl), по сравнению с проростками, не обработанными АЛК.

Ключевые слова: биопрайминг, семена огурца, АЛК, энергия прорастания, морфометрические и морфологические показатели, хлорофилл *a*, *b*, каротиноиды.

Y. V. Prischepchik

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**INFLUENCE OF CUCUMBER SEED PRIMING WITH 5-AMINOLEVULINIC ACID ON SEED VIGOR
AND PLANT DEVELOPMENT UNDER SALT STRESS**

The positive effect of cucumber seed biopriming with 5-aminolevulinic acid (ALA) on vigor, length of hypocotyl, length and weight of the roots, the content of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids in plants grown under salt stress (50 mM NaCl), compared to seedlings not treated with ALA, has been demonstrated.

Keywords: biopriming, cucumber seed, ALA, salt stress, vigor, morphometric and morphological indicators, chlorophyll *a*, *b*, carotenoids.

Введение. Прайминг – это стимуляция семян растений, за счет которой удается активизировать их прорастание, начальный и последующий рост. Для семян создаются базовые условия в виде высокой влажности и оптимальной температуры. Влажность семян доводится до уровня, близкого к тому, который необходим для реального начала прорастания, но не достигает его, а просто поддерживает процесс. Как только семена достигают состояния, необходимого для прорастания, их высушивают до первоначального уровня влажности и высаживают в емкости с водой. Таким образом, прорастание семян занимает меньше времени, поскольку часть процесса уже пройдена [1].

Если семена высаживают в условиях жары, засухи или обильных осадков, повышенной засоленности почвы (иными словами, в стрессовых условиях), химические процессы в них могут протекать сложнее, чем при минимальном стрессе или его отсутствии. В частности, при выращивании растений в условиях засоления создается осмотический стресс, вследствие чего семена теряют способность получать необходимую для прорастания воду. Также сказывается токсическое влияние ионов Na^+ и Cl^- на прорастающие семена. Это приводит к ингибированию прорастания семян и развития рассады [2]. Прайминг синхронизирует и ускоряет рост проростков, способствуя тем самым более высокой урожайности.

В настоящее время широко распространено предпосевное замачивание семян в растворах различных физиологически активных соединений, которые оказывают положительное действие на всхожесть семян, активируя в них ферменты, расщепляющие запасные органические вещества, используемые зародышем при прорастании [3]. Известно, что предшественник всех циклических (хлорофиллы, гемы, корриноиды) и линейных (билины, фикобилины) тетрапирролов, 5-аминолевулиновая кислота (АЛК), проявляет свойства физиологически активного соединения, ускоряя рост растений. АЛК усиливает синтез цитокининов, что объясняет ее росторегулирующие свойства [4–6].

Цель данной работы – исследование влияния прайминга семян огурца с помощью аминокислоты на всхожесть семян и дальнейшее развитие растений в условиях солевого стресса. Актуальность данной проблемы заключается в практическом обосновании применения данного метода для наилучшего роста растений на ранних стадиях вегетации в неблагоприятных условиях окружающей среды.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования выбран сорт огурца Кураж F1. Это самый распространенный сорт огурцов, который выращивают на приусадебных участках и агрокомбинатах Республики Беларусь. Он отлично растет как в открытом грунте, так и в теплицах. Семена были обработаны протравителем ТМТД (тетраметилтиурамдисульфид), действующим веществом которого является относящийся к классу дитиокарбаматов тирам (400 г/л), который обладает фунгицидным действием.

В опытах использовали водные растворы АЛК (5, 10 мг/л) и NaCl (50 мМ), приготовленные на дистиллированной воде комнатной температуры. Для выращивания растений использовали пластмассовые закрывающиеся емкости, дно которых покрывали фильтровальной бумагой, на которую помещали семена, смоченные соответствующими растворами. Семена огурца замачивали в течение 1 ч в дистиллированной воде (гидропрайминг), часть – в растворах АЛК (биопрайминг) и часть – в растворах NaCl (галопрайминг). Далее семена высушивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Семена, прошедшие прайминг в воде, высаживали в емкости с дистиллированной водой, остальные – в емкости с солевым раствором (50 мМ NaCl).

В ходе данного исследования определяли энергию прорастания семян, морфометрические и морфологические показатели 7-дневных проростков. В работе приведены средние значения по каждому показателю. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения SigmaPlot 11.0.

Содержание хлорофиллов (Хл) *a* и *b* и каротиноидов в семядольных листьях проростков, выросших в нормальных и стрессовых условиях, оценивали по спектрам поглощения 85 %-ных ацетоновых экстрактов семядольных листьев (спектрофотометр UVIKON 931, Германия):

$$\text{Хл } a \text{ [мкг} \cdot \text{мл}^{-1}] = 10,3A(663) - 0,918A(644),$$

$$\text{Хл } b \text{ [мкг} \cdot \text{мл}^{-1}] = 19,7A(644) - 3,87A(633),$$

$$\text{каротиноиды [мкг} \cdot \text{мл}^{-1}] = 4,75A(453) - 0,226 (\text{Хл } a + \text{Хл } b),$$

где $A(453)$, $A(644)$ и $A(633)$ – значения оптической плотности при $\lambda = 453$ нм, $\lambda = 644$ нм и $\lambda = 633$ нм соответственно [7]. Содержание фотосинтетических пигментов рассчитывали на 0,05 г сырой массы.

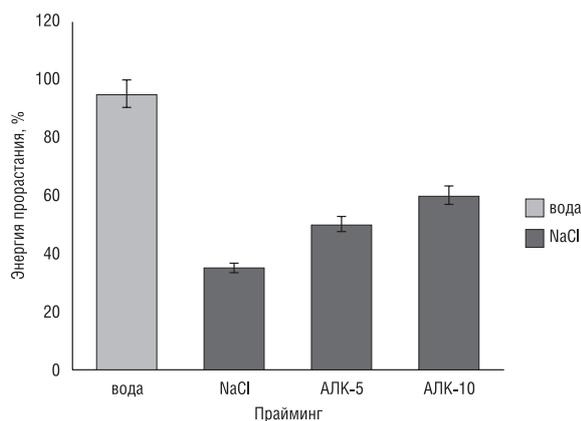


Рис. 1. Энергия прорастания семян огурцов, праймированных в воде, растворах NaCl (50 мМ) и АЛК (5 и 10 мг/л). Семена, праймированные в воде, помещали в емкости с водой, остальные – в емкости с солевым раствором (50 мМ NaCl)

Fig. 1. Energy germination cucumber seeds primed in water solutions of NaCl (50 mM) and ALA (5 and 10 mg/l). Seeds primed in water was placed in a water capacitance, and the rest – with salt solution capacitance (50 mM NaCl)

Результаты и их обсуждение. Гидропрайминг (контрольные растения) оказал положительное влияние на энергию прорастания семян огурца, а также на морфометрические и морфологические показатели 7-дневных проростков, выращенных в нормальных условиях, по сравнению с непраймированными семенами. Галопрайминг и последующее выращивание растений в условиях избыточного засоления, создаваемого 50 мМ NaCl, значительно снизили энергию прорастания (на 35 %), длину гипокотыля (на 52 %), длину (на 52 %) и вес (на 42 %) корня растений огурца по сравнению с контролем. Замачивание семян в растворах АЛК (5 и 10 мг/л), последующее их высушивание и выращивание растений на растворе 50 мМ NaCl оказало положительное воздействие на энергию прорастания семян (143 и 171 % соответственно) по сравнению с семенами, праймированными 50 мМ NaCl и выращиваемыми на этом же растворе (рис. 1). Биопрайминг с АЛК привел также к увеличению длины гипокотыля на 17 и 8 %,

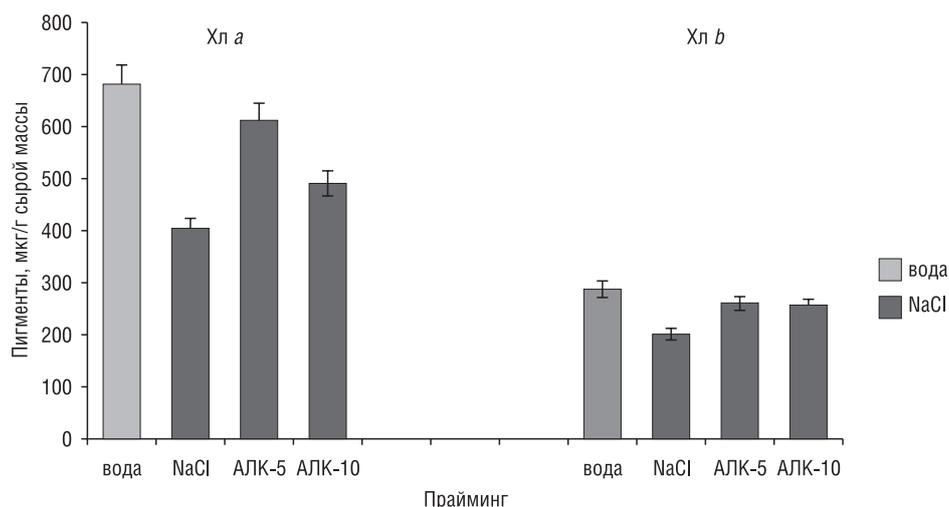


Рис. 2. Содержание Хл *a* и *b* в семядолях 7-дневных проростков огурцов, выросших либо на поверхности воды, либо в растворе NaCl (50 мМ). Прайминг семян проводили в воде, растворах NaCl (50 мМ) и АЛК (5 и 10 мг/л)

Fig. 2. The content of chlorophyll *a* and *b* in the cotyledons of 7-day old cucumber seedlings grown either on a water surface or in a solution of NaCl (50 mM). Seed priming was performed in water, solutions of NaCl (50 mM) and ALA (5 and 10 mg/l)

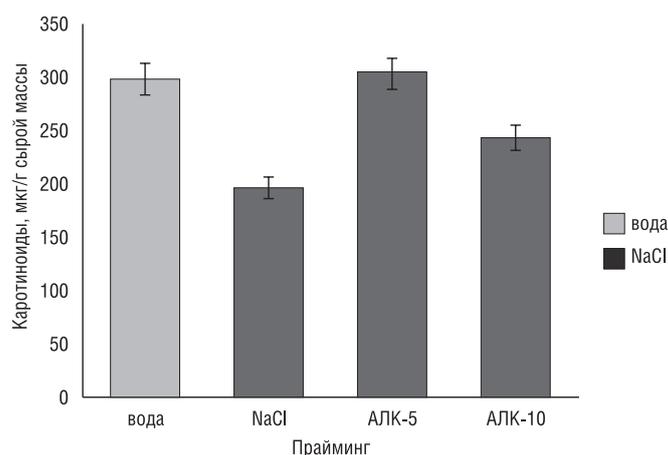


Рис. 3. Содержание каротиноидов в семядолях 7-дневных проростков огурцов, выросших либо на поверхности воды, либо в растворе NaCl (50 мМ). Прайминг семян проводили в воде, растворах NaCl (50 мМ) и АЛК (5 и 10 мг/л)

Fig. 3. The content of carotenoids in the cotyledons of 7-day old cucumber seedlings grown either on a water surface or a solution of NaCl (50 mM). Seed priming was performed in water, solutions of NaCl (50 mM) and ALA (5 and 10 mg/l)

корня – на 19 и 23, веса корня – на 33 и 33 % по сравнению с растениями, семена которых получили обработку NaCl. Обе концентрации АЛК восстанавливали морфологические характеристики растений практически до уровня выращиваемых на воде. Прайминг семян с АЛК (5 мг/л) стимулировал накопление пигментов в семядольных листьях растений, выращиваемых на 50 мМ NaCl, по сравнению с растениями, праймированными NaCl и выращиваемыми на солевом растворе. Так, содержание Хл *a* в растениях, праймированных АЛК, увеличилось на 52 %, Хл *b* – на 30 % (рис. 2), каротиноидов – на 54 % (рис. 3). Таким образом, полученные результаты указывают на возможность применения биопрайминга семян в растворах АЛК для стимулирования их прорастания и улучшения роста культурных растений в стрессовых условиях.

Заключение. Положительное влияние биопрайминга семян в растворах АЛК 5 и 10 мг/л на энергию прорастания и последующий рост растений огурца, выращиваемых в стрессовых условиях, создаваемых засолением (50 мМ NaCl), указывает на возможность применения данного метода с целью стимулирования прорастания семян и улучшения роста культурных растений на ранних стадиях вегетации в стрессовых условиях.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Овощеводство [Электронный ресурс]. – 2012. – № 11, 12. – Режим доступа: www.ovoshevodstvo.com. – Дата доступа: 27.06.2014.
2. Mohammadi, G. R. The influence of NaCl priming on seed germination and seedling growth of canola (*Brassica napus* L.) under salinity conditions / G. R. Mohammadi // Am.-Eur. J. Agric. & Environ. Sci. – 2009. – Vol. 5 (5). – P. 696–700.
3. Бабенко, О. Н. Влияние предпосевного прайминга на активность нитратредуктазы житника (*Agropyron cristatum* subsp. *kazakhstanicum*) в условиях солевого стресса / О. Н. Бабенко, М. Саги, З. А. Аликулов // Репозиторий Евраз. ун-та имени Л. Н. Гумилева. – Режим доступа: www.repository.enu.kz. – Дата доступа: 19.07.2014.
4. Аверина, Н. Г. Биосинтез тетрапирролов в растениях / Н. Г. Аверина, Е. Б. Яронская. – Минск: Беларус. навука, 2012. – С. 224–259.
5. Beale, S. I. Biosynthesis of the tetrapyrrole pigment precursor, 5-aminolevulinic acid, from glutamate / S. I. Beale // Plant Physiol. – 1990. – Vol. 93 (4). – P. 1273–1279.
6. Willows, R. D. Chlorophylls: encyclopaedia of plant and crop science / R. D. Willows, Robert M. Godman, Marcel Dekker. – London, 2004. – P. 258–262.
7. Шлык А. А. Биохимические методы в физиологии растений / А. А. Шлык; под ред. О. А. Павлиной. – М.: Наука, 1971. – С. 154–170.

References

1. "Vegetable", 2012, no. 11, 12, Available at: www.ovoshevodstvo.com, (accessed 06/27/2014).
2. Mohammadi, G. R. (2009) "The influence of NaCl priming on seed germination and seedling growth of canola (*Brassica napus* L.) under salinity conditions", *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, vol. 5 (5), pp. 696–700.
3. Babenko, O., Sagi, M. and Alikulov, Z. A. "Effect of priming on Zhitnik nitratereductase activity (*Agropyron cristatum* subsp. *Kazakhstanicum*) under salt stress", *Repozitorii Evraziiskogo Natsional'nogo universiteta im. L. N. Gumileva* [Repository Evraz. Univ. named after L. N. Gumilyov], Available at: www.repository.enu.kz, (accessed 07/19/2014).
4. Averina, N. G. and Yaronkaya, E. B. (2012) *Biosintez tetrapirrolov v rasteniyakh* [Tetrapyrrole biosynthesis in plants], Belarus. Navuka, Minsk, BY.
5. Beale, S. I. (1990) "Biosynthesis of the tetrapyrrole pigment precursor, 5-aminolevulinic acid, from glutamate", *Plant Physiology*, vol. 93 (4), pp. 1273–1279.
6. Willows, R. D. (2004). "Chlorophylls", in Goodman, Robert M. (ed.) *Encyclopaedia of Plant and Crop Science*. Marcel Dekker, pp. 258–262.
7. Shlyk, A. A. (1971) "Determination of chlorophylls and carotenoids in extracts of green leaves", in Pavlina, O. A. (ed.) *Biokhimicheskie metody v fiziologii rastenii* [Biochemical methods in plant physiology], Nauka, Moscow, RU, pp. 154–170.

Информация об авторе

Прищепчик Юлия Владимировна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yuliya_prishchepchik@mail.ru

Information about the author

Prishchepchik Yuliya Vladimirovna – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya Str., 27, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yuliya_prishchepchik@mail.ru

Для цитирования

Прищепчик, Ю. В. Влияние прайминга семян огурца 5-аминолевулиновой кислотой на энергию прорастания и развитие растений в условиях солевого стресса / Ю. В. Прищепчик // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 85–88.

For citation

Prishchepchik Y. V. Influence of cucumber seed priming with 5-aminolevulinic acid on seed vigor and plant development under salt stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 85–88.

В. В. Кондратьева, Л. Ф. Кабашникова, Г. Е. Савченко

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКЗОГЕННОЙ В-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ
НА РАСТЕНИЯ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE L.*)
ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *BIPOLARIS SOROKINIANA* SHOEM**

Изучено действие экзогенной β-аминомасляной кислоты (β-АМК) на растения ярового ячменя (*Hordeum vulgare L.*) сорта Магутны в контролируемых условиях вегетации. На фазе 4-го листа растения обрабатывали раствором, содержащим водорастворимый полимер и β-АМК, а через 1 и 9 сут их заражали спорами гриба *Bipolaris sorokiniana* Shoem (*B. sorokiniana*). Спустя 21 сут после первой обработки растения, достигшие к этому времени фазы колошения, опрыскивали еще раз раствором полимера с β-АМК. Оценивали поражение растений, морфологию, содержание фотосинтетических пигментов и урожайность. Праймирующее влияние экзогенной β-АМК на растения ячменя проявлялось в снижении количества пораженных грибами *B. sorokiniana* растений, улучшении морфологических и фотосинтетических показателей на фоне заражения и увеличении массы зерна с одного растения.

Ключевые слова: яровой ячмень, β-аминомасляная кислота, *Bipolaris sorokiniana*, морфология, урожай.

V. V. Kondratjeva, L. F. Kabashnikova, G. E. Savchenko

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**PROTECTIVE ACTION OF B-AMINOBUTYRIC ACID ON BARLEY PLANTS (*HORDEUM VULGARE L.*)
INFECTED BY *BIPOLARIS SOROKINIANA* SHOEM**

Action of the exogenous beta-aminobutyric acid (BABA) on plants of spring barley (*Hordeum vulgare L.*) variety Magutni in the conditions of vegetative pot experiment was investigated. On a phase of 4th-leave a plants was treated by a solution containing water-soluble polymer and BABA, and in 1 and 9 days their was infected by mushroom *Bipolaris sorokiniana*. On 21 day after the first treatment the plants which have reached of a phase of heading, sprayed once again a solution of polymer with BABA. Degree of diseased plants, morphology, the content of photosynthetic pigments and a grain crop were estimated. Improvement of morphological and photosynthetic characteristics against infection and increase in weight of grain from one plant is established priming action of the exogenous BABA on the barley plants, caused decrease in degree of infection by mushrooms *Bipolaris sorokiniana*.

Keywords: spring barley, beta-aminobutyric acid, *Bipolaris sorokiniana*, morphology, grain crop.

Введение. Перспективным направлением в борьбе за урожай и экологию в настоящее время является повышение общей неспецифической устойчивости растений (иммунного статуса) к неблагоприятным факторам биотической природы путем индукции природных защитных механизмов с помощью разнообразных химических соединений [1, 2]. Если исходить из безопасности любых защитных веществ для человека и природы в целом как главном требовании времени, то она должна перевешивать их возможную меньшую эффективность по сравнению с химическими пестицидами. Один из популярных индукторов фитозащиты – β-аминомасляная кислота (β-АМК), отсутствующая в растениях (по сути, ксенобиотик). Она является изомером γ-АМК, характерной для клеток животных. Следует отметить, что практическое использование почти всех известных защитных веществ, и β-АМК не исключение, опережает или идет параллельно с раскрытием механизмов их действия. Наличие в растениях рецептора β-АМК, выявленное совсем недавно [3], вносит существенные коррективы в существовавшие до сих пор представления о механизме действия этого индуктора.

Несмотря на доступность по цене и сравнительную безопасность и эффективность β-АМК как индуктора (праймера), особые опасения вызывает возможность ингибирования ею ростовых

процессов при концентрациях, превышающих 10^{-3} М, наблюдавшаяся рядом исследователей [4]. Уже сейчас ясно, что дальнейшее исследование механизмов β -АМК-индуцированной устойчивости, как и разработка защитных препаратов на ее основе, требует детального изучения особенностей влияния β -АМК на разные виды растений в конкретных климатических условиях. Проведенные нами эксперименты с проростками ячменя, выращенными в лабораторных условиях, позволили установить защитный эффект обработки растений в 4-дневном возрасте водным раствором β -АМК $(1-2,5) \cdot 10^{-4}$ М за сутки до заражения *bipolaris sorokiniana* shoem (далее – *B. sorokiniana*), выразившийся в снижении количества пораженных грибом проростков к 11-дневному возрасту [5]. Из литературы известно, что защитный эффект β -АМК проявляется в онтогенезе и становится заметным в листьях вышележащих ярусов после нанесения β -АМК на листья нижних ярусов [1].

Цель работы – оценить влияние экзогенной β -АМК в условиях вегетации как на морфологические показатели растения в онтогенезе, так и на конечный урожай зерна.

Объекты и методы исследования. Работу проводили с растениями ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Магутны, выращенными в вегетационных сосудах (40 семян на сосуд площадью 283,4 см²), размещенных на открытой площадке в естественных природных условиях на территории ЦБС НАН Беларуси. Половину сосудов использовали для анализа морфологии и биохимических показателей, вторую половину – только для оценки урожая зерна. Обработку растений водным раствором, содержащим в качестве прилипателя водорастворимый полимер (ВРП, 0,4 %) и β -АМК $(2,5 \cdot 10^{-4}$ М), из расчета 1 мл раствора на сосуд, проводили в фазе 4-го листа (ДК 31 по коду Задокса) и через 21 сут после первой обработки – в фазе колошения (ДК 39-41). Выбор концентрации β -АМК основан на данных, полученных ранее в ходе экспериментов на проростках ячменя [5]. Заражение спорами гриба *B. sorokiniana* (10^6 спор на 1 мл суспензии) осуществляли через 1 и 9 сут с момента первой обработки иммуномодулятором. Распространение заболевания оценивали визуально путем подсчета количества растений с характерной для *B. sorokiniana* картиной поражения. Урожай оценивали по массе зерна в сосуде и одном растении и по массе 1000 зерен. Содержание пигментов определяли спектрофотометрически [6].

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 показано изменение высоты растений в онтогенезе при развитии в сосудах в естественных условиях и отсутствие достоверного влияния β -АМК на

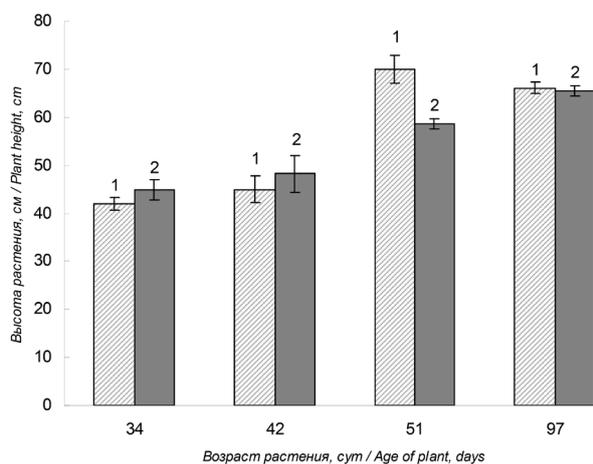


Рис. 1. Влияние экзогенной β -АМК на высоту растений ярового ячменя сорта Магутны при естественном инфицировании в условиях вегетационного эксперимента (1 – контроль, 2 – β -АМК). Обработка раствором, содержащим β -АМК, проведена в возрасте 26 и 47 сут

Fig. 1. Effect of exogenous BABA to the height of the plants of spring barley varieties Magutny in natural infection in a growing experiment (1 – control, 2 – BABA)

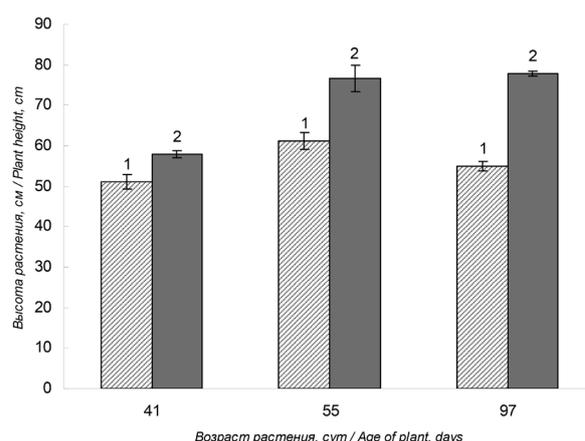


Рис. 2. Влияние экзогенной β -АМК на высоту растений ярового ячменя сорта Магутны при инфицировании *Bipolaris sorokiniana* в условиях вегетационного эксперимента (1 – *B. sorokiniana*, 2 – β -АМК + *B. sorokiniana*). Обработка раствором, содержащим β -АМК, проведена в возрасте 26 и 47 сут, инокуляция спорами гриба – в возрасте 27 и 35 сут

Fig. 2. Effect of exogenous BABA to the height of the plants of spring barley varieties Magutny infected by *Bipolaris sorokiniana* in a growing experiment (1 – control, 2 – BABA)

их рост. Тенденция к снижению последнего, наблюдавшаяся на 51-е сутки вегетации спустя только 4 сут после второй обработки иммуномодулятором, не подтвердилась в ходе дальнейшего онтогенеза, что, скорее всего, может быть следствием случайной выборки. В сосудах с максимальным количеством растений на это указывают данные измерений на заключительном этапе эксперимента (учитывались только параметры, характеризующие урожай (последняя пара столбиков на диаграмме рис. 1)). Следует отметить, что на фоне грибного заражения четко проявилось стимулирующее влияние β -АМК на высоту растений (рис. 2), которая увеличивалась в онтогенезе и в конце вегетации составила 140 % от высоты незараженных растений ($t = 17,3$; $P(t) < 0,001$). На отсутствие достоверных изменений других морфологических параметров растений ячменя в онтогенезе под влиянием β -АМК указывают данные табл. 1.

В табл. 2 приведено содержание фотосинтетических пигментов в подфлаговом листе. Существенного и статистически достоверного изменения количества хлорофиллов и каротиноидов в различных вариантах эксперимента не наблюдалось. В то же время после инокуляции посевов спорами гриба фотосинтетические показатели на исследованных этапах онтогенеза не уступали таковым в незараженных растениях.

Т а б л и ц а 1. Онтогенетические изменения морфологических показателей растений ячменя, не подвергавшихся грибному заражению

Возраст растений, сут	Вариант	К-во побегов	К-во листьев на главном побеге	Масса листьев главного побега, г	Масса растения, г
33	Контроль	1,6 ± 0,2	5,2 ± 0,4	1,17 ± 0,09	2,62 ± 0,42
	β -АМК*	2,5 ± 0,3	5,0 ± 0,0	1,21 ± 0,11	3,53 ± 0,43
42	Контроль	2,6 ± 0,5	4,4 ± 0,2	0,92 ± 0,12	4,00 ± 0,79
	β -АМК*	2,4 ± 0,2	4,4 ± 0,2	0,87 ± 0,15	3,32 ± 0,53
51	Контроль	1,3 ± 0,2	2,6 ± 0,4	0,99 ± 0,13	4,16 ± 0,62
	β -АМК**	2,4 ± 0,2	2,6 ± 0,2	1,00 ± 0,14	4,52 ± 0,38

П р и м е ч а н и е. * – растения однократно обработаны раствором, содержащим β -АМК, в возрасте 26 сут; ** – растения обработаны раствором, содержащим β -АМК, в возрасте 26 и 47 сут.

Т а б л и ц а 2. Влияние обработки β -АМК и заражения *B. sorokiniana* на содержание фотосинтетических пигментов (мкг/см²) в подфлаговом листе

Возраст растений, сут	Обработка β -АМК	Заражение <i>B. sorokiniana</i> ***	Хл (a + b)	Хл a/Хл b	Каротиноиды	Хл (a + b)/каротиноиды
42	–	–	22,91 ± 2,33	3,30 ± 0,20	6,06 ± 0,60	3,79 ± 0,09
	+	–	25,42 ± 0,99	3,54 ± 0,08	6,74 ± 0,24	3,77 ± 0,03
41	–	+	28,85 ± 1,88	3,21 ± 0,04	7,15 ± 0,45	4,04 ± 0,03
	+	+	28,38 ± 1,45	3,23 ± 0,12	7,09 ± 0,29	4,00 ± 0,04
51	–	–	21,52 ± 2,06	2,99 ± 0,15	5,69 ± 0,32	3,77 ± 0,15
	+	–	27,48 ± 3,01	3,20 ± 0,15	6,93 ± 0,80	4,12 ± 0,28
55	–	+	23,86 ± 2,87	3,18 ± 0,08	6,76 ± 0,84	3,53 ± 0,10
	+	+	22,39 ± 2,60	3,06 ± 0,06	6,39 ± 0,61	3,50 ± 0,15

П р и м е ч а н и е. * – растения однократно обработаны раствором, содержащим β -АМК, в возрасте 26 сут; ** – растения обработаны раствором, содержащим β -АМК, в возрасте 26 и 47 сут; *** – инокуляция спорами гриба проведена в возрасте 26 и 35 сут.

В табл. 3 показано влияние однократной обработки растений раствором β -АМК на стадии 4-го листа на распространенность заболевания бурой пятнистостью, вызванного инокуляцией растений спорами *B. sorokiniana* в условиях естественного роста, т. е. на фоне естественного инфицирования. Состояние растений анализировали на 41-е и 42-е сутки вегетации, т. е. через 6 и 7 сут после заражения *B. sorokiniana* для β -АМК и контрольного вариантов соответственно. Из табл. 3 видно, что около 30 % растений, развивающихся в естественных условиях, имели

признаки заболеваний, не связанных с заражением *B. sorokiniana* (варианты 1 и 2). Однако даже однократная обработка растений на стадии 4-го листа раствором, содержащим иммуномодулятор, приводила к снижению почти на 30 % количества пораженных растений через неделю после заражения *B. sorokiniana* (варианты 3 и 4).

Т а б л и ц а 3. Влияние β-АМК на поражение растений ячменя грибной инфекцией

Вариант	Обработка β-АМК*	Заражение <i>B. sorokiniana</i> **	К-во учтенных растений (1)	К-во пораженных растений (2)	Общее поражение (2:1), %	К-во пораженных растений после заражения <i>B. sorokiniana</i> *
1	–	–	63	19	30,2	–
2	+	–	67	20	29,9	–
3	–	+	65	36	55,4	25,2 (100 %)
4	+	+	67	32	47,8	17,9 (71 %)

П р и м е ч а н и е. * – растения однократно обработаны раствором, содержащим β-АМК, в возрасте 26 сут; ** – инокуляция спорами *B. sorokiniana* проведена в возрасте 27 и 35 сут.

В табл. 4 приведены данные, характеризующие урожайность исследованных растений. Видно, что после грибного заражения урожай зерна с одного растения снизился почти в 1,8 раза по сравнению с контрольными растениями, не обработанным β-АМК. Двукратная обработка растений β-АМК на фоне их инокуляции спорами *B. sorokiniana* способствовала еще большему увеличению массы зерна с одного проростка (в 1,9 раза) по сравнению с вариантом без обработки. Эти данные указывают на перспективность использования β-АМК для защиты посевов ячменя, несмотря на то что использованная нами обработка не полностью останавливала инфицирование (по крайней мере, на рассматриваемом этапе онтогенеза, см. табл. 3).

Т а б л и ц а 4. Влияние β-АМК на показатели урожая растений ячменя в вегетационном опыте в условиях естественного и экзогенного грибного заражения

Обработка β-АМК	Заражение <i>B. sorokiniana</i>	Масса стеблей/1 раст., г	К-во колосьев/1 раст.	Масса зерна/1 раст., г	Масса 1000 зерен, г
–	–	0,79 ± 0,06	1,5 ± 0,15	0,65 ± 0,07	50,8 ± 0,5
+	–	0,76 ± 0,09	1,7 ± 0,12	0,76 ± 0,07	48,3 ± 0,3
–	+	0,74 ± 0,07	0,9 ± 0,07	0,37 ± 0,03	47,3 ± 0,5
+	+	0,78 ± 0,07	1,5 ± 0,11	0,71 ± 0,07	45,8 ± 1,0

Заключение. Несмотря на высказывавшиеся в литературе опасения, связанные с возможностью ингибирования роста растений при обработке их экзогенной β-АМК [4], использованная в настоящей работе концентрация β-АМК ($2,5 \cdot 10^{-4}$ М), действие которой исследовано нами ранее на проростках ячменя [5], не ингибировала этот процесс в онтогенезе, а на фоне экзогенного инфицирования *B. sorokiniana* даже стимулировала его. Механизмы метаболизма растений при действии иммуномодулятора и грибной инфекции сложны и пока непонятны, особенно в отсутствие данных по фитогормонам. Тем не менее, уже сейчас можно говорить о важном в регуляторном отношении действии β-АМК, приводящем к изменению соотношения свободной и связанной форм эндогенной салициловой кислоты, вовлеченной в ответные реакции на грибное заражение в проростках ячменя [7]. Таким образом, праймирующее влияние экзогенной β-АМК на растения ячменя хотя и не привело к полной защите растений от поражения листьев грибом *B. sorokiniana*, но улучшило морфологические показатели на фоне заражения и вызвало увеличение массы зерна с одного растения, вероятнее всего, за счет конечного влияния на количество продуктивных побегов. Изучение влияния β-АМК на основные биохимические и биофизические параметры растений, изменение которых может противодействовать инфицированию, требует дальнейших исследований.

Список использованных источников

1. Cohen, Y. R. β-aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens / Y. R. Cohen // Plant Dis. – 2002. – Vol. 86. – P. 448–457.
2. Тютюрев, С. Л. Экологически безопасные индукторы устойчивости растений к болезням и физиологическим стрессам / С. Л. Тютюрев // Вестн. защиты раст. – 2015. – Т. 1 (83). – С. 3–13.

3. Plant perception of β -aminobutyric acid is mediated by an aspartyl-tRNA synthetase / E. Luna [et al.] // *Nat. Chem. Biol.* – 2014. – Vol. 10, N 6. – P. 450–456.
4. Beckers, G. J. M. Priming for stress resistance: from the lab to the field / G. J. M. Beckers, U. Conrath // *Curr. Opin. in Plant Biol.* – 2007. – Vol. 10. – P. 425–431.
5. Влияние β -аминоасляной кислоты на морфологические и фотосинтетические показатели здоровых и инфицированных *Bipolaris sorokiniana* зеленых проростков ячменя / В. В. Кондратьева [и др.] // *Современные проблемы биохимии: сб. материалов конф. молодых ученых-биохимиков с междунар. участием, посвящ. 90-летию со дня рожд. академика Ю. С. Островского.* – Гродно, 2015. – С. 63–66.
6. Шлык, А. А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // *Биохимические методы в физиологии растений* / А. А. Шлык. – М., 1971. – С. 154–170.
7. Действие экзогенной β -аминоасляной кислоты на структурно-функциональное состояние растений ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) при абиотическом и биотическом стрессе / Л. Ф. Кабашникова [и др.] // *Регуляция роста и развития растений: сб. материалов VIII Междунар. науч. конф.* – Минск, 2015. – С. 46.

References

1. Cohen, Y. R. (2002) “ β -aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens”, *Plant Diseases*, vol. 86, pp. 448-457.
2. Tyuterev, S. L. (2015) “Ecologically safe inducer of plant resistance to diseases and physiological stresses”, *Vestnik zashchity rastenii* [Plant Protection News], vol. 1 (83), pp. 3-13.
3. Luna, E., van Hulten, M., Zhang, Y., Berkowitz, O., Lopez, A., Petriacq P., Sellwood, M. A., Chen, B., Burrell, M., van de Meene, A., Pieterse, C. M., Flors, V. and Ton, J. (2014) “Plant perception of β -aminobutyric acid is mediated by an aspartyl-tRNA synthetase”, *National Chemistry Biology*, vol. 10, no. 6, pp. 450-456.
4. Beckers, G. J. M. and Conrath, U. (2007) “Priming for stress resistance: from the lab to the field”, *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 10, pp. 425-431.
5. Kondrat'eva, V. V., Kabashnikova, L. F., Abramchik, L. M. and Savchenko, G. E. (2015) “Effect of β -aminobutyric acid on morphological and photosynthetic characteristics of healthy and infected by *Bipolaris sorokiniana* green barley seedlings”, *Sovremennye problemy biokhimii: sb. materialov konf. molodykh uchennykh-biokhimikov s mezhdunar. uchastiem, posvyashch. 90-letiyu so dnya rozhd. akademika Yu. S. Ostrovskogo* [Modern problems of biochemistry: Proceedings of the conference of young scientists-biochemists with international participation, dedicated to the 90th anniversary of Academician Yu. M. Ostrowski], 29 June 2015, Grodno Institute of Biochemistry of biologically active compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, pp. 63-66.
6. Shlyk, A. A. (1971) “Determination of chlorophyll and carotenoids in extracts of green leaves”, *Biokhimicheskie metody v fiziologii rastenii* [Biochemistry methods in physiology of plant], Nauka, Moscow, RU, pp. 154-170.
7. Kabashnikova, L. F., Savchenko, G. E., Abramchik, L. M. and Kondrat'eva, V. V. (2015) “Effect of exogenous β -aminobutyric acid on the structural and functional state of the spring barley plants (*Hordeum vulgare* L.) under abiotic and biotic stress”, *Regulyatsiya rosta i razvitiya rastenii: sb. materialov VIII Mezhdunar. nauch. konf.* [VIII International Scientific Conference “Regulation of Plant Growth and Development”], Minsk, BY, pp. 46.

Информация об авторах

Кондратьева Виктория Викторовна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vislika@mail.ru

Кабашникова Людмила Федоровна – д-р биол. наук, доцент, зав. лабораторией прикладной биофизики и биохимии. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kabashnikova@ibp.org.by

Савченко Галина Евсеевна – канд. биол. наук, старш. науч. сотрудник, доцент. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: gesavchenko@gmail.com

Для цитирования

Кондратьева, В. В. Защитное действие экзогенной β -аминоасляной кислоты на растения ячменя (*Hordeum vulgare* L.) при инфицировании *Bipolaris sorokiniana* Shoem / В. В. Кондратьева, Л. Ф. Кабашникова, Г. Е. Савченко // *Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2016. – № 4. – С. 89–93.

Information about the authors

Kondratjeva Viktoria Viktorovna – Junior Scientific Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya str., 27, Minsk, 220072, Republic of Belarus). E-mail: vislika@mail.ru

Kabashnikova Liudmila Fjedorovna – D. Sci. (Biol.), Assoc. Prof. Head of Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya str., 27, Minsk, 220072, Republic of Belarus). E-mail: kabashnikova@ibp.org.by

Savchenko Galina Evseevna – Ph. D. (Biol.), Assoc. Prof. Senior Scientific Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya str., 27, Minsk, 220072, Republic of Belarus). E-mail: gesavchenko@gmail.com

For citation

Kondratjeva V. V., Kabashnikova L. F., Savchenko G. E. Protective action of exogenous β -aminobutyric acid in barley plants (*Hordeum vulgare* L.) infection by *Bipolaris sorokiniana* Shoem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 89–93.

Ю. С. Леоник, Е. Н. Голубева, Т. А. Кулагова

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ БЕЛКА CH13L1 НА КИСЛОРОДАКТИВИРУЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ ФАГОЦИТОВ

Целью данной работы являлось выявление механизмов генерации активных форм кислорода и хлора фагоцитами в присутствии белка CH13L1. Установлено, что воздействие CH13L1 приводит к снижению кислородоактивирующей способности фагоцитов. CH13L1 может регулировать протекание свободнорадикальных процессов в фагоцитах за счет взаимодействия с активными формами кислорода и хлора и усиления секреции миелопероксидазы.

Ключевые слова: CH13L1, миелопероксидаза, хемилюминесценция, активные формы кислорода, нейтрофилы, моноциты.

Y. Leonik, E. Golubeva, T. Kulahava

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

PROTEIN CH13L1 EFFECT ON PHAGOCYTES OXYGEN ACTIVATING ABILITY

The aim of this study is to identify the mechanisms of reactive oxygen and chlorine species generation by phagocytes in the presence of protein CH13L1. It has been established, that CH13L1 addition leads to the decrease of phagocytes oxygen activating ability. CH13L1 can regulate free-radical processes in phagocytes through interaction with reactive oxygen and chlorine species and enhancement of myeloperoxidase secretion.

Keywords: CH13L1, myeloperoxidase, chemiluminescence, reactive oxygen species, neutrophils, monocytes.

Введение. Хитиназа-3-подобный белок I типа (CH13L1, YKL-40, HC-gp39) представляет собой гликопротеин семейства гликозидаз (гликозилгидролаз К.Ф. 3.2.1) 18 и является аналогом хитиназ – группы ферментов, катализирующих расщепление хитина. CH13L1 способен связывать с высоким сродством хитины различной длины и с меньшим сродством гепарин и коллаген I типа, однако каталитической хитиназной активности белок не проявляет. Ген белка CH13L1 экспрессируется в клетках различных типов, включая макрофаги, нейтрофилы, хондроциты, фибробласты, гладкомышечные клетки сосудов, а также эпителиальные клетки толстого кишечника и дыхательных путей [1]. CH13L1 не образуется в моноцитах и практически отсутствуют в дендритных клетках, однако продукция белка возрастает на последних стадиях дифференцировки макрофагов, поэтому CH13L1 исследуют как маркер дифференцировки этих клеток [2]. Экспрессия CH13L1 регулируется разнообразными цитокинами и гормонами [3]. Известно, что опухолевые клетки различных типов продуцируют CH13L1 [4]. Повышенная концентрация CH13L1 в плазме крови человека сопровождается развитием воспалительных и онкологических заболеваний, таких как артрит, тяжелые бактериальные инфекции, опухоли молочной железы, яичников, простаты, мозга, легких и др. [5]. Установлено, что CH13L1 может выступать в качестве митогена, хемотаксического фактора и фактора адгезии. Однако, несмотря на обилие литературных данных о роли белка CH13L1 при воспалении, механизмы действия CH13L1 на активацию клеток иммунной системы не установлены.

Цель данного исследования – выявление механизмов генерации активных форм кислорода и хлора моноцитами и нейтрофилами крови в присутствии белка CH13L1.

Материалы и методы исследования. Нейтрофилы и мононуклеары выделяли из периферической крови здоровых доноров в соответствии с методикой [6]. Выделение миелопероксидазы

(МПО) из нейтрофилов (10^6 клеток в 1 мл) проводили методом трехкратного замораживания/размораживания суспензии клеток. Обломки клеточных мембран и органелл удаляли путем центрифугирования в течение 25 мин при 800 g. Для исследований использовали супернатант, содержащий МПО.

Генерацию активных форм кислорода и хлора (АФКХ) фагоцитами исследовали хемилюминесцентным (ХЛ) методом с применением компьютеризированного измерительного комплекса, включающего биоchemiluminometer БХЛ-1 (БГУ, Минск, Беларусь) и систему регистрации и обработки сигналов Unichrom («Новые аналитические системы», Минск, Беларусь). Образование супероксидных анион-радикалов определяли методом люцигенинопосредованной ХЛ (люц-ХЛ). Суммарное количество АФКХ оценивали с помощью люминолопосредованной ХЛ (люм-ХЛ). Измерения проводили при $T = 37^\circ\text{C}$ в сбалансированном солевом растворе Эрла (pH = 7,4) с использованием $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л люминола и $1,25 \cdot 10^{-5}$ моль/л люцигенина. Оценивали интегральную интенсивность (ИИ) ХЛ как площадь под кинетической кривой ХЛ.

Образование АФК в модельных системах регистрировали с помощью метода люм-ХЛ. Использовали следующие модельные системы: МПО–люминол– H_2O_2 , H_2O_2 –люминол, NaOCl –люминол, пероксидаза хрена (ПХ)–люминол– H_2O_2 . Концентрации реагентов: $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л H_2O_2 , $7,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л NaOCl , $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л люминола.

Секрецию МПО нейтрофилами исследовали методом конфокальной флуоресцентной микроскопии с использованием специфических к МПО антител и спектрально-аналитического комплекса NanoFinder®HighEnd (Lotis ТП, Минск, Беларусь – Tokyo Instruments, Токио, Япония). Выход МПО во внеклеточное пространство в супернатанте стимулированных адгезией нейтрофилов определяли методом люм-ХЛ.

Результаты и их обсуждение. Нейтрофилы и моноциты при активации продуцируют АФКХ. В данной работе в качестве активирующих факторов использовали хемотаксический пептид fMLP и адгезию к субстрату (стеклу) [7]. Как видно из данных, представленных на рис. 1, интенсивность люм-ХЛ в образцах, содержащих нейтрофилы (рис. 1, а), значительно выше, чем интенсивность люм-ХЛ в образцах с мононуклеарами (рис. 1, б) [8]. Это объясняется тем, что содержание МПО в несколько раз выше в азурофильных гранулах нейтрофилов, чем в моноцитах. Выявлено, что добавление CHI3L1 в концентрации $2,5 \cdot 10^{-9}$ моль/л к суспензии фагоцитов приводит к снижению интенсивности люм-ХЛ клеток (рис. 1, кривые 1). Анализ значений ИИ люм-ХЛ мононуклеаров и нейтрофилов в присутствии белка CHI3L1 показал, что продукция АФКХ адгезирующими нейтрофилами снижается на 34 %, а мононуклеарами – на 26 % относительно контрольного значения. При этом форма кинетических кривых фагоцитов при действии белка не изменяется.

Продукция АФКХ фагоцитами обусловлена функционированием НАДФН-оксидазы и МПО [9]. В первые минуты после стимуляции клеток происходит сборка НАДФН-оксидазы на поверхности

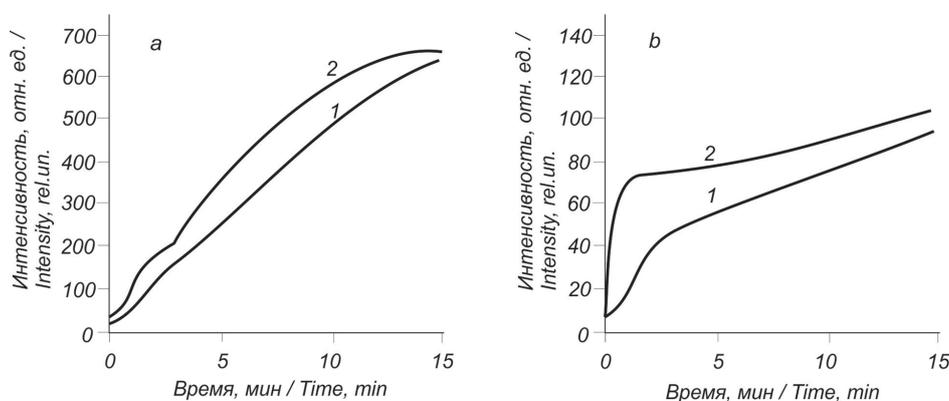


Рис. 1. Типичные кинетические кривые интенсивности люм-ХЛ стимулированных адгезией к стеклу нейтрофилов (а) и мононуклеаров (б) (кривые 2) при действии CHI3L1 в концентрации $2,5 \cdot 10^{-9}$ моль/л (кривые 1)

Fig. 1. Typical luminol-enhanced chemiluminescence kinetics of stimulated by adhesion to glass neutrophils (a) and mononuclears (b) (kinetics 2) at the addition of CHI3L1 in $2,5 \cdot 10^{-9}$ mol/l concentration (kinetics 1)

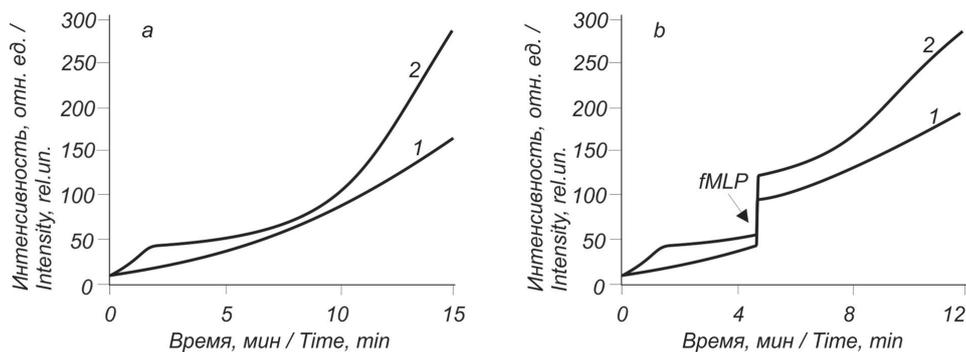


Рис. 2. Типичные кинетические кривые интенсивности люци-ХЛ стимулированные адгезией к стеклу (a) и fMLP (b) нейтрофилов (кривые 2) при действии белка CHI3L1 в концентрации $2,5 \cdot 10^{-9}$ моль/л (кривые 1)

Fig. 2. Typical luminol-enhanced chemiluminescence kinetics of stimulated by adhesion to glass (a) and fMLP (b) neutrophils (kinetics 2) at the addition of CHI3L1 in $2,5 \cdot 10^{-9}$ mol/l concentration (kinetics 1)

плазматической мембраны клетки и активируются процессы секреции МПО во внеклеточную среду. НАДФН-оксидаза восстанавливает молекулярный кислород до супероксидных анион-радикалов ($O_2^{\bullet-}$), которые являются первичными АФК и запускают цепь свободнорадикальных реакций. Поэтому активация НАДФН-оксидазного комплекса является необходимым этапом для генерации АФКХ фагоцитами. В результате реакции дисмутации $O_2^{\bullet-}$ образуется пероксид водорода. H_2O_2 , в свою очередь, является субстратом МПО, катализирующей окисление хлорид-ионов до хлорноватистой кислоты в галогенирующем цикле этого фермента [10]. С целью выявления влияния белка на функционирование НАДФН-оксидазы исследована продукция $O_2^{\bullet-}$ фагоцитами с использованием специфического индикатора супероксидных анион-радикалов – люцигенина [11]. Как видно из данных, представленных на рис. 2, при действии CHI3L1 снижается генерация $O_2^{\bullet-}$ нейтрофилами, стимулированными адгезией к стеклу (рис. 2, a) и fMLP (рис. 2, b). Снижение продукции $O_2^{\bullet-}$ на 20–25 % наблюдается при стимуляции нейтрофилов адгезией к стеклу и на 25–30 % при действии fMLP.

Интегральная интенсивность люм-ХЛ в модельных системах в присутствии белка CHI3L1

Белок	ИИ люм-ХЛ, % от контроля			
	МПО- H_2O_2	H_2O_2	NaOCl	ПХ
CHI3L1, $2,5 \cdot 10^{-9}$ моль/л	68 ± 9	32 ± 6	74 ± 10	53 ± 13

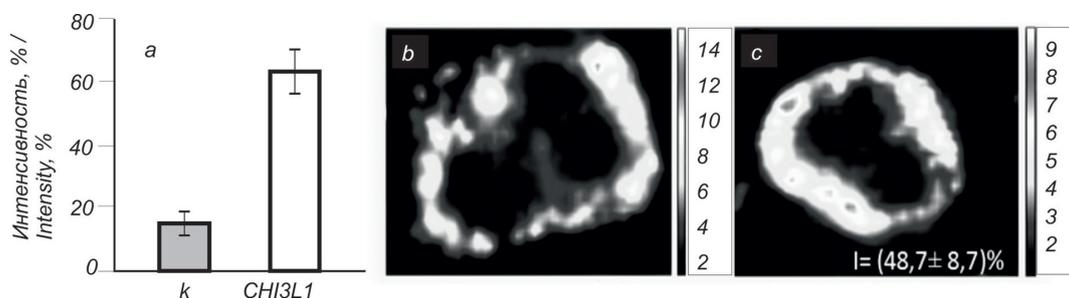


Рис. 3. Секреторная дегрануляция нейтрофилов при действии CHI3L1 в концентрации $2,5 \cdot 10^{-9}$ моль/л: a – интегральная интенсивность хемилюминесценции в супернатанте нейтрофилов, содержащем МПО; b, c – локализация и интенсивность флуоресценции МПО в комплексе с антителами в нейтрофилах, адгезирующих к стеклу в течение 10 мин (b – контроль, c – при действии белка CHI3L1)

Fig. 3. Secretory degranulation of neutrophils at the addition of CHI3L1 in $2,5 \cdot 10^{-9}$ mol/l concentration: a – integral intensity of chemiluminescence in supernatant containing MPO; b, c – localization and fluorescence intensity of MPO with its antibodies in neutrophils adhered to glass during 10 minutes (b – control, c – at the addition of CHI3L1)

Как мы предполагаем, CH13L1 может выполнять антиоксидантную функцию, т. е. вступать в реакции с АФКХ, снижая их концентрацию в биосистемах. Для изучения взаимодействия CH13L1 со свободнорадикальными продуктами исследованы следующие модельные системы: МПО–H₂O₂–люминол–белок, H₂O₂–люминол–белок, NaOCl–люминол–белок и ПХ–H₂O₂–люминол–белок. Как видно из данных, представленных в таблице, при добавлении CH13L1 в концентрации 2,5·10⁻⁹ моль/л наблюдается снижение ИИ люм-ХЛ во всех системах, что свидетельствует о взаимодействии белка с пероксидом водорода, HOCl, а также, вероятно, о регуляции активности ферментов ПХ и МПО.

При адгезии нейтрофилов к стеклу активируется секреторная дегрануляция – выход содержимого гранул фагоцитов во внеклеточное пространство. МПО преимущественно содержится в азурофильных гранулах нейтрофилов, наряду с лизоцимом и другими протеолитическими ферментами [12]. Анализ секреторной дегрануляции нейтрофилов при действии CH13L1 показал, что белок влияет на процессы секреции ферментов азурофильных гранул при активации нейтрофилов. Из данных, представленных на рис. 3, а, видно, что интегральная интенсивность ХЛ повышается в 4 раза в супернатанте клеток в присутствии CH13L1. Это свидетельствует об усилении секреторной дегрануляции. Нами оценено количество МПО, оставшейся в нейтрофилах при действии белка. Данные флуоресцентной микроскопии с использованием меченных к МПО антител представлены на рис. 3, b, c. Видно, что после 10 мин адгезии клеток в присутствии белка количество оставшейся МПО в них в 2 раза меньше (48,7 ± 8,7 %), чем в контрольных клетках. При увеличении времени адгезии клеток до 30 мин также регистрируется уменьшение концентрации МПО в них при действии белка CH13L1.

Заключение. В присутствии белка CH13L1 концентрация генерируемых нейтрофилами и моноцитами активных форм кислорода и хлора снижается. Установлено, что CH13L1 взаимодействует с пероксидом водорода и гипохлоритом натрия, в присутствии белка снижается количество свободнорадикальных продуктов, образующихся при участии пероксидазы хрена и миелопероксидазы. Выявлено, что при действии белка CH13L1 в концентрации 2,5·10⁻⁹ моль/л усиливается секреторная дегрануляция нейтрофилов – ускоряется выход миелопероксидазы во внеклеточную среду, однако это не приводит к усилению генерации АФК нейтрофилами. CH13L1 может регулировать протекание свободнорадикальных процессов в фагоцитах за счет взаимодействия с активными формами кислорода и хлора, а также усиления секреторной дегрануляции.

Список использованных источников

1. Diverse pathological implications of YKL-40: answers may lie in “outside-in” signaling / M. Prakash [et al.] // *Cell. Signalling*. – 2013. – Vol. 25. – P. 1567–1573.
2. Ringsholt, M. YKL-40 protein expression in normal adult human tissues – an immunohistochemical study / M. Ringsholt // *J. of Mol. Histol.* – 2007. – Vol. 38. – P. 33–43.
3. Areshkov, P. A. Chitinase 3-like protein 2 (CH13L2, YKL-39) activates phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases ERK1/ERK2 in human embryonic kidney (HEK293) and human glioblastoma (U87 MG) cells / P. A. Areshkov, V. M. Kavsan // *Cytology and Genetics*. – 2010. – Vol. 44, N 1. – P. 1–6.
4. YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils / B. Volck [et al.] // *Proceed. of the Association of American Physicians*. – 1998. – Vol. 110. – P. 351–360.
5. Johansen, J. S. Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibrosis and cancer / J. S. Johansen // *Danish Med. Bull.* – 2006. – Vol. 53, N 2. – P. 172–209.
6. Бейум, А. Выделение лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика. – М.: Медицина, 1980. – С. 9–36.
7. Новые подходы к определению концентрации и пероксидазной активности миелопероксидазы в плазме крови человека / И. В. Горудко [и др.] // *Биоорг. химия*. – 2009. – Т. 35, № 5. – С. 629–639.
8. Октябрьский, О. Н. Редокс-регуляция клеточных функций / О. Н. Октябрьский, Г. В. Смирнова // *Биохимия*. – 2007. – Т. 72, № 2. – С. 158–174.
9. Рулева, Н. Ю. Миелопероксидаза: биологические функции и клиническое значение / Н. Ю. Рулева, М. А. Звягинцева, С. Ф. Дугин // *Современные наукоемкие технологии*. – 2007. – № 8. – С. 11–14.
10. Human Cartilage gp-39, a Major Secretory Product of Articular Chondrocytes and Synovial Cells, Is a Mammalian Member of a Chitinase Protein Family / B. E. Hakala [et al.] // *J. of Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268, N 34. – P. 25803–25810.

11. Schepetkin, I. A. Lucigenin as a substrate of microsomal NAD(P)H-oxidoreductases / I. A. Schepetkin // *Biochemistry*. – 1999. – Vol. 64, N 1. – P. 25–32.
12. Крюков, А. А. Генерация активных форм кислорода в моноцитах при адгезии к стеклу / А. А. Крюков, Г. Н. Семенкова, С. Н. Черенкевич // *Цитология*. – 2006. – Т. 48, № 2. – С. 142–148.

References

1. Prakash, M., Bodas, M., Prakash, D., Nawani, N., Khetmalas, M., Mandal, A. and Eriksson, C. (2013) “Diverse pathological implications of YKL-40: answers may lie in “outside-in” signaling”, *Cellular Signalling*, 2013, vol. 25, pp. 1567–1573.
2. Ringsholt, M. (2007) “YKL-40 protein expression in normal adult human tissues – an immunohistochemical”, *Journal of Molecular Histology*, vol. 38, p. 33–43.
3. Areshkov, P. A. and Kavsan, V. M. (2010) “Chitinase 3-like protein (CHI3L2, YKL-39) activates phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases ERK1/ERK2 in human embryonic kidney (HEK293) and human glioblastoma (U87 MG) cells”, *Cytology and Genetics*, vol. 44, pp. 1–6.
4. Volck, B., Price, P. A., Johansen, J. S., Sorensen, O., Benfield, T. L., Nielsen, H. J., Calafat, J. and Borregaard, N. (1998) “YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils”, *Proceedings of the Association of American Physicians*, vol. 110, pp. 351–360.
5. Johansen, J. S. (2006) “Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibrosis and cancer”, *Danish Medical Bulletin*, vol. 53, pp. 172–209.
6. Blyum, A. (1980) “Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages”, *Limfotsity: vydelenie, fraktsionirovanie i kharakteristika* [Lymphocytes: isolation, fractionation and characterization], Medicine, Minsk, BY, pp. 9–36.
7. Gorudko, I., Cherkalina, O. S., Sokolov, A. V., Pulina, M. O., Zakharova, E. T., Vasil'ev, V. B., Cherenkevich, S. N. and Panasenka, O. M. (2009) “New approaches to the measurement of the concentration and peroxidase activity of myeloperoxidase in human blood plasma”, *Bioorganicheskaya khimiya* [Bioorganic Chemistry], vol. 35, no. 5, pp. 629–639.
8. Oktyabr'skii, O. N. and Smirnova, G. V. (2007) “Redox regulation of cellular functions”, *Biokhimiya* [Biochemistry], vol. 72, no. 2, pp. 158–174.
9. Ruleva, N. Y., Zvyagintsev, M. A. and Dugin, S. F. (2007) “Myeloperoxidase: biological functions and clinical implications”, *Sovremennye naukoemkie tekhnologii* [Modern high technologies], vol. 8, pp. 11–14.
10. Hakala, B., White, C. and Recklies, A. D. (1993) “Human Cartilage gp-39, a Major Secretory Product of Articular Chondrocytes and Synovial Cells, Is a Mammalian Member of a Chitinase Protein Family”, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 34, pp. 25803–25810.
11. Schepetkin, I. A. (1999) “Lucigenin as a substrate of microsomal NAD(P)H-oxidoreductases”, *Biochemistry*, vol. 64, no. 1, pp. 25–32.
12. Крюков, А. А., Семенкова, Г. Н. and Черенкевич, С. Н. (2006) “Generation of reactive oxygen species in monocytes at adhesion to glass”, *Tsitologiya* [Cytology], vol. 48, no. 2, pp. 142–148.

Информация об авторах

Леоник Юлия Сергеевна – магистрант. Белорусский государственный университет (пр-т Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yulyaleonik@mail.ru

Голубева Елена Николаевна – ст. преподаватель кафедры высшей математики и математической физики физического факультета. Белорусский государственный университет (пр-т Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: golubeva.ln.87@gmail.com

Кулагова Татьяна Александровна – канд. биол. наук, доцент кафедры биофизики физического факультета, Белорусский государственный университет (пр-т Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tatyana_kulagova@tut.by

Для цитирования

Леоник, Ю. С. Влияние белка CHI3L1 на кислород-активирующую способность фагоцитов / Ю. С. Леоник, Е. Н. Голубева, Т. А. Кулагова // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук.* – 2016. – № 4. – С. 94–98.

Information about the authors

Leonik Yulia Sergeevna – master student, faculty of physics. Belarusian State University (Nezavisimosty ave., 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yulyaleonik@mail.ru

Golubeva Alena Nikolaevna – lecturer of the department of higher mathematics and mathematical physics, faculty of physics. Belarusian State University (Nezavisimosty ave., 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: golubeva.ln.87@gmail.com

Kulagova Tatsiana Alexandrovna – Ph. D., associate professor of the department of biophysics, faculty of physics, Belarusian State University (Nezavisimosty ave., 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tatyana_kulagova@tut.by

For citation

Leonik Y., Golubeva E., Kulagava T. Protein CHI3L1 effect on phagocytes oxygen activating ability. *Proceedings of the National academy of sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 94–98.

В. В. Савич, Г. И. Новик

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

Из растительного материала (листья земляники) выделено 12 штаммов бактерий, среди которых 6 относились к роду *Pseudomonas*. Исследованы их морфологические и физиолого-биохимические свойства. Сочетание классических методов диагностики и молекулярно-генетических исследований, таких как анализ нуклеотидной последовательности гена *16S* рРНК, позволило идентифицировать до рода и вида три культуры псевдомонад. Подтверждены распространенность рода *Pseudomonas* среди природных популяций бактерий, а также широкий спектр их метаболической активности.

Ключевые слова: *Pseudomonas*, морфология, физиолого-биохимические свойства, идентификация.

V. Savich, G. Novik

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF BACTERIA OF THE GENUS *PSEUDOMONAS* ISOLATED FROM PLANT MATERIAL

Twelve bacterial cultures including six *Pseudomonas* strains were isolated from plant material (leaves of strawberry). Morphological, physiological and biochemical properties of isolated cultures were examined. By combination of classical methods of diagnostics and techniques of molecular genetics such as *16S rRNA* gene sequence analysis three *Pseudomonas* strains were identified. Prevalence of *Pseudomonas* among natural bacterial populations and wide metabolic activity of the genus were confirmed.

Keywords: *Pseudomonas*, morphology, physiological and biochemical properties, identification.

Введение. Род *Pseudomonas* представляет собой одну из наиболее распространенных в природе групп микроорганизмов. Представители данного рода обнаружены в пресной и морской воде, почве. Среди псевдомонад встречаются как патогены растений и животных, так и ризосферные бактерии, стимулирующие рост и развитие растений. Видовое разнообразие рода связано с широким спектром метаболической активности псевдомонад. Это позволяет представителям данного рода адаптироваться к различным условиям окружающей среды, а также синтезировать и утилизировать огромное количество субстратов (в том числе токсичных для других групп микроорганизмов и высших организмов – от низкомолекулярных соединений до биополимеров, включая ароматические соединения, производные углеводов и трудноразлагаемые органические остатки) [1, 2].

В настоящее время насчитывается 231 вид рода *Pseudomonas*, и их количество постоянно увеличивается [3]. Распространенность псевдомонад и их способность использовать и синтезировать огромное количество метаболитов делает этот род одним из наиболее изучаемых и перспективных для промышленного применения.

Цель работы – выделение бактерий рода *Pseudomonas* из растительного материала, их идентификация и изучение морфологических и физиолого-биохимических свойств.

Материалы и методы исследований. Выделение бактерий из растительного материала проводилось по способу, предложенному Bradbury [4]. Получение чистых культур и проведение биохимических тестов осуществляли с помощью общепринятых методов [5]. Для культивирования бактерий применяли агаризованную мясо-пептонную среду (МПА).

Для выделения геномной ДНК использовали коммерческий набор Bacteria DNA Preparation Kit (Jena Biosciences) согласно прилагаемой инструкции. Идентификацию бактерий проводили с помощью секвенирования по гену *16S* рРНК. Для амплификации необходимой нуклеотидной последовательности использовали универсальные праймеры 8f (5'-agagtttgatcctggctcag-3') и 1492r (5'-ggttacctgttacgactt-3') с применением следующего температурно-временного профиля: денатурация – 5 мин при 95 °С; 30 циклов: 20 с при 95 °С, 20 с при 50 °С, 90 с при 72 °С, достройка цепи – 5 мин при 72 °С; охлаждение до 4 °С. Для очистки амплифицированных фрагментов ДНК использовали набор GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific). Образцы ДНК и продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1 %-ном агарозном геле с использованием 1×TAE-буфера при напряженности электрического поля 5 В/см. Для определения размера продуктов ПЦР применяли маркеры молекулярной массы фрагментов ДНК GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

Результаты и их обсуждение. В качестве растительного материала для выделения бактерий использовали листья земляники. Листья измельчали в ступке, добавляли стерильную дистиллированную воду, а затем истощаемым штрихом материал высевали на поверхность агаризованной мясо-пептонной среды. Анализ сформировавшихся колоний проводили через 48–72 ч культивирования при 28 °С. В дальнейшем в чистую культуру были выделены 12 штаммов бактерий.

Для установления видовой принадлежности исследуемых культур применяли молекулярные методы идентификации, такие как секвенирование по гену *16S* рРНК, так как использования биохимических тестов в настоящее время недостаточно для точного определения видовой принадлежности бактерий. Ген *16S* рРНК обладает рядом преимуществ, позволяющих использовать его для молекулярных исследований: данный ген встречается у всех бактерий; *16S* рРНК достаточно большой (1500 п. о.) и консервативный, что обеспечивает статистически достоверные различия между результатами анализа [6].

Сравнительный анализ секвенированных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью баз данных GenBank и Ribosomal Database Project (RDP). По результатам секвенирования принадлежность к роду *Pseudomonas* установлена у 6 штаммов, остальные культуры принадлежали к другим родам бактерий (*Acinetobacter*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Rahnella*). До вида были идентифицированы три культуры псевдомонад: *P. koreensis* (две культуры), *P. jessenii* (табл. 1). Для более точного установления принадлежности культур к виду *P. koreensis* дополнительно проведены биохимические тесты на лецитиназу и гидролиз твина-80 (положительный результат тестов для культур *P. koreensis*).

Т а б л и ц а 1. Результаты молекулярно-генетической идентификации бактериальных культур, выделенных из листьев земляники

Культура	Результаты идентификации, %
<i>Pseudomonas koreensis</i>	98
<i>Pseudomonas koreensis</i>	99
<i>Pseudomonas</i> sp.	100
<i>Pseudomonas</i> sp.	99
<i>Pseudomonas jessenii</i>	96
<i>Pseudomonas</i> sp.	99
<i>Pantoea agglomerans</i>	99
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	97
<i>Erwinia aphidicola</i>	98
<i>Pantoea agglomerans</i>	97
<i>Rahnella aquatilis</i>	99
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99

Все исследуемые культуры псевдомонад морфологически представляли собой грамотрицательные каталазо- и оксидазоположительные палочки с оптимальной температурой роста 28 °С, не образующие индол. Для штаммов *P. koreensis* и *Pseudomonas* sp. обнаружен рост при температуре 37 °С.

Диагностическим признаком для бактерий рода *Pseudomonas* является образование пигментов. Нами изучалась продукция пигментов на различных средах. При выращивании на среде King B колонии 5 культур приобретали светло-желтую окраску, колонии 1 штамма – ярко-желтую. Наблюдалось дополнительное окрашивание среды культивирования (табл. 2). На среде King A для колоний была характерна светло-желтая и желтая окраска. На среде для производства индигоидина появление синей окраски наблюдалось у 4 штаммов бактерий. При росте культур редко отмечалось потемнение среды. На среде Петренко все изучаемые культуры окрашивались в светло-желтый цвет, на среде для производства оранжевого пигмента колонии культур приобретали коричневую окраску. Кроме того, обнаружено образование ярко-желтого пигмента у двух культур при выращивании бактерий на МПА при 4 °С, остальные культуры имели светло-желтую окраску. На той же среде при 37 °С яркую окраску приобретал лишь один из двух штаммов. При выращивании в стандартных условиях на МПА при 28 °С только одна культура имела желтую окраску, колонии остальных культур – светло-желтого цвета.

Т а б л и ц а 2. Образование пигментов у штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных с листьев земляники

Среда	Окраска штамма					
	С-ж, окрашивает среду	С-ж	С-ж, окрашивает среду	Я-ж, окрашивает среду	С-ж, окрашивает среду	С-ж, окрашивает среду
King B	С-ж, окрашивает среду	С-ж	С-ж, окрашивает среду	Я-ж, окрашивает среду	С-ж, окрашивает среду	С-ж, окрашивает среду
King A	С-ж	С-ж	С-ж	Ж	С-ж	С-ж
Среда Петренко	С-ж	С-ж	С-ж	С-ж	С-ж	С-ж
Среда для индигоидина	С-ж	С-ж	Син, потемнение среды	Син	Син	Син, потемнение среды
Среда для оранжевого пигмента	К	С-ж	К	К	К	К
МПА (4 °С)	С-ж	Я-ж	С-ж	С-ж	Я-ж	С-ж
МПА (37 °С)	С-ж	–	Я-ж	–	–	–
МПА (28 °С)	С-ж	С-ж	С-ж	Ж	С-ж	С-ж

П р и м е ч а н и е. «–» – отсутствие роста, «Ж» – желтый цвет, «С-ж» – светло-желтый, «Я-ж» – ярко-желтый, «Син» – синий, «К» – коричневый цвет.

Для более детальной таксономической характеристики выделенных культур проведены тесты на способность бактерий использовать различные углеводы в качестве источников углерода. Установлено, что на контрольной среде и среде с мальтозой для всех штаммов характерен слабый рост. Хороший рост всех культур наблюдался на средах с глюкозой, глицерином и фруктозой. На средах с сахарозой, арабинозой и ксилозой культуры росли значительно лучше, чем на контрольной среде, но хуже, чем на среде с глюкозой.

При проведении биохимических тестов для трех культур обнаружена неполная амилолитическая активность, проявляющаяся в неполном разрушении крахмала до декстринов. Липолитическую активность в отношении твина-60 и твина-80 проявляли три культуры (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Морфологические и физиолого-биохимические свойства штаммов *Pseudomonas*, выделенных с листьев земляники

Показатель	Штамм					
	Палочки	Палочки	Палочки	Палочки	Палочки	Палочки
Форма клеток	Палочки	Палочки	Палочки	Палочки	Палочки	Палочки
Рост при 37 °С	+	–	+	–	–	–
Каталаза	+	+	+	+	+	+
Оксидаза	+	+	+	+	+	+
Амилолитическая активность	–	–	±	±	–	±
Липолитическая активность (твин-60)	+	+	–	–	+	–
Липолитическая активность (твин-80)	+	+	–	–	+	–

П р и м е ч а н и е. «+» – положительная реакция, «–» – отрицательная реакция, «±» – промежуточный результат.

Заклучение. Из растительного материала (листья земляники) выделено 12 штаммов бактерий, из которых к роду *Pseudomonas* относились 6 культур. Исследованы морфологические и физиолого-биохимические свойства выделенных культур. С помощью сочетания классических методов диагностики и молекулярно-генетических исследований, таких как анализ нуклеотидной последовательности гена *16S* рРНК, идентифицировано до рода и вида три культуры псевдомонад: *P. koreensis* (две культуры), *P. jessenii*. Таким образом, подтверждена распространенность рода *Pseudomonas* среди природных популяций бактерий. Результаты биохимических тестов свидетельствуют о широком спектре метаболической активности выделенных культур.

Список использованных источников

1. Den Dooren de Jong, L. E. Bijdrage tot de kennis van het mineralisatieproces / L. E. Den Dooren de Jong. – Rotterdam, The Netherlands: Nijgh & van Ditmar Uitgevers-Mij, 1926. – 200 p.
2. Spiers, A. J. The causes of *Pseudomonas* diversity / A. J. Spiers, A. Buckling, P. B. Rainey // *Microbiology*. – 2000. – Vol. 146. – Pt. 10. – P. 2345–2350.
3. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [Electronic resource]. – Режим доступа: <http://www.bacterio.net>. – Дата доступа: 25.09.2016.
4. Bradbury, J. F. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. / J. F. Bradbury // *PANS*. – 1970. – Vol. 16, N 4. – P. 632–637.
5. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов. – М.: Академия, 2005. – 608 стр.
6. Patel, J. B. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. / J. B. Patel // *Mol. Diagn.* – 2001. – Vol. 6, N 4. – P. 313–321.

References

1. Den Dooren de Jong, L. E. (1926) *Bijdrage tot de kennis van het mineralisatieproces*, The Netherlands: Nijgh & van Ditmar Uitgevers-Mij, Rotterdam, NL.
2. Spiers, A. J., Buckling, A. and Rainey, P. B. (2000) “The causes of *Pseudomonas* diversity”, *Microbiology*, vol. 146, pt. 10, pp. 2345-2350.
3. “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature”, Available at: <http://www.bacterio.net> (accessed 25 September 2016).
4. Bradbury, J. F. (1970) “Isolation and preliminary study of bacteria from plants”, *PANS*, vol. 16, no. 4, pp. 632-637.
5. Netrusov, A. I. (2005) *Praktikum po mikrobiologii* [Practical handbook of microbiology], Academy Publ., Moscow, RU.
6. Patel, J. B. (2001) “16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory”, *Molecular Diagnosis*, vol. 6, no. 4, pp. 313-321.

Информация об авторах

Савич Виктория Валерьевна – мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: savichvv@list.ru

Новик Галина Ивановна – канд. биол. наук, зав. лабораторией «Коллекция микроорганизмов». Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: collection@mbio.bas-net.by

Для цитирования

Савич, В. В. Морфологические и физиолого-биохимические свойства бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из растительного материала / В. В. Савич, Г. И. Новик // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 99–102.

Information about the authors

Savich Victoria Valeryevna – Junior Scientific Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: savichvv@list.ru

Novik Galina Ivanovna – Ph. D. (Biol.), Head of the Microbial Collection Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: collection@mbio.bas-net.by

For citation

Savich V., Novik G. Morphological, physiological and biochemical properties of bacteria of the genus *Pseudomonas* isolated from plant material. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 99–102.

У. В. Фальковская, А. В. Сидоренко, Г. И. Новик

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВИДОВОЙ СОСТАВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИОЗОВ ТОПИНАМБУРА

На основании изучения морфологических и физиолого-биохимических признаков, а также данных анализа нуклеотидной последовательности гена *16S* рРНК, определена таксономическая принадлежность 21 культуры фитопатогенных бактерий, изолированных из клубней топинамбура с признаками бактериоза. Исследуемые штаммы идентифицированы как *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Serratia* sp., *Ewingella americana*, *Xanthomonas* sp., *Rahnella* sp. Показано, что анализируемые бактериальные культуры продуцируют ряд внеклеточных ферментов (протеаз, целлюлаз, липаз, амилаз), участвующих в развитии бактериозов у растений.

Ключевые слова: бактериозы, топинамбур, физиолого-биохимическая идентификация, молекулярно-генетическая идентификация, ген *16S* рРНК, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae.

U. V. Falkouskaya, A. V. Sidarenka, G. I. Novik

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

TAXONOMIC COMPOSITION OF THE JERUSALEM ARTICHOKE BACTERIOSIS AGENTS

Taxonomic affiliation of the 21 phytopathogenic bacterial cultures isolated from the Jerusalem artichoke tubers with signs of bacteriosis was established based on results of examination of morphological and physiological-biochemical properties and data of *16S* rRNA gene sequence analysis. Examined strains were identified as *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Serratia* sp., *Ewingella americana*, *Xanthomonas* sp., *Rahnella* sp. It was shown that analyzed cultures produce extracellular enzymes (proteases, cellulases, lipases, amylases), involved in the development of bacteriosis in plants.

Keywords: bacteriosis, Jerusalem artichoke, physiological-biochemical identification, molecular-genetic identification, *16S* rRNA gene, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae.

Введение. Топинамбур – вид многолетних травянистых клубненосных растений семейства Астровые (Asteraceae). Данная культура обладает рядом ценных свойств, благодаря которым находит широкое применение в сельском хозяйстве, пищевой и фармацевтической промышленности. В 2012 г. на заседании Совета министров Союзного государства утверждена программа «Инновационное развитие производства картофеля и топинамбура на 2012–2015 годы», в приоритетные задачи которой включены разработка технологий промышленного производства и переработки топинамбура, формирование рынка продуктов здорового питания на основе данного растения. Для успешного возделывания топинамбура необходимым является изучение фитопатогенных бактерий, инфицирующих эту ценную сельскохозяйственную культуру и приводящих к значительным потерям урожая.

Согласно сведениям литературы, наиболее распространенными возбудителями заболеваний топинамбура в США, Австрии, Франции, Японии, КНР, странах Малой Азии, где данная культура занимает значительные площади, являются фитопатогенные грибы родов *Puccinia*, *Sclerotinia*, *Erysiphe*, а также фитопатогенные бактерии родов *Erwinia* и *Pseudomonas* [1]. Сведения о фитопатогенах, инфицирующих топинамбур в Республике Беларусь и странах СНГ, практически отсутствуют.

Цель исследования – изучение видового состава возбудителей бактериозов топинамбура, культивируемого в Республике Беларусь.

Материалы и методы исследования. Объекты исследования – 21 культура бактерий, изолированных из клубней топинамбура с признаками бактериоза. Выделение фитопатогенных бактерий из образцов инфицированных клубней топинамбура проводили по общепринятой методике,

используя следующие питательные среды: мясо-пептонный агар (МПА) (пептон – 5,0 г, натрия хлорид – 5,0 г, мясной экстракт – 1,5 г, дрожжевой экстракт – 1,5 г, агар бактериологический – 20,0 г, вода дистиллированная – до 1 л; pH 6,8); картофельный агар (КА) (картофельный отвар – 200 мл, глюкоза – 15,0 г, агар бактериологический – 20,0 г, вода дистиллированная – до 1 л, pH 6,8). Анализ сформировавшихся колоний осуществляли через 72 ч культивирования при 28 °С. Чистые культуры бактерий получали путем трехкратного посева изолированных колоний на МПА. Морфологию клеток исследовали с помощью световой микроскопии фиксированных препаратов, окрашенных по методу Грама, используя микроскоп Nikon Eclipse E2000 (Япония). Физиолого-биохимические свойства культур (продукцию каталазы, оксидазы, пигментов) изучали по стандартным методикам. Липолитическую активность исследовали на среде МПА, содержащей твин-80 или твин-20. Амилолитическую активность определяли на среде МПА с добавлением 0,2 % растворимого крахмала. Для выявления целлюлолитических ферментов использовали среду МПА, содержащую целлюлозу (0,1 %). Для определения протеолитических ферментов применяли кальциево-казеиновый агар (Conda).

Хромосомную ДНК выделяли с помощью коммерческого набора Bacteria DNA Preparation Kit (Jena Bioscience) согласно прилагаемой инструкции. Для амплификации нуклеотидной последовательности гена *16S* рРНК применяли праймеры 8f (5'-agagtttgatcctggctcag-3') и 1492r (5'-ggttaccctgttacgactt-3') («Праймтех», Беларусь). Амплификацию проводили на автоматическом термоциклере Eppendorf Mastercycler epgradientS с использованием активного точного режима регулирования и следующего температурно-временного профиля: денатурация – 5 мин при 94 °С; 30 циклов: 20 с при 94 °С, 20 с при 50 °С, 90 с при 72 °С; достройка цепи – 3 мин при 72 °С; охлаждение до 4 °С. Для очистки амплифицированных фрагментов генов применяли набор MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) согласно прилагаемой инструкции. Реакцию секвенирования проводили, используя набор реагентов для секвенирования DNA Cycle Sequencing Kit (Jena Bioscience) согласно прилагаемой инструкции. Разделение и анализ продуктов секвенирования осуществляли с помощью анализатора Li-COR 4300 DNA Analyzer. Для сравнительного анализа секвенированных фрагментов генов использовали программу BLAST международной базы данных GenBank [2].

Результаты и их обсуждение. Из клубней топинамбура с признаками бактериального поражения выделена 21 чистая культура бактерий, предположительно являющихся возбудителями инфекционного заболевания.

Изучение морфологических и физиолого-биохимических свойств выделенных культур показало, что они представляют собой грамотрицательные неспорообразующие палочки (аэробы) с окислительным типом метаболизма. Тринадцать штаммов продуцировали каталазу и оксидазу, у семи из них выявлена продукция внеклеточных диффундирующих в среду желто-зеленых и коричневых пигментов, что позволило отнести данные культуры к сем. Pseudomonadaceae. Восемь штаммов являлись оксидазоотрицательными, каталазоположительными, внеклеточных пигментов не образовывали, и на основании перечисленных признаков идентифицированы как представители сем. Enterobacteriaceae.

Проведена молекулярно-генетическая идентификация выделенных культур фитопатогенных бактерий на основании анализа нуклеотидной последовательности гена *16S* рРНК, поскольку данный метод рекомендован в качестве одного из стандартов и признан в авторитетных мировых коллекциях. В результате амплификации на матрице геномной ДНК исследуемых культур с праймерами 8f и 1492r получены ПЦР-продукты размером ~1500 п. н., что соответствует полной нуклеотидной последовательности целевого гена. С помощью секвенирования определена нуклеотидная последовательность проксимального участка (~800 п. н.) амплифицированных фрагментов гена *16S* рРНК, содержащего вариабельную V1–V3 область. На основании данных сравнительного анализа секвенированных последовательностей и референтных нуклеотидных последовательностей из базы данных GeneBank 10 штаммов идентифицированы как *Pseudomonas* sp., 5 – как *Stenotrophomonas* sp., 2 – как *Serratia* sp., 2 – как *Ewingella americana*, 1 – как *Xanthomonas* sp., 1 – как *Rahnella* sp. Полученные результаты свидетельствуют, что возбудителями бактериозов

топинамбура, культивируемого в Республике Беларусь, являются представители семейств Pseudomonadaceae (*Pseudomonas* sp., 48 % выделенных фитопатогенов), Enterobacteriaceae (*Serratia* sp., *Ewingella americana*, *Rahnella* sp., 24 % выделенных культур), Xanthomonadaceae (*Stenotrophomonas* sp., *Xanthomonas* sp., 28 %). Таксономический состав выделенных возбудителей бактериоза топинамбура схож с составом фитопатогенных бактерий, инфицирующих данное растение в других регионах [1]. Результаты исследования подтверждают сведения литературы, согласно которым бактерии родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* являются наиболее распространенными и вредоносными фитопатогенными микроорганизмами, поражающими широкий круг сельскохозяйственных и декоративных культур [3].

Из литературных источников известно, что фитопатогенные бактерии продуцируют такие факторы вирулентности, как токсины, ферменты, растительные гормоны, внеклеточные полисахариды, и индуцируют различные симптомы бактериозов растений: хлорозы, мягкие гнили, гиперплазию клеток, некрозы и увядания. Биохимические исследования показали, что патогенные в отношении растений свойства бактерий являются результатом продукции ряда деполимеризующих ферментов, таких как пектиназы, целлюлазы, протеазы, фосфолипазы и ксиланазы, которые вызывают деградацию компонентов клеточных стенок [4]. С целью выявления факторов патогенности у бактериальных культур, выделенных из пораженных клубней топинамбура, исследована их протеолитическая, липолитическая, амилолитическая и целлюлолитическая активность. По наличию определенной ферментативной активности анализируемые штаммы разделены на шесть групп:

штаммы с протеолитической активностью: 1-1, 1-2, 1-3, 2-1, 3н-1, 3н-2, 3н-3, 3к-3, 4-2, 4-3, 5-2, 5-3, 5-4, 8-1, 8-3, 8у-1, 9-3, 9-4;

штаммы с целлюлолитической активностью: 4-2, 4-3, 5-4;

штаммы с липолитической активностью (твин-20): 1-2, 1-3, 2-к, 3н-1, 3н-3, 4-2, 4-3, 3к-3, 5-2, 5-4, 8у-1, 9-1, 9-2;

штаммы с липолитической активностью (твин-80): 1-2, 1-3, 2-к, 3н-1, 3н-3, 3к-3, 5-2, 5-3, 5-4;

штаммы с амилолитической активностью: 1-3, 8-1, 9-3;

штаммы с комплексной активностью: 1-3, 4-2, 4-3, 5-4, продуцирующие широкий спектр внеклеточных ферментов, участвующих в развитии симптомов бактериозов у растений, – протеазы, целлюлазы, липазы, амилазы.

Способность исследуемых бактериальных культур продуцировать внеклеточные ферменты, являющиеся факторами фитопатогенности, подтверждает возможность их участия в развитии заболеваний топинамбура.

Выделенные и охарактеризованные культуры фитопатогенных бактерий введены в фонд специализированной коллекции фитопатогенных микроорганизмов, функционирующей на базе Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. Данные культуры могут быть использованы в научных исследованиях для изучения механизмов развития бактериозов, разработки диагностических систем для экспресс-идентификации возбудителей болезней и создания средств защиты ценных сельскохозяйственных культур, в первую очередь топинамбура.

Заключение. Из клубней топинамбура с признаками бактериального поражения выделена 21 чистая культура бактерий, предположительно являющихся возбудителями инфекционного заболевания. На основании изучения морфологических и физиолого-биохимических признаков, а также данных анализа нуклеотидной последовательности гена *16S* рРНК 10 штаммов идентифицированы как *Pseudomonas* sp., 5 – как *Stenotrophomonas* sp., 2 – как *Serratia* sp., 2 – как *Ewingella americana*, 1 – как *Xanthomonas* sp., 1 – как *Rahnella* sp. Показано, что выделенные культуры продуцируют ряд внеклеточных ферментов: протеаз, целлюлаз, липаз, амилаз, участвующих в развитии симптомов бактериозов у растений.

Авторы выражают благодарность заведующей лабораторией защиты растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси В. А. Тимофеевой за предоставление клубней топинамбура с признаками бактериального поражения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Smith, S. Jerusalem artichoke / S. Smith // *Plant health clin. news.* – 2011. – N 2. – P. 1–4.
2. NCBI [Electronic resource] // *GenBank Overview.* – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankOverview.html>. – Date of access: 03.10.2015.
3. Agrios, G. N. *Plant pathology* / G. N. Agrios // *Plant pathology.* – 5th ed. – New York: Elsevier Academic Press, 2004. – 922 p.
4. Желдакова, Р. А. Фитопатогенные микроорганизмы / Р. А. Желдакова. – Минск: БГУ, 2006. – С. 23–69.

References

1. Smith, S. (2011) "Jerusalem artichoke", *Plant health clinic news*, no. 2, pp. 1-4.
2. "NCBI", *GenBank Overview*, Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankOverview.html> (accessed 3 October 2015).
3. Agrios, G. N. (2004) *Plant pathology*, 5nd ed., Elsevier Academic Press, New York, US.
4. Zheldakova, R. A. and Myamin, V. E. (2006) *Phytopatogennye mikroorganizmy* [Phytopathogenic microorganisms], BSU, Minsk, BY.

Информация об авторах

Фальковская Ульяна Владимировна – науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. акад. В. Ф. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: uliana_006@mail.ru

Сидоренко Анастасия Вячеславовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. акад. В. Ф. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: a_sidarenka@mbio.bas-net.by

Новик Галина Ивановна – канд. биол. наук, зав. лабораторией «Коллекция микроорганизмов». Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. акад. В. Ф. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: galina_novik@mbio.bas-net.by

Для цитирования

Фальковская, У. В. Видовой состав возбудителей бактериозов топинамбура / У. В. Фальковская, А. В. Сидоренко, Г. И. Новик // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 103–106.

Information about the authors

Falkouskaya Ulyana Vladimirovna – Scientific Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: uliana_006@mail.ru

Sidarenka Anastasia Viacheslavovna – Ph. D. (Biol.), Senior Scientific Researcher Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a_sidarenka@mbio.bas-net.by

Novik Galina Ivanovna – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory of Collection of microorganisms. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: galina_novik@mbio.bas-net.by

For citation

Falkouskaya U. V., Sidarenka A. V., Novik G. I. Taxonomic composition of the Jerusalem artichoke bacteriosis agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 103–106.

А. В. Константинов, М. Я. Острикова

Институт леса НАН Беларуси, Гомель, Республика Беларусь

**ВЛИЯНИЕ ШТАММОВ РИЗОСФЕРНЫХ ПСЕВДОМОНАД
НА РОСТ МИКРОКЛОНАЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ БЕРЕЗЫ ПУШИСТОЙ
(*BETULA PUBESCENS* EHRH.) В РАЗНЫЕ СРОКИ ПОСАДКИ**

Изучено влияние почвенных микроорганизмов (четырёх штаммов бактерий рода *Pseudomonas*) и способов их внесения на рост и развитие микроклональных растений (береза пушистая клон Бп3ф1) на этапе их адаптации к условиям *ex vitro* в различные сроки посадки. В результате экспериментов установлено, что применение штаммов псевдомонад оказывает положительное влияние на развитие регенерантов, а обработка при посадке в осенний период приводит к большему ростстимулирующему воздействию. Отобраны наиболее перспективные штаммы бактерий, которые предполагается использовать в дальнейших исследованиях.

Ключевые слова: береза, размножение *in vitro*, адаптация *ex vitro*, штаммы *Pseudomonas*.

A. V. Konstantinov, M. Ya. Ostriкова

Institute of Forest of National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

**THE INFLUENCE OF TREATMENT WITH RHIZOSPHERIC STRAINS OF PSEUDOMONAS
ON GROWTH AND DEVELOPMENT OF BIRCH (*BETULA PUBESCENS* EHRH.)
REGENERANTS AT DIFFERENT TIMES LANDING**

The article describes the influence of bacteria different strains of genus *Pseudomonas* on growth parameters of clonally propagated birch (clone Bp3f1) during the process of adaptation to soil conditions was investigation. It was shown that the treatment of microbial preparations of rhizosphere microorganisms enhanced the growth and increased the survival rate of micropropagated plants. Experiments have shown that the use of *Pseudomonas* strains, has a positive effect on plant development. As a result of the experiments were selected the most promising bacterial strains to be used in further studies.

Keywords: birch, *in vitro* micropropagation, adaptation *ex vitro* acclimatization, strains of *Pseudomonas*.

Введение. Одним из перспективных методов быстрого размножения ценных генотипов деревьев является использование культуры тканей лесных древесных видов. Биотехнологические методы, основанные на использовании культур *in vitro*, активно применяют для производства лесного посадочного материала во многих странах мира, где созданы крупные биотехнологические центры (США, Канада, Финляндия, Латвия и др.). Микроклональное размножение растений на сегодняшний день имеет широкое практическое применение и позволяет получать вегетативное потомство растительных организмов, обладающее всеми признаками исходных форм [1].

Микроклональное размножение растений включает 4 основных этапа: 1) эксплантация исходной ткани и регенерацию растений (получение асептической культуры); 2) подбор условий культивирования растений *in vitro* и собственно микроклональное размножение (этап мультипликации); 3) укоренение размноженных побегов (этап ризогенеза); 4) высадка растений в грунт и постепенная акклиматизация к условиям *ex vitro* (этап адаптации) [2].

При промышленном микроклональном размножении при пересадке в нестерильные условия и адаптации возникают большие потери посадочного материала. Причинами гибели растений (50 % и более) является недостаток кутикулярного воска, низкая интенсивность фотосинтеза (листья растений, полученных *in vitro*, поглощают в 4–5 раз меньше CO₂), высокая интенсивность транспирации, связанная с нефункционирующими устьицами.

Для успешной приживаемости и интенсивного развития в нестерильных условиях растения должны преодолеть стрессы, которым они подвергаются в процессе адаптации. На ростовые

процессы и приживаемость микроклонально размноженных растений значительное влияние оказывает недостаточное функционирование корневых систем, не обеспечивающее поглощение необходимого количества воды и питательных элементов для компенсации транспирации и роста. Корни растений, полученные *in vitro*, не имеют корневых волосков и часто развиваются из каллуса [3–5].

Таким образом, растения, перемещаемые в нестерильные условия, должны либо адаптировать существующий листовой аппарат и корни к новым условиям, либо расти со скоростью, позволяющей сформировать новые вегетативные органы, приспособленные к изменившимся условиям [6].

Оптимизировать и ускорить прохождение растениями процесса адаптации можно путем внесения в субстрат штаммов ризосферных бактерий или препаратов, содержащих мицелий микоризообразующих грибов. Присутствие данных групп микроорганизмов в почве облегчает прохождение адаптации растениями и обеспечивает их успешный рост и развитие [7, 8].

Бактерии способны конкурировать с фитопатогенными микроорганизмами, эффективно подавляя их рост, а также улучшать минеральное питание растений и обеспечивать их биологически активными веществами [9–11].

В результате взаимодействия с микроорганизмами в ризосфере и ризоплане растения могут получать необходимые макро- и микроэлементы. Бактерии родов *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Enterobacter* sp., *Gluconoacetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp., *Sinorhizobium* sp. и др. способны не только обогащать почву азотом, но и улучшать подвижность соединений фосфора, делая его доступным для корневого питания растений. Микоризные грибы обеспечивают интенсивную ассимиляцию фосфора и азота [12, 13].

Среди почвенной микрофлоры особенно много организмов, выделяющих в почву антибиотические вещества и фитогормоны. Приспособленность растений к интенсивному поглощению указанных соединений позволяет в значительной мере обеспечить защиту от патогенов и фитофагов. Ризосферные бактерии также способны улучшать водный и минеральный статус растений и способствовать снижению содержания в них этилена [14, 15].

Цель наших исследований – изучение влияния суточных культур бактерий рода *Pseudomonas* spp. на приживаемость и адаптацию регенерантов березы пушистой (*Betula pubescens* Ehrh.) к нестерильным почвенным условиям в разные сроки посадки.

Объекты и методы исследования. Работа проводилась на базе лаборатории генетики и биотехнологии Института леса НАН Беларуси. Посадку растений проводили в два этапа – в июле и ноябре. Выбор данных сроков обусловлен необходимостью разработки подходов к ускоренному выращиванию микроклонального посадочного материала. Так, при посадке растений в июле появляется возможность их выведения в естественные условия лесных культур в год адаптации, а при высадке в ноябре получаемый материал можно высаживать в теплицы и на поля доращивания в ранневесенний период.

В ходе исследования использовали генетически однородный клоновый материал березы пушистой (клон Бп3ф1) из коллекции культур *in vitro*, что исключало влияние генотипических различий растений на результаты эксперимента.

Культивирование растений *in vitro* проводилось в условиях освещенности 2,5–3 тыс. лк и температуре 25 ± 1 °C в течение 1,5 мес. на безгормональной агаризованной среде WPM [16] для древесных растений.

Растения выращивали в кассетах по 54 ячейки объемом 70 мл каждая. Для обработки адаптируемых микрорастений применяли штаммы бактерий рода *Pseudomonas*: *Ps. aurantiaca* В 162/17, *Ps. fluorescens* рACD 1.4, *Ps. mendocina* рAYSCD 1.7 и *Ps. mendocina* 9–40, предоставленные кафедрой генетики БГУ. В каждом варианте опыта использовали два способа обработки микроклональных растений: однократный полив рабочим раствором суточной культуры (100 мл/1000 мл воды) по 5 мл раствора на каждое растение непосредственно после высадки или предпосадочное обмакивание корней микроклонов в рабочий раствор культуры микроорганизмов (КОЕ 10⁹). Обработку растений контрольного варианта культурой микроорганизмов не проводили. В качестве

субстрата использовали смесь верхового торфа с песком в соотношении 3:1. Количество исследуемых растений в каждом варианте составило 54 шт.

Выращивание растений в условиях круглосуточного освещения является одним из путей повышения продуктивности растений и улучшения их качества [17]. В связи с изложенным выше адаптация *ex vitro* проводилась в условиях постоянного освещения люминесцентными лампами интенсивностью 2–4 тыс. лк, при температуре 32 ± 1 °C (июль–август), 24 ± 1 °C (ноябрь–декабрь) и относительной влажности воздуха около 90 %. Длительность эксперимента составила 45 сут.

Морфологическое развитие растений в контроле и под воздействием штаммов ризосферных бактерий оценивали по параметру высоты побега (в миллиметрах) от поверхности субстрата до последней развитой почки. Рассчитывали процент приживаемости регенерантов березы в конце периода адаптации, анализировали процент прироста и динамику развития растений. Учеты проводили на 3, 15, 30, 45-й день после посадки. Для статистической обработки полученных результатов использовали программные пакеты Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. Анализ полученных результатов показал, что обработка суточными культурами рода *Pseudomonas* sp. оказывает влияние на сохранность черенковых клонов и их последующий рост как в летний, так и в осенний период.

В ходе визуальной оценки морфологических признаков растений в вариантах опыта с применением исследуемых штаммов микроорганизмов отмечено отсутствие искривленных и загнутых побегов и заметно лучшее развитие листовых пластинок.

Показатели динамики прироста растений в опытном и контрольном вариантах имели различия. Так, в контрольном варианте прирост составил 143 % относительно начальной высоты. В вариантах опыта с обмакиванием корней в культуру *Ps. mendocina* pAYSCD 1.7 и с поливом культурой *Ps. fluorescens* pACD 1.4 наблюдался наиболее интенсивный прирост – 250 и 240 % соответственно относительно исходной высоты.

Данные по средней высоте стволика и величине прироста растений в летний период представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Средняя высота стволика и величина прироста растений летней посадки

Тип обработки	Средняя высота стволика, мм				Прирост		Приживаемость, %
	на 3-й день	на 15-й день	на 30-й день	на 45-й день	мм	%	
Контроль	24,2 ± 1,4	29,2 ± 1,8	43,9 ± 2,4	58,8 ± 2,4	34,5	143	78
Обмакивание корней:							
<i>Ps. aurantiaca</i> В 162/17	24,6 ± 0,9	28,3 ± 1,1	42,5 ± 2,1	56,2 ± 2,1	31,6	128	74
<i>Ps. fluorescens</i> pACD 1.4	22,5 ± 0,8	29,5 ± 1,0	43,3 ± 1,9	56,3 ± 1,9	33,8	151	85
<i>Ps. mendocina</i> pAYSCD 1.7	18,2 ± 0,6	26,3 ± 0,8	45,6 ± 1,9	63,7 ± 1,9	45,5	250	100
<i>Ps. mendocina</i> 9–40	21,1 ± 0,7	27,4 ± 0,9	43,5 ± 2,2	59,9 ± 2,2	38,8	184	96
Полив:							
<i>Ps. aurantiaca</i> В 162/17	26,0 ± 1,3	31,1 ± 1,4	44,0 ± 2,2	56,2 ± 2,2	30,3	116	80
<i>Ps. fluorescens</i> pACD 1.4	18,4 ± 0,7	24,0 ± 1,1	43,2 ± 2,5	62,6 ± 2,5	44,2	240	89
<i>Ps. mendocina</i> pAYSCD 1.7	17,3 ± 0,8	25,2 ± 1,1	37,5 ± 2,1	50,3 ± 2,1	33,2	191	99
<i>Ps. mendocina</i> 9–40	18,7 ± 0,7	25,5 ± 1,2	45,5 ± 2,8	60,0 ± 2,8	38,3	205	76

Приживаемость растений летней посадки по прошествии 1,5 мес. в контроле составила 78 %. Максимальная сохранность (100 %) отмечена у растений при поливе с использованием штамма *Ps. mendocina* pAYSCD 1.7. В случае обмакивания корней в бульонную культуру бактерий данного штамма прижилось 98 % растений. Наименьшая приживаемость (74 %) наблюдалась у растений, обработанных штаммом *Ps. aurantiaca* В 162/17 при обмакивании корней, и у варианта, где применяли полив с использованием *Ps. mendocina* 9–40 (76 %). Во всех остальных случаях процент приживаемости растений оказался выше контрольного.

Высокая интенсивность прироста отмечена в вариантах опыта со штаммом *Ps. mendocina* pAYSCD 1.7 (при обмакивании корней и поливе 250 и 191 % соответственно) и в обоих вариантах со штаммом *Ps. mendocina* 9–40 (184 и 205 %). В случае применения штамма *Ps. fluorescens*

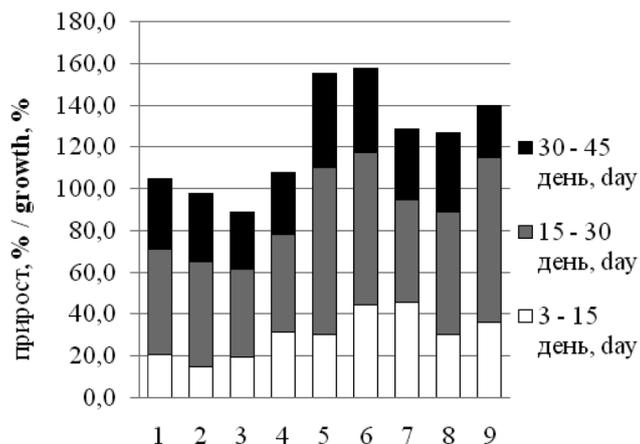


Рис. 1. Влияние суточных культур бактерий рода *Pseudomonas* sp. на динамику роста растений летней посадки по периодам, %: 1 – контроль (без обработки); 2 – *Ps. aurantiaca* В 162/17 (обмакивание корней); 3 – *Ps. aurantiaca* В 162/17 (полив); 4 – *Ps. fluorescens* pACD 1.4 (обмакивание корней); 5 – *Ps. fluorescens* pACD 1.4 (полив); 6 – *Ps. mendocina* pAYSCD 1.7 (обмакивание корней); 7 – *Ps. mendocina* pAYSCD 1.7 (полив); 8 – *Ps. mendocina* 9–40 (обмакивание корней); 9 – *Ps. mendocina* 9–40 (полив)

Fig. 1. Effect of daily culture bacteria of the genus *Pseudomonas* sp. on the dynamics of the growth of plants on a summer planting by periods, %: 1 – control (no treatment); 2 – *Ps. aurantiaca* В 162/17 (dipping the roots); 3 – *Ps. aurantiaca* В 162/17 (watering); 4 – *Ps. fluorescens* pACD 1.4 (root dipping); 5 – *Ps. fluorescens* pACD 1.4 (watering); 6 – *Ps. mendocina* pAYSCD 1.7 (dipping the roots); 7 – *Ps. mendocina* pAYSCD 1.7 (watering); 8 – *Ps. mendocina* 9–40 (dipping the roots); 9 – *Ps. mendocina* 9–40 (watering)

pACD 1.4 способом полива изучаемый показатель оказался равен 240 % относительно исходной высоты регенерантов. Применение штамма *Ps. aurantiaca* В 162/17 негативно отразилось на приросте растений, его уровень был ниже контрольного.

Динамика прироста микрорастений представлена на рис. 1.

Таким образом, применение штаммов *Ps. mendocina* pAYSCD 1.7 и *Ps. mendocina* 9–40 в случае обмакивания корней способствовало высокой приживаемости адаптируемых растений, а также увеличению интенсивности их прироста.

Штамм *Ps. fluorescens* pACD 1.4 в случае обмакивания корней положительно влиял на прирост, не оказывая при этом существенного воздействия на приживаемость микрорастений. Использование штамма *Ps. aurantiaca* В 162/17 негативно сказалось на адаптируемых растениях.

Установлено, что по сравнению с начальной высотой прирост в контрольном варианте эксперимента составил 340 %. В то же время наиболее интенсивный прирост наблюдался в вариантах опыта со штаммом *Ps. mendocina* 9–40: в случае полива раствором культуры данного микроорганизма величина прироста составила 536 % от исходной высоты, а при обмакивании корней в суспензию – 466 %. Достаточно высокая интенсивность прироста отмечена в вариантах опыта с поливом *Ps. mendocina* pAYSCD 1.7 – 442 % и поливом раствором суспензии *Ps. fluorescens* pACD 1.4 – 425 % относительно начальной высоты. Наиболее интенсивно растения, обработанные вышеуказанными штаммами ризосферных псевдомонад, развивались в первые полторы недели после посадки, а в случае использования штамма *Ps. mendocina* pAYSCD 1.7 такая динамика сохранялась до конца первого месяца адаптации растений березы.

Данные по средней высоте стволика и величине прироста растений в осенний период представлены в табл. 2.

Приживаемость растений осенней посадки оказалась выше, чем растений летней посадки. По прошествии 1,5 мес. данный показатель в контроле составил 96 %. При применении штаммов *Ps. aurantiaca* В 162/17 и *Ps. mendocina* pAYSCD 1.7 в опыте с поливом, а также после обмакивания корней растений в суспензию бактерий штамма *Ps. fluorescens* pACD 1.4 приживаемость составила 98 %. В остальных случаях отмечена максимальная сохранность растений (100 %). Во всех вариантах опыта процент приживаемости растений оказался выше контрольного показателя.

Таблица 2. Средняя высота стволика и величина прироста растений осенней посадки

Тип обработки	Средняя высота стволика, мм				Прирост		Приживаемость, %
	на 3-й день	на 15-й день	на 30-й день	на 45-й день	мм	%	
Контроль	17,3 ± 0,6	35,0 ± 1,5	50,3 ± 2,3	76,1 ± 3,4	58,8	340	96
Обмакивание корней:							
<i>Ps. aurantiaca</i> В 162/17	26,5 ± 1,1	41,8 ± 1,4	66,8 ± 1,7	93,9 ± 2,1	67,4	254	100
<i>Ps. fluorescens</i> pACD 1.4	25,8 ± 1,2	43,3 ± 1,6	71,8 ± 2,7	111,8 ± 7,6	86,0	333	98
<i>Ps. mendocina</i> pAYSCD 1.7	18,3 ± 0,7	42,6 ± 1,3	69,0 ± 1,3	99,4 ± 2,3	81,1	442	100
<i>Ps. mendocina</i> 9–40	19,7 ± 0,8	38,7 ± 1,3	73,2 ± 1,6	111,3 ± 2,7	91,6	466	100
Полив:							
<i>Ps. aurantiaca</i> В 162/17	21,0 ± 0,7	40,2 ± 1,3	67,4 ± 1,7	94,1 ± 2,3	73,1	347	98
<i>Ps. fluorescens</i> pACD 1.4	17,5 ± 0,8	37,5 ± 1,0	65 ± 1,4	91,9 ± 1,9	74,4	425	100
<i>Ps. mendocina</i> pAYSCD 1.7	17,9 ± 0,8	31,9 ± 1,4	58,7 ± 2,5	85,3 ± 3,8	67,4	376	98
<i>Ps. mendocina</i> 9–40	17,8 ± 0,7	38,4 ± 1,4	75,6 ± 1,8	113,6 ± 3,6	95,8	536	100

Обмакивание корней в суспензию бактерий штамма *Ps. aurantiaca* В 162/17 негативно отразилось на приросте растений: его уровень был ниже контрольного (253 %), а в варианте опыта с поливом суспензией данного штамма лишь незначительно превышал контрольный показатель, составив 347 %.

Динамика прироста микрорастений осенней посадки представлена на рис. 2.

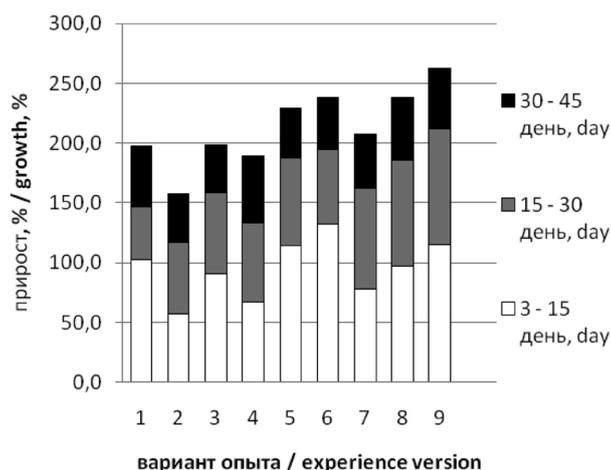


Рис. 2. Влияние суточных культур бактерий рода *Pseudomonas* sp. на динамику роста растений осенней посадки по периодам, %. Обозначения как на рис. 1.

Fig. 2. Effect of daily culture bacteria of the genus *Pseudomonas* sp. on the dynamics of the growth of the autumn planting by period, %. Symbols as in Fig. 1

Заклучение. Применение штаммов бактерий рода *Pseudomonas* в период адаптации обеспечило высокую приживаемость растений, а также способствовало увеличению их прироста, при этом отмечалась различная интенсивность ростстимулирующего эффекта PGPR микроорганизмов, который зависел не только от штамма, но и от способа обработки микрорастений.

Установлено, что у растений различных сроков посадки разные периоды наиболее интенсивного роста. У растений летней посадки он приходился на период с 15-го по 30-й день, а у растений осенней посадки – на первые полторы недели адаптации.

Наиболее благоприятное воздействие ризосферных бактерий в летний период проявилось при обмакивании корней растений в культуру *Ps. mendocina* pAUSCD 1.7 и при поливе рабочим раствором бульонной культуры *Ps. fluorescens* pACD 1.4. В осенний период наилучшие результаты получены при использовании бактерий штамма *Ps. mendocina* 9–40.

Применение всех штаммов псевдомонад, за исключением *Ps. aurantiaca* В 162/17, оказало ростстимулирующее влияние на микрорастения. При этом обработка адаптируемых

растений березы пушистой (*Betula pubescens* Ehrh.) культурами ризосферных бактерий при посадке в осенний период привела к их значительно большему ростстимулирующему воздействию.

Необходимо отметить, что приживаемость растений осенней посадки в пяти вариантах опыта составила 100 %, в остальных – более 95 %, что превышало аналогичный показатель для растений летнего срока посадки.

В результате проведенных исследований нами отобраны штаммы ризосферных бактерий рода *Pseudomonas*: *Ps. mendocina* рAYSCD 1.7 и *Ps. mendocina* 9–40 как наиболее перспективные для применения в ходе адаптации микроклональных растений к почвенным условиям.

Список использованных источников

1. Яцына, А. А. Перспективы использования методов культуры клеток и тканей в селекции лесных древесных растений / А. А. Яцына, И. И. Концевая // Лесная наука на рубеже XXI века: сб. науч. тр. Ин-та леса НАН Беларуси. – Гомель, 1997. – Вып. 46. – С. 127–134.
2. Размножение *in vitro* *Gerbera hybrida* и адаптация к оранжерейным условиям / И. Ф. Вайновская [и др.] // Ботаника (исследования): сб. науч. тр. Ин-та эксперим. ботаники НАН Беларуси. – Минск: Право и экономика, 2009. – Вып. 37. – С. 363–373.
3. Деменко, В. И. Микроклональное размножение садовых растений / В. И. Деменко. – М.: Изд-во МСХА, 2007. – 55 с.
4. Yao-Hong, Z. Effects of *in vitro* rooting environments and irradiance on growth and photosynthesis of strawberry plantlets during acclimatization / Z. Yao-Hong, G. De-Ping, Z. Zhu-Jun // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2005. – N 81. – P. 105–108.
5. Perez, E. A. Preparing tissue-cultured banana plantlets for field planting / E. A. Perez, C. R. Hooks // Biotechnology. – 2008. – N 8. – P. 1–3.
6. Деменко, В. И. Адаптация растений, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям / В. И. Деменко, В. А. Лебедев // Изв. ТСХА. – 2011. – № 1. – С. 60–70.
7. Острикова, М. Я. Влияние обработки культурами ризосферных бактерий на приживаемость и адаптацию ренератов осины (*Populus tremula* L.) / М. Я. Острикова, А. В. Константинов, И. М. Баландина // Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. тр. Ин-та леса НАН Беларуси. – Гомель, 2011. – Вып. 71. – С. 287–293.
8. The effect of mycorrhiza in nutrient uptake and biomass of cherry rootstocks during acclimatization / Y. Aka-Kacar [et al.] // Romanian Biotechnol. Lett. – 2010. – Vol. 15, N 3. – P. 46–52.
9. Ștefan, M. Plant growth promoting rhizobacteria can inhibit the *in vitro* germination of *Glycine max* L. seeds / M. Ștefan, M. Mihășan, S. Dunca // Anale Științifice ale Universității “Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară. – 2008. – Vol. IX. – P. 105–110.
10. The effect of PGPR strain on wheat yield and quality parameters / M. Turan [et al.] // 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World, Brisbane, 1–6 August 2010. – P. 209–212.
11. Микроорганизмы продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор) / Е. А. Цевкелова [и др.] // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 133–143.
12. Свойства фосфатмобилизующих бактерий и их влияние на урожайность зерновых культур на дерново-подзолистых супесчаных почвах / Т. Б. Барашенко [и др.] // Почвоведение и агрохимия. – 2011. – № 2 (47). – С. 120–129.
13. Лешина, Л. Г. Клеточные и молекулярно-генетические механизмы симбиоза и ассоциативного взаимодействия микроорганизмов с растениями в ризосфере / Л. Г. Лешина // Biopolymers and cell. – 2009. – Vol. 25, N 1. – С. 27–38.
14. Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals / J. J. Acuña [et al.] // J. of Soil Sci. and Plant Nutrition. – 2011. – Vol. 11 (3). – P. 1–12.
15. Nor Aini, A. S. The effects of different indole-3-butyric acid (IBA) concentrations, two light regimes of *in vitro* rooting and acclimatization of *in vitro* teak (*Tectona grandis* L.) plantlets / A. S. Nor Aini, B. L. Goh, R. Ridzuan // Afr. J. of Biotechnol. – 2009. – Vol. 8, N 22. – P. 58–61.
16. Owen, H. R. An examination and correction of plant tissue culture basal medium formulations / H. R. Owen, A. R. Miller // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 1992. – Vol. 28. – P. 147–150.
17. Шибаева, Т. Г. ДРОП – обработка рассады томатов в условиях круглосуточного освещения – эффективный способ повышения продуктивности / Т. Г. Шибаева, М. И. Сысоева // Инновационные направления современной физиологии растений: тез. докл. Всерос. науч. конф. с междунар. участием. – Москва, 2–6 июня 2013 г. – С. 103–104.

References

1. Yatsyna, A. A. and Kontsevaya, I. I. (1997) “Prospects of using of cell and tissue culture techniques in breeding of forest woody plants”, *Lesnaya nauka na rubezhe XXI veka: sb. nauch. tr. In-ta lesa NAN Belarusi* [Proc. of the Forest Institute of NAS of Belarus "Forest Science at the turn of the XXI century"], Minsk, BY, vol. 46, pp. 127-134.
2. Vainovskaya, I. F., Chumakova, I.P., Glushakova, N.M. and Fomenko, T. I. (1997) “In vitro reproduction *Gerbera hybrida* and acclimatization to the greenhouse conditions”, *Botanika (issledovaniya): sb. nauch. tr. In-ta eksperim. botaniki NAN Belarusi* [Proc. of the Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences. Botany (research)], vol. 46, pp. 127-134.

3. Demenko, V. I. (2007) *Mikroklonal'noe razmnozhenie sadovykh rastenii* [Micropropagation of garden plants], MAA, Moscow, RU.
4. Yao-Hong, Z., De-Ping, G. and Zhu-Jun, Z. (2005) "Effects of *in vitro* rooting environments and irradiance on growth and photosynthesis of strawberry plantlets during acclimatization", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, no. 81, pp. 105-108.
5. Perez, E. A. and Hooks, C. R. (2008) "Preparing tissue-cultured banana plantlets for field planting" *Biotechnology*, no. 8, pp. 1-3.
6. Demenko, V. I. and Lebedev, V. A. (2011) "Acclimatization of *in vitro* obtained plant, in non-sterile conditions", *Izvestiya Timiryazevskoi sel'skokhozyaistvennoi akademii* [Izvestiya Timiryazev Agricultural Academy], no. 1, pp. 60-70.
7. Ostrikova, M. YA., Konstantinov, A. V. and Balandina, I. M. (2011) "The influence of treatment with cultures of rhizosphere bacteria on survival rate and acclimatization of aspen (*Populus tremula* L.) regenerants", *Problemy lesovedeniya i lesovodstva: sb. nauch. tr. In-ta lesa NAN Belarusi* [Proc. of the Forest Institute of NAS of Belarus "Problems of Forest and Forestry"], Minsk, BY, vol. 71, pp. 287-293.
8. Aka-kaçar, Y., Akpınar, Ç., Agar, A., Yalçın-Mendi, Y., Serçe, S. and Ortaş, İ. (2010) "The effect of mycorrhiza in nutrient uptake and biomass of cherry rootstocks during acclimatization", *Romanian Biotechnological Letters*, vol. 15, no. 3, pp. 46-52.
9. Ştefan, M., Mihăşan, M. and Dunca, S. (2008) "Plant growth promoting rhizobacteria can inhibit the *in vitro* germination of *Glycine max* L. seeds", *Analele Ştiinţifice ale Universităţii "Alexandru Ioan Cuza", Secţiunea Genetică şi Biologie Moleculară*, vol. IX, pp. 105-110.
10. Turan, M., Gulluce, M., Cakmakci, R., Oztas, T. and Sahin, F. (2010) "The effect of PGPR strain on wheat yield and quality parameters", *19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World, Brisbane, 1–6 August 2010*, Brisbane, AU, pp. 209-212.
11. Tsevelova, Ye. A., Klimova, S. Yu., Cherdyntseva, T. A. and Netrusov, A. I. (2006) "Microorganisms as producers of plant growth stimulants and their application in practice (the review)", *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied Biochemistry and Microbiology], vol. 42, no. 2, pp. 133-143.
12. Barashenko, T. B., Dyusova, S. V., Mikanova, O., Mikhaylovskaya, N. A. and Tarasyuk, Ye. G. (2011) "Properties of phosphate mobilizing bacteria and their effect on the yield of grain crops on sod-podzolic sandy loam soils", *Pochvovedeniye i agrokhimiya* [Soil Science and Agricultural Chemistry], no. 2 (47), pp. 120-129.
13. Leshina, L. G. (2009) "Cellular and molecular-genetic mechanisms of symbiosis and associative interaction of microorganisms with plants in rhizosphere", *Biopolymers and cell*, vol. 25, no. 1, pp. 27-38.
14. Acuña, J. J., Jorquera, M. A., Martínez, O. A., Menezes-Blackburn, D., Fernández, M. T., Marschner, P., Greiner, R. and Mora, M. L. (2011) "Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals", *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 11 (3), pp. 1-12.
15. Nor Aini, A. S., Goh, B. L. and Ridzuan, R. (2009) "The effects of different indole-3-butyric acid (IBA) concentrations, two light regimes of *in vitro* rooting and acclimatization of *in vitro* teak (*Tectona grandis* L.) plantlets", *African Journal of Biotechnology*, vol. 8, N 22, pp. 58-61.
16. Owen, H. R. and Miller, A. R. (1992) "An examination and correction of plant tissue culture basal medium formulations", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 28, pp. 147-150.
17. Shibaeva, T. G. and Sysoeva, M. I. (2007) "DROP - processing of tomato seedlings in a day and night lighting – effective way to increase productivity", *Innovatsionnye napravleniya sovremennoi fiziologii rastenii: tez. dokl. Vseros. nauch. konf. s mezhdunar. uchastiem* [Proc. All-Russian Scientific Conference with international participation "Innovative trends in modern plant physiology"], Moscow, RU, pp. 103-104.

Информация об авторах

Константинов Андрей Вячеславович – магистр биол. наук, мл. науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 226001, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: avkonstantinov@mail.ru

Острикова Марина Яковлевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 226001, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: heterobasidion@mail.ru

Для цитирования

Константинов, А. В. Влияние штаммов ризосферных псевдомонад на рост микроклональных растений березы пушистой (*Betula pubescens* Ehrh.) в разные сроки посадки / А. В. Константинов, М. Я. Острикова // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. бйял. навук. – 2016. – № 4. – С. 107–113.

Information about the authors

Konstantinov Andrei Vyacheslavovich – M. Sc. (Biol.), Junior Research Scientist. Institute of Forest of National Academy of Sciences of Belarus, (Proletarian str., 71, 246001, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: victor.shaposhnikov@gmail.com

Ostrikova Marina Yakovlevna – Ph. D. (Biol.), Senior Scientific Researcher. Institute of Forest of National Academy of Sciences of Belarus, (Proletarian str., 71, 246001, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: heterobasidion@mail.ru

For citation

A. V. Konstantinov, M. Ya. Ostrikova. The influence of treatment with rhizospheric strains of pseudomonas on growth and development of birch (*Betula pubescens* Ehrh.) regenerants at different times landing. *Proceedings of the National academy of sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 107–113.

Е. В. Винцек, А. П. Григорчик

Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь

**ПИТАНИЕ БЫЧКА-ГОНЦА (*NEOGOBIUS GYMNOTRACHELUS*)
И БЫЧКА-ЦУЦИКА (*PROTERORHINUS MARMORATUS*)
В РЕКЕ ДНЕПР (БЕЛАРУСЬ)**

Изучен состав пищи чужеродных видов рыб (бычка-гонца (*Neogobius gymnotrachelus*) и бычка-цуцика (*Proterorhinus marmoratus*)), обитающих на нижнем участке р. Днепр на территории Брагинского района (Беларусь). Показано, что основу рациона гонца составляют организмы, относящиеся к зообентосу (89,6 %): личинки сем. Chironomidae и отр. Coleoptera, ракообразные отр. Amphipoda. В рационе цуцика преобладает зоопланктон (64,3 %), представленный сем. Cladocera. Анализ степени сходства состава пищи показал, что конкуренция за пищевые ресурсы между данными видами невысока (35,5 %).

Ключевые слова: чужеродные виды рыб, река Днепр, бычок-гонец, бычок-цуцик, питание рыб.

E. V. Vintsek, A. P. Grigorchik

*Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources,
Minsk, Republic of Belarus*

**DIET OF TUBENOSE GOBY (*NEOGOBIUS GYMNOTRACHELUS*) AND RACER GOBY
(*PROTERORHINUS MARMORATUS*) IN THE RIVER DNIEPER (BELARUS)**

The food spectrum of alien species of fishes (the tubenose goby (*Neogobius gymnotrachelus*) and the racer goby (*Proterorhinus marmoratus*)) from the lower Dnieper River in Bragin region (Belorussia) was researched. Dominant position in the diet of the tubenose goby is among zoobenthic organisms (89.6 %): larvae of chironomid and bugs, amphipod crustaceans. The preferred food category for the racer goby is zooplankton (64.3 %), represented by cladocera. The degree of similarity of the food spectrum analysis showed, that competition in the diet among these species is not high (35.5 %).

Keywords: alien species of fish, the Dnieper River, tubenose goby, racer goby, diet of fish.

Введение. Проблема естественного расширения ареала, а также смещение фауны в новые для нее места обитания исторически существовала всегда. В последние годы значительные масштабы приобрело распространение инвазивных видов рыб, обусловленное в первую очередь воздействием антропогенных факторов на природные комплексы: строительством каналов, соединяющих воды разных речных систем, развитием морского и речного транспорта, гидростроительством и пр. Немалую роль в миграционных процессах играет также изменение климата.

Одними из чужеродных видов рыб на территории Беларуси являются понто-каспийские представители сем. Gobiidae, а именно бычок-гонец (*Neogobius gymnotrachelus*) и бычок-цуцик (*Proterorhinus marmoratus*). До недавнего времени бычок-гонец встречался на нижнем участке р. Днепр до впадения Березины, а также в реках Припять (бассейн Черного моря), Мухавец, Западный Буг (бассейн Балтийского моря), и в Днепроовско-Бугском канале [1]. По нашим данным, бычок-гонец выявлен также в р. Сож выше г. Гомель. Бычок-цуцик обнаружен в р. Припять, нижнем течении Днепра (Брагинский р-н), и в р. Сож в Гомельском р-не [2].

Цель работы – изучение состава рациона таких видов-вселенцев, как бычок-гонец и бычок-цуцик, обитающих в реках Беларуси, и оценка их трофических взаимоотношений с аборигенной ихтиофауной.

Материалы и методы исследования. Материал для исследования был собран на нижнем участке р. Днепр на территории Брагинского района в августе 2014 г. Отлов осуществляли мелкочейистым неводом (длина 30 м, размер ячеи 8–10 мм) и сачком (ячея 8 мм) на глубине 0,2–1,5 м. Собранный материал фиксировали в 4 %-ном растворе формалина.

Обработку материала проводили в лабораторных условиях по методике И. Ф. Правдина [3]: измеряли длину, массу тела, определяли пол и возраст. После этого изымали желудок и фиксировали в 4 %-ном формалине, снабжая этикеткой с указанием вида и номера рыбы.

Для изучения питания рыб отобранные экземпляры (по 35 каждого вида) были разделены на две возрастные группы (табл. 1).

Изучение содержимого желудков проводили согласно методическому пособию по изучению питания рыб в естественных условиях [4].

Степень сходства состава пищи («объем конкуренции») оценивали по методу, предложенному А. А. Шорыгиным [4]. Для этого в процентах определяли состав пищи двух видов рыб и подсчитывали количество кормовых объектов, общих для двух видов. Сумма меньших процентов, независимо от того, в составе пищи какого из двух видов данный пищевой объект встречается, позволяет судить о степени сходства пищи.

Т а б л и ц а 1. Размерно-весовые показатели исследованных экземпляров рыб разных возрастных групп

Показатель	Двухлетки			Трехлетки		
	К-во экз.	min-max	Среднее	К-во экз.	min-max	Среднее
Длина тела, мм:						
бычка-гонца	7	35,8–39,8	38,5	28	40,0–74,2	50,6
бычка-цуцика	19	32–39,8	35,9	16	40,0–49,8	44,1
Масса тела, г:						
бычка-гонца	7	1,24–3,24	2,17	28	1,22–8,72	2,82
бычка-цуцика	19	0,66–1,56	0,97	16	1,52–2,60	2,03

Результаты и их обсуждение. Кормовые объекты, выделенные из пищевого комка бычка-гонца, были разделены на 12 групп (табл. 2).

Первое место в рационе гонца по частоте встречаемости занимали личинки сем. Chironomidae (53,5 % от общего количества экземпляров пищевых объектов), второе – личинки отр. Coleoptera (16,1 %), среди которых *Haliphus* sp. (7,4 %), *Laccobius* sp. (6,5 %) и *Limnius* sp. (2,2 %), третье – представители сем. Gammaridae (8,3 %) и отр. Dafniiformes (7,8 %). На остальные компоненты пищи приходилось 14,3 %. Также у 17,1 % особей в желудке была обнаружена чешуя, принадлежащая рыбам сем. Gobiidae.

Т а б л и ц а 2. Состав пищи бычка-гонца (*Neogobius gymnotrachelus*) и бычка-цуцика (*Proterorhinus marmoratus*) разных возрастных групп из р. Днепр (в процентах от количества экземпляров пищевых объектов)

Группы кормовых объектов		Бычок-голец		Бычок-цуцик		
		Двухлетки	Трехлетки	Двухлетки	Трехлетки	
Класс Bivalvia		3,2	–	–	–	
Класс Crustacea	Отр. Cyclopoida	–	3,0	–	–	
	Отр. Dafniiformes	–	9,1	66,1	55,2	
	Отр. Amphipoda	12,9	7,5	15,6	19,0	
	Отр. Isopoda	–	1	–	–	
Класс Insecta	Отр. Odonata	–	1,0	0,9	3,5	
	Отр. Ephemeroptera	–	0,5	–	–	
	Отр. Trichoptera	16,1	5,0	–	–	
	Отр. Diptera	Сем. Chironomidae	48,4	54,3	17,0	22,4
		Другие	3,2	1,5	–	–
	Отр. Heteroptera	–	1,0	–	–	
Отр. Coleoptera	16,1	16,1	0,5	–		

Пищевой комок бычка-цуцка состоял из 5 компонентов. Наиболее часто встречались представители отр. Dafniiformes (64,3 %), среди которых *Bosmina* sp. (40,7 %) и *Alona* sp. (23,6 %), а также личинки сем. Chironomidae (18,2 %) и ракообразные сем. Gammaridae (15,7 %). Остальные пищевые объекты составили 1,8 % в рационе цуцка.

Важно отметить, что в пищевом комке одного экземпляра бычка-цуцка (двухлетка длиной 32,0 мм и весом 0,66 г) найден малек рыбы размером 6 мм. У 20 % особей в желудке присутствовала чешуя. Потребление мальков рыб характерно для данных видов в естественных местообитаниях [5], что подтверждается и для пресноводных популяций.

Результаты исследования показали, что состав рациона бычка-гонца более разнообразен и менее специфичен, чем бычка-цуцка.

Анализ степени сходства состава пищи бычка-гонца и бычка-цуцка (табл. 3) показал, что объем конкуренции за пищевые ресурсы между данными видами не высок (в среднем 35,5 %). Это обусловлено тем, что основу рациона гонца составляют организмы, относящиеся к зообентосу (89,6 %), а в рационе бычка-цуцка преобладает зоопланктон (64,3 %).

Т а б л и ц а 3. Индексы сходства пищевых компонентов бычка-гонца (*Neogobius gymnotrachelus*) и бычка-цуцка (*Proterorhinus marmoratus*) разных возрастных групп из р. Днепр (по Шорыгину), %

Вид	Бычок-голец (трехлетки)	Бычок-цуцк (двухлетки)	Бычок-цуцк (трехлетки)
Бычок-голец (двухлетки)	78,55	30,31	35,31
Бычок-голец (трехлетки)	–	34,89	40,01
Бычок-цуцк (двухлетки)	–	–	88,65

Значительных различий в рационе рыб одного вида из разных возрастных групп не выявлено, что характерно для данных видов в их естественных местообитаниях [5].

Заключение. Анализ питания бычка-гонца и бычка-цуцка на нижнем участке р. Днепр (Брагинский район) показал, что данные виды успешно адаптируются к новым условиям и проявляют пищевую пластичность, которая характеризуется разнообразием пищевого спектра и потреблением массового и доступного корма.

В местах их естественного обитания наблюдается конкуренция за кормовые объекты между различными видами бычковых, обусловленная потреблением сходных групп бентосных организмов (моллюски, полихеты, молодь крабов, амфиподы), а также мальков рыб [5]. Основу рациона пресноводных популяций бычка-гонца и бычка-цуцка в р. Днепр составляют разные типы гидробионтов (зообентос и зоопланктон соответственно), что предотвращает трофическую конкуренцию между видами в новых условиях обитания.

Как показали результаты исследования, бычок-голец и бычок-цуцк в пищевом отношении могут создавать конкуренцию молодежи ценных промысловых рыб, основу питания которых составляют хирономиды и организмы зоопланктона [6]. Но, с другой стороны, данные виды-вселенцы становятся доступным кормом хищных рыб (окунь, судак, щука, сом), что приводит к снижению пресса хищников на молодь ценных в промысловом отношении видов рыб [7].

Список использованных источников

1. Гулюгин, С. Ю. Новые данные по расширению ареала бычков рода *Neogobius*: песочника *N. fluviatilis*, кругляка *N. melanostomus*, гонца *N. gymnotrachelus* / С. Ю. Гулюгин, Д. Ф. Куницкий // Тез. докл. Междунар. науч.-техн. конф. посвящ. 40-летию пребывания КГТУ на Калининград. земле и 85-летию высшего рыбохозяйств. образования в России (17–19 ноября 1998 г.). – Калининград, 1999. – Ч. 1. – С. 5.
2. Ризевский В. К. Новый для ихтиофауны Беларуси вид рыб – бычок-цуцк *Proterorhinus marmoratus* / В. К. Ризевский, М. В. Плюта, А. В. Лещенко, И. А. Ермолаева // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2010. – № 1. – С. 100–103.
3. Правдин, И. Ф. Руководство по изучению рыб / И. Ф. Правдин. – М., 1966. – 372 с.
4. Методическое пособие по изучению питания и пищевых отношений рыб в естественных условиях. – М., 1974. – 254 с.
5. Смирнов, А. И. Фауна Украины. Рыбы. Окунеобразные (бычководные), скорпенообразные, камбалообразные, присоскопорообразные, удильщикообразные / А. И. Смирнов. – Киев, 1986. – С. 107–115, 161–168.
6. Никольский, Г. В. Частная ихтиология / Г. В. Никольский. – М., 1971. – С. 362.
7. Семенов, Д. Ю. Роль чужеродных видов в питании хищных рыб Куйбышевского водохранилища / Д. Ю. Семенов // Поволжск. экол. журн. – 2009. – № 2. – С. 148–157.

References

1. Gulyugin, S. Yu. and Kunitskii, D. F. (1999) "New data on the area expansion of gobies species: monkey goby *N. fluviatilis*, round goby *N. melanostomus*, racer goby *N. gymnotrachelus*", *Tezisy докладov Mezhdunarodnoi nauchno-tekhnicheskoi konferentsii, posvyashchennoi 40-letiyu prebyvaniya KGTU na Kaliningradskoi zemle i 85-letiyu vysshego rybokhozyaistvennogo obrazovaniya v Rossii (17–19 noyabrya 1998 g.)* [Abstracts of the International scientific conference devoted to the 40th anniversary of the visit to Kaliningrad, KSTU earth and the 85th anniversary of higher education in the Russian fishery (17–19 November 1998)], Kaliningrad, RU, vol. 1, p. 5.
2. Rizevskii, V. K., Plyuta, M. V., Leshchenko, A. V. and Ermolaeva, I. A. (2010) "New to the Belarusian fish fauna species of fish – racer goby *Proterorhinus marmoratus*", *Vestsi Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], no. 1, pp. 100–103.
3. Pravdin, I. F. (1966) *Rukovodstvo po izucheniyu ryb* [Guide to the study of fish], Minsk, BY.
4. (1974) *Metodicheskoe posobie po izucheniyu pitaniya i pishchevykh otnoshenii ryb v estestvennykh usloviyakh* [Guidelines on the study of diet and food relation of fish in the wild], Moscow, RU
5. (1986) "Goby-runner – *Neogobius gymnotrachelus* (Kessler, 1857)", Smirnov, A. I. *Fauna Ukrainy. Ryby. Tom 8. Vip. 5. Okuneobraznye (bychkovidnye), skorpenoobraznye, kambaloobraznye, prisoskoperoobraznye, udil'shchikoobraznye* [Fauna of Ukraine. Fish. Volume 8. VIP. 5. Perciformes (bychkovidnye) scorpaeniformes, flatfish, prisoskoperoobraznye, anglerfish], Kiev, UA, pp. 107–115, 161-168.
6. Nikol'skii, G. V. (1971) *Chastnaya ikhtiologiya* [Private ichthyology], 3rd ed., Vysshaya shkola, Moscow, RU.
7. Semenov, D. Yu. (2009) "The role of alien species in the diet of carnivorous fish of the Kuibyshev Reservoir", *Povolzhskii ekologicheskii zhurnal* [Volga Journal of Ecology], no. 2, pp. 148–157.

Информация об авторах

Винцек Елизавета Вячеславовна – мл. науч. сотрудник. Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zemlianika_8@mail.ru

Григорчик Антонина Петровна – магистр биол. наук, мл. науч. сотрудник. Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: imbris.09@mail.ru

Для цитирования

Винцек, Е. В. Питание бычка-гонца (*Neogobius gymnotrachelus*) и бычка-цуцика (*Proterorhinus marmoratus*) в реке Днепр (Беларусь) / Е. В. Винцек, А. П. Григорчик // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2016. – № 4. – С. 114–117.

Information about the authors

Vintsek Elizaveta Vyacheslavovna – Junior Scientific Researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences for Bioresources (Akademicheskaya str., 27, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zemlianika_8@mail.ru

Grigorchik Antonina Petrovna – M. S. (Biol.), Junior Scientific Researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences for Bioresources (Akademicheskaya str., 27, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: imbris.09@mail.ru

For citation

Vintsek E. V., Grigorchik A. P. Diet of tubenose goby (*Neogobius gymnotrachelus*) and racer goby (*Proterorhinus marmoratus*) in the river Dnieper. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 114–117.

АГЛЯДЫ
REVIEWS

УДК 579.66+615.272.7:615.277.3

Поступила в редакцию 31.08.2016

Received 31.08.2016

А. И. Зинченко

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

АДЕНОЗИН КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ БИОТЕРАПИИ РАКА

В данном обзоре литературы рассматривается роль внеклеточного аденозина в формировании иммуносупрессивного аденозинергического микроокружения солидных опухолей. Вызванное гипоксией накопление внеклеточного аденозина в концентрации 50–100 мкМ (норма 10–100 нМ) является патофизиологическим признаком широкого круга злокачественных новообразований у человека. У аденозина как сигнальной молекулы выявлено четыре типа поверхностно-клеточных рецепторов, активация которых приводит к ингибированию эффекторных функций цитотоксических Т-лимфоцитов, натуральных киллеров и макрофагов, играющих ключевую роль в противоопухолевых иммунных ответах. Автором предложена идея устранения защиты рака от иммунитета с помощью аденозиндеаминазы, слитой с аннексином-А5. По мнению автора, такой химерный белок при введении в организм пациентов, страдающих от онкологических заболеваний, будет связываться только с раковыми клетками и разрушать аденозин, защищающий эти клетки от противоопухолевого иммунитета.

Ключевые слова: внеклеточный аденозин, аденозиновые рецепторы, опухолевое микроокружение, иммуносупрессия, биотерапия рака, аденозиндеаминаза, аннексин-А5.

A. I. Zinchenko

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

ADENOSINE AS A POTENTIAL TARGET FOR CANCER BIOTHERAPY

The literature review describes the role of extracellular adenosine in formation of immunosuppressive adenosinergic microenvironment of solid tumors. Hypoxia-induced accumulation of extracellular adenosine in 50–100 μM concentration (cf the normal 10–100 nM) is a pathophysiological indicator of a broad spectrum of human malignant neoplastic diseases. Four types of cell surface receptors for adenosine as the signal molecule have been revealed. Upon activation the receptors cause inhibition of effector functions of cytotoxic T-lymphocytes, native killers and macrophages playing a key part in antitumor immune response. The author of the review proposed the idea to remove the procancer shield from immune attack using adenosine deaminase fused with annexin A5. It was postulated that such chimeric protein injected into the body of cancer patient will bind exclusively with tumor cells and disrupt adenosine protecting them from cancerostatic immune action.

Keywords: extracellular adenosine, adenosine receptors, tumor microenvironment, immunosuppression, cancer biotherapy, adenosine deaminase, annexin A5.

Молекула аденозина (синонимы: рибозид аденина, аденин-9-β-D-рибофуранозид, 6-аминопуринрибозид) состоит из пуринового основания (аденина), соединенного через гликозидную связь с углеводом (рибозой) (рис. 1). Поочередное добавление фосфатных групп (рис. 1, а) позволяет получить соответственно 5'-монофосфат аденозина (АМФ), 5'-дифосфат аденозина (АДФ) и 5'-трифосфат аденозина (АТФ).

Аденозин присутствует во всех клетках преимущественно в форме адениновых нуклеотидов, которые принимают участие в клеточном энергетическом метаболизме и служат прекурсорными молекулами при синтезе многих важных соединений. Однако аденозин может существовать и в свободной форме, отвечая за регуляцию ряда биохимических процессов в организме.

Роль аденозина существенно возрастает в тех случаях, когда ткани обедняются кислородом (состояние, известное как гипоксия). Это происходит в таких патологических ситуациях, как инсульт мозга, инфаркт миокарда, солидный рак [1]. В солидных опухолях гипоксия – хроническое состояние, потому что кровеносные сосуды, которые формирует быстрорастущая раковая опухоль, содержат многочисленные дефекты и поэтому не способны обеспечивать доставку в опухоль достаточного количества кислорода и питательных веществ. Раковая клетка отвечает на низкое парциальное давление кислорода изменением своего энергетического метаболизма. При этом существенно изменяется и метаболизм аденозина (рис. 2).

Аденозин обычно образуется внутри клетки из АМФ (под действием эндо-5'-нуклеотидазы) или в результате гидролиза S-аденозилгомоцистеина. Дегградация аденозина – внутриклеточный процесс с участием аденозинкиназы и аденозиндезаминазы [2]. Однако в опухолях основным источником образования аденозина служит внеклеточный катаболизм адениновых нуклеотидов. Этот процесс протекает на внешней стороне клеточной мембраны под действием мембрансвязанных экто-5'-нуклеотидаз – CD39 и CD73 [3]. Очень низкие уровни внеклеточного аденозина у CD73-дефицитных мышей свидетельствуют о том, что дегградация АТФ является основным источником внеклеточного аденозина [4, 5].

Как следует из рис. 2, концентрацию избыточного внеклеточного аденозина может снижать транспортер нуклеозидов [6], перемещающий его внутрь клетки, где он трансформируется в АМФ или инозин под действием соответственно аденозинкиназы или аденозиндезаминазы. Если уровни внеклеточного аденозина повышаются, он активирует рецепторы, локализованные как на опухолевых, так и на многочисленных иммунных клетках. Активация рецепторов инициирует цепь молекулярных событий, приводящих к формированию так называемого аденозинергического иммуносупрессивного микроокружения опухоли, которое характеризуется экспансией и повышением активности проопухолевых иммунных клеток и, наоборот, угнетением пролиферации и снижением активности антиопухолевых иммунных клеток. Кроме того, происходит стимуляция ангиогенеза, приводящая к формированию новой кровеносной сосудистой сети опухоли.

Многолетнее системное изучение солидных опухолей показало, что вызванное гипоксией накопление внеклеточного аденозина в концентрации 50–100 мкМ (норма 10–100 нМ) является патофизиологическим признаком широкого круга злокачественных новообразований у человека [7–10]. В частности, показано, что гипоксия приводит к усиленному синтезу гипоксия-индуцибельного фактора 1 α (HIF-1 α), а этот фактор, в свою очередь, увеличивает экспрессию ферментов, продуцирующих аденозин из адениновых нуклеотидов [11, 12]. В то же время аденозинкиназа, которая преобразует аденозин в АМФ, ингибируется [13]. Эти и другие изменения повышают концентрацию аденозина как внутри, так и вне клетки [11].

У аденозина как сигнальной молекулы обнаружено четыре подтипа рецепторов (A1, A2A, A2B и A3), которые отличаются по локализации, аффинности к аденозину и сигнальным путям [14, 15]. Из всех известных подтипов аденозиновых рецепторов в большинстве иммунных клеток преобладает рецептор A2A [14].

Все рецепторы аденозина в состоянии воздействовать на аденилатциклазу, но могут или увеличивать, или снижать продуцирование вторичного мессенджера – цАМФ [16]. Взаимодействие аденозина с рецепторами на клетках различного типа, находящихся в опухоли, приводит к множеству разнообразных клеточных реакций [17, 18] (см. таблицу).

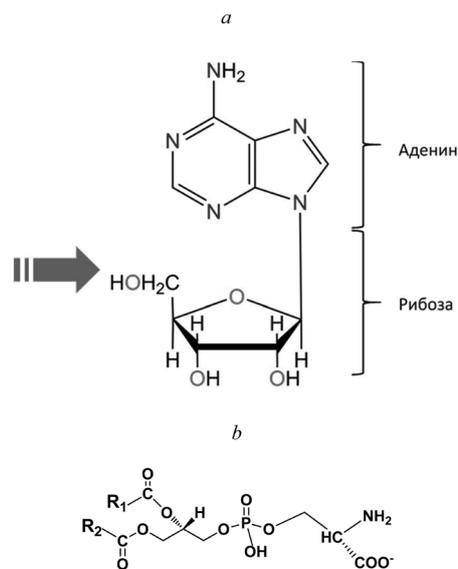


Рис. 1. Химическая структура аденозина (а) и фосфатидилсерина (b); R₁ и R₂ – насыщенные или ненасыщенные углеводородные радикалы жирных кислот

Fig. 1. Chemical structure of adenosine (a) and phosphatidylserine (b). R₁ and R₂ – saturated or nonsaturated hydrocarbonic radicals of fatty acids

Эффекты аденозина на клетки в микроокружении опухоли [17, 18]

Клетки-мишени	Эффекты	Вид рецептора
Дендритные клетки	Снижение антигенпрезентирующей активности	A2A, A2B
Регуляторные клетки (Treg)	Усиление пролиферации	A2A
Миелоидные супрессорные клетки (MDSC)	Усиление экспансии, индукция иммуносупрессивной, проопухолевой активности	A2A, A2B
Натуральные киллеры (НК)	Ингибирование антиопухолевой цитотоксичности	A2A
CD4 ⁺	Ослабление антиопухолевой активности	A2A
CD8 ⁺	Понижение пролиферации и ингибирование антиопухолевой цитотоксичности	A2A
Нейтрофилы	Повышение продуцирования металлопротеаз, способствующих метастазированию	A3
Макрофаги	Поляризация антиопухолевого фенотипа M1 в проопухолевый фенотип M2	A2A, A2B
Опухолевые клетки	Стимуляция пролиферации	A1, A2A
	Стимуляция инвазии, миграции и метастазирования	A3
	Стимуляция продуцирования проангиогенных факторов	A3
Эндотелиальные клетки	Повышение экспрессии фактора роста васкулярного эндотелия (VEGF)	A2A, A2B, A3
	Повышение экспрессии основного фактора роста фибробластов (bFGF)	A2B

Через поверхностно-клеточные рецепторы аденозин ингибирует активность дендритных клеток и макрофагов [19], которые играют ключевую роль в распознавании мишеней для иммунной атаки. А в случае цитотоксических Т-лимфоцитов (Т-киллеры) и натуральных киллеров, степень инфильтрации которых и активность имеют ключевое значение для судьбы опухоли и благоприятного прогноза для пациента, аденозин подавляет важнейшие стадии развития и функции этих клеток: ингибирует пролиферацию клеток и экспрессию ключевых молекул на их поверхности, степень взаимодействия с раковой клеткой, секрецию токсичных молекул, вовлеченных в киллинг клетки, и вообще способность к киллингу клеточных мишеней [1].

Гипоксия и аденозин не только ингибируют антиопухолевые иммунные клетки, но и активируют опухоль-промотирующие клетки, такие как Treg, MDSC и макрофаги M2-типа, которые благоприятствуют установлению в опухоли длительного иммуносупрессивного микроокружения [20].

Все это позволяет опухоли уклониться от иммунного надзора и способствует развитию и распространению рака, в том числе и метастазированию [1, 10]. Если изолировать из опухолевой ткани Т-лимфоциты, то *in vitro* они эффективно убивают опухолевые клетки [18, 21]. Этот факт свидетель-

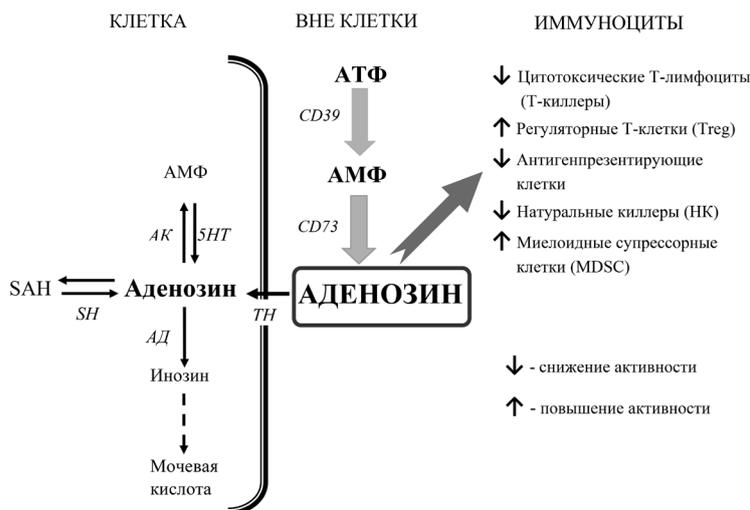


Рис. 2. Метаболизм внеклеточного аденозина и его влияние на клеточный иммунитет.

АД – аденозиндезаминаза, АК – аденозинкиназа, 5НТ – эндо-5'-нуклеотидаза, ТН – транспортер нуклеозидов, САН – S-аденозилгомоцистеин, SH – САН-гидролаза

Fig. 2. Metabolism of extracellular adenosine and its influence on cellular immunity:

AD – adenosine deaminase, AK – adenosine kinase, 5HT – endo-5'-nucleotidase, TN – transporter of nucleosides, SAH – S-adenosylhomocysteine, SH – SAH hydrolase

ствуется о том, что в опухоли формируется окружающая среда, не подходящая для функционирования антиопухолевых иммунных клеток, которые могут быть весьма активны в других условиях.

Рецепторы аденозина найдены также на эндотелиальных клетках, выстилающих вновь формируемые опухолью кровеносные сосуды. Показано, что аденозин стимулирует деление и подвижность этих клеток (ангиогенез) [10]. Таким образом, он может участвовать вместе с другими ангиогенными факторами, такими как фактор роста эндотелия сосудов, в формировании опухолью капиллярной сети [1].

Наконец, аденозин промотирует хроническое воспаление, что способствует росту опухоли и повышает активность иммуносупрессивных цитокинов, таких как трансформирующий фактор роста- β и интерлейкин-10 [10, 22].

Таким образом, к настоящему времени накоплен достаточный экспериментальный материал, позволяющий утверждать, что внеклеточный аденозин – один из главных факторов, ответственных за феномен «метаболической супрессии» противоопухолевого иммунного ответа. Особенно показательным в этом плане явились эксперименты А. Ohta и соавт. [9], в ходе которых у A2A-дефицитных мышей спонтанно отторгалась привитая опухоль, тогда как у мышей дикого типа подобного регресса опухоли не наблюдалось.

Способность аденозина действовать как иммунодепрессант ярко иллюстрируется известным генетическим заболеванием, характеризующимся дефицитом аденозиндезаминазы. Повышение уровня аденозина, наблюдаемое при этом нарушении, вызывает тяжелый иммунодефицит, вынуждающий защищать родившихся младенцев от инфекций в стерильных боксах [1].

Следует отметить, что иммуносупрессивные свойства аденозина используют инфекционные агенты, такие как золотистый стафилококк [23], энтеропатогенная кишечная палочка [24] и влагаллицидная трихомонада [25], для подавления иммунного ответа организма-хозяина. Это происходит благодаря чрезмерному продуцированию этими микроорганизмами аденозина, который с участием рецепторов A2A ингибирует антибактериальные функции нейтрофилов [19, 23].

Учитывая обширные эффекты аденозина почти на все типы клеток, находящихся в опухолях, логично было бы использовать препараты, которые интерферируют с сигнальными путями, проводящими аденозиновый сигнал, с тем чтобы помешать росту раковых клеток, блокировать формирование новых кровеносных сосудов или уменьшить аденозиновую иммуносупрессию.

Результаты представленных выше, а также недавно опубликованных работ [26–30] позволили Р. Vaupel и соавт. [10, 17] составить перечень терапевтических стратегий (рис. 3), которые теоретически можно использовать для устранения негативного влияния аденозина на противоопухолевый иммунитет. Перечень включает: а) респираторную гипероксигенацию, которая, как предполагается, может преобразовать микросреду опухоли из иммуносупрессивной в среду, по крайней мере не препятствующую антиопухолевым иммунцитам выполнять свои эффекторные функции; б) инактивацию продуцирующих аденозин нуклеотидаз CD39 и CD73 с использованием низкомолекулярных ингибиторов или специфических моноклональных антител, а также нокаут соответствующих генов с помощью коротких интерферирующих РНК (siRNA); в) использование аденозиндезаминазы, деградирующей внеклеточный аденозин; г) «выключение» аденозиновых рецепторов с помощью антагонистов аденозина, специфических моноклональных антител или siRNA.

Логично предположить, что перечисленные выше терапевтические вмешательства могут повысить эффективность противоопухолевой иммунотерапии, устранив зависимое от аденозина уклонение опухоли от иммунного надзора [26, 30–34]. Кроме того, они могут ингибировать рост опухоли и ее метастазирование, а также повышать восприимчивость к радиотерапии и химиотерапевтическим средствам (например, к доксорубину, метотрексату, оксалиплатину [22]).

Следует отметить, что проведенные к настоящему времени доклинические исследования в целом продемонстрировали, что таргетирование аденозинергического сигнального пути обладает значительным терапевтическим потенциалом. Однако внедрение этих подходов в клиническую практику осложняется избыточной оксигенацией [35] или неспособностью выбранных антагонистов аденозина ингибировать только необходимые мишени. Проблема здесь заключается в том, что сигналинг аденозина – это эволюционно древняя регуляторная сеть, участвующая в регуляции функционирования большинства органов и тканей в организме млекопитающих

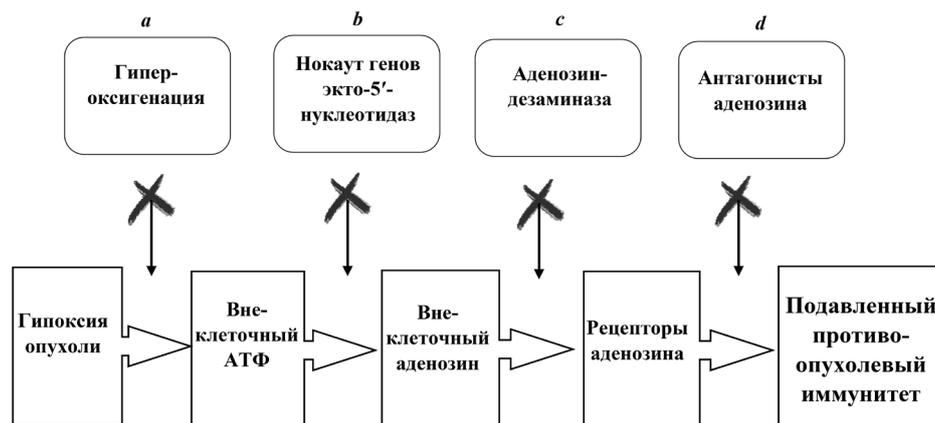


Рис. 3. Гипотетические подходы к обрыву сигнального пути аденозина
 Fig. 3. Hypothetical approaches to break of the signaling adenosine pathways

[36]. Рецепторы аденозина найдены на поверхности многих клеток по всему организму. Поэтому велика вероятность, что препараты, которые заблокируют действие аденозина на уровне рецепторов (антагонисты), нарушат функционирование нервной системы и системы кровообращения. Так, например, С. Секіс и соавт. [37] сообщили, что необратимая блокада рецепторов А2А вредна для антиопухолевых Т-клеточных ответов, что выражается в повышенном апоптозе этих клеток.

Однако, несмотря на отмеченные трудности, исследователи надеются найти «фармакологические окна» для ингибиторов аденозиновых рецепторов, которые позволят применять их отдельно или в сочетании с традиционными лекарственными средствами для людей без непереносимых побочных эффектов. Следует отметить, что таргетирование сигнального пути аденозина хорошо кооперируется с другими ингибиторами «иммунных контрольных точек» (checkpoint), такими как анти-CTLA-4- и анти-PD-1-моноклональные антитела (mAbs) [38, 39].

Следует отметить, что антагонисты рецептора А2А уже проходят клинические испытания (регистрационные номера NCT02403193 и NCT02655822), поэтому в скором времени будут определены все недостатки и достоинства рассматриваемого терапевтического подхода [40].

Экспериментальные данные, приведенные выше, убедительно свидетельствуют о том, что при опухолевом росте имеет место локальная (в пределах микроокружения опухоли) аденозинергическая иммуносупрессия. Этим подавлением иммунитета М. Ситковский [41, 42] объясняет так называемый парадокс Хелстрема, который проявляется в сосуществовании в организме онкологического большого опухолевых клеток и антиопухолевых иммунцитов. Понятно, что эффективные и безопасные способы устранения «барьера» между этими клетками могли бы иметь значительный терапевтический потенциал и содействовали бы созданию препаратов, по механизму действия в корне отличающихся от традиционных противоопухолевых средств.

Современные препараты для химиотерапии рака позволяют продлить жизнь пациентам и улучшить их состояние, порой – на долгие годы. Это возможно, если злокачественное новообразование является чувствительным к препарату. Если речь идет о редких высокочувствительных к химиотерапии опухолях, то такой подход позволяет полностью вылечить пациента. Что касается основных солидных опухолей, то препаратов, способных их полностью излечить, нет.

Здесь уместно напомнить, что традиционные химиотерапии предназначены главным образом для таргетирования машинерии клеточного деления, включая метаболизм нуклеотидов, репликацию ДНК и клеточное деление [43, 44]. Такой терапевтический подход эффективен при киллинге или блокировании роста раковой клетки, но страдает отсутствием специфичности, поскольку применяемые препараты часто токсичны и для нормальных делящихся клеток, которые обычно присутствуют в костном мозге, пищеварительном тракте и волосяных фолликулах. В результате отмечаются серьезные побочные эффекты, такие как миелосупрессия, воспаление слизистых и потеря волос (наиболее безобидный) [45].

В последние годы поиск мишеней, специфических для большинства типов опухолевых клеток, а также метастазов, заставил исследователей обратить внимание на фосфатидилсерин (ФС) –

отрицательно заряженный фосфолипид, который экспонируется на внешнем бислое мембраны раковой клетки [46, 47]. Молекула этого соединения (см. рис. 1) состоит из глицеринового скелета, этерифицированного жирнокислотными остатками различной длины и насыщения (при *sn*-1- и *sn*-2-углеродных атомах), и остатком фосфорной кислоты (при *sn*-3-углеродном атоме), ковалентно связанной с серином [48].

Известно, что в нормальных (не подвергшихся злокачественной трансформации) клетках организма внешний слой двухслойной плазматической мембраны проявляет общий нейтральный заряд благодаря своим главным компонентам – фосфатидилхолину и сфингомиелину, в то время как отрицательно заряженный ФС вместе с фосфатидилэтаноамином образуют внутренний бислой. У раковых клеток происходит перемешивание фосфолипидов, приводящее к почти симметричному их распределению, в том числе ФС, между мембранными бислоями [49–51]. В результате этого процесса на поверхности раковой клетки появляется ФС и она приобретает отрицательный заряд. Таким образом, ФС на поверхности клетки может служить маркером, позволяющим отличать нормальную клетку от опухолевой и осуществлять при необходимости адресную доставку в опухоль тех или иных фармакологических средств [52, 53].

Понятно, что для осуществления направленной доставки фармсубстанции в опухоль необходим молекулярный транспортер, способный распознавать специфический маркер (в нашем случае ФС) на поверхности опухолевой клетки. Известно, что в качестве одного из таких транспортеров может выступать плацентарный человеческий белок – аннексин-А5, который с высокой аффинностью связывается преимущественно с ФС [53–55].

Для устранения рассмотренных выше многочисленных опухоль-промотирующих эффектов внеклеточного аденозина лаборатория молекулярной биотехнологии Института микробиологии НАН Беларуси планирует использовать аденозиндезаминазу (см. рис. 3, *с*). Подразумевается создание для введения в организм пациентов оригинального химерного белка, состоящего из аденозиндезаминазы и аннексина-А5. Ожидается, что если такая белковая конструкция не потеряет своей активности в ходе ее получения, то аннексин-А5 обеспечит адресную доставку ее к покрытым ФС опухолевыми клеткам (в том числе в составе метастазов!), а аденозиндезаминаза ликвидирует «аденозиновое облако» вокруг опухолевых клеток, что (судя по приведенным выше литературным данным) должно «разбудить» в организме-опухоленосителе убийственный для опухоли клеточный иммунитет.

Следует отметить, что снизить концентрацию аденозина в микросреде опухоли можно за счет доставки в опухолевый очаг (вместо аденозиндезаминазы) другого фермента – бактериальной пуриноклеозидфосфорилазы, которая расщепляет аденозин на аденин и рибозо-1-фосфат. Этот вариант интересен тем, что пуриноклеозидфосфорилаза может попутно выполнять еще одну важную функцию – превращать пролекарство (флударабин) в мощный цитостатик (фтораденин) [56].

Принимая во внимание накопленный нами опыт генно-инженерного конструирования штаммов бактерий, продуцирующих разнообразные ферменты про- и эукариот [57–60], в том числе аденозиндезаминазу и пуриноклеозидфосфорилазу *Escherichia coli* [61–63], имеется реальная возможность создать инновационный противоопухолевый биопрепарат, который способен разрушать аденозин, защищающий раковые опухоли от хозяйского иммунитета.

Поскольку молекулярной мишенью такого препарата будет служить только ФС, выстилающий поверхность опухолевых (но не здоровых) клеток, он должен характеризоваться широким спектром действия, селективностью в отношении опухолей и низким уровнем побочных эффектов.

Кроме того, препарат должен иметь низкую токсичность и к нему не должна формироваться резистентность, поскольку его действие не связано с непосредственным киллингом опухолевых клеток.

Заключение. Суммируя приведенные выше результаты исследований, посвященных изучению механизмов проопухолевого действия внеклеточного аденозина, следует отметить, что к настоящему времени достоверно установлено, что АТФ, который выделяется в больших количествах из опухолевых клеток в ответ на химиотерапию или другие стрессовые воздействия, в результате последовательного действия двух экто-5'-нуклеотидаз – CD39 (гидролизует АТФ и АДФ до АМФ) и CD73 (гидролизует АМФ до аденозина) – превращается в аденозин, который в значитель-

ном количестве накапливается в опухолевом микроокружении. Путем активации рецепторов, локализованных на различных иммунных клетках, аденозин подавляет эффекторные функции цитотоксических Т-лимфоцитов, натуральных киллеров и макрофагов, которые играют ключевую роль в противоопухолевом клеточном иммунитете. Показано также, что аденозин промотирует неангиогенез опухолевой ткани. Все это благоприятствует уклонению раковых клеток от иммунного надзора, способствуя таким образом развитию и распространению рака, в том числе его метастазированию.

Расшифровка механизма иммуносупрессивной активности внеклеточного аденозина привела к разработке ряда терапевтических подходов к таргетированию аденозинергического сигнального пути, в основном с помощью фармакологической блокады A2A-аденозиновых рецепторов. Нами предложена идея создания на основе аденозиндезаминазы химерного белка, «снимающего тормоз» с собственного клеточного противоопухолевого иммунитета. Предполагается, что такой белок может служить высокоэффективным препаратом для терапии широкого круга онкологических заболеваний.

Список использованных источников

1. Blay, J. Adenosine and tumor microenvironment / J. Blay // *Encyclopedia of Cancer*. – 3rd ed. – Heidelberg: Springer, 2012. – P. 49–53.
2. How systemic inflammation modulates adenosine metabolism and adenosine receptor expression in humans *in vivo* / B. P. Ramakers [et al.] // *Crit. Care. Med.* – 2012. – Vol. 40, N 9. – P. 2609–2616.
3. Szychala, J. Tumor-promoting functions of adenosine / J. Szychala // *Pharmacol. Ther.* – 2000. – Vol. 87, N 2–3. – P. 161–173.
4. Volmer, J. B. Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated adenosine production is tissue protective in a model of bleomycin-induced lung injury / J. B. Volmer, L. F. Thompson, M. R. Blackburn // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 176. – P. 4449–4458.
5. Lack of effect of extracellular adenosine generation and signaling on renal erythropoietin secretion during hypoxia / A. Grenz [et al.] // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2007. – Vol. 293. – P. 1501–1511.
6. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29 / S. A. Baldwin [et al.] // *Pflügers Arch.* – 2004. – Vol. 447, N 5. – P. 735–743.
7. Busse, M. Accumulation of purine catabolites in solid tumors exposed to therapeutic hyperthermia / M. Busse, P. Vaupel // *Experientia*. – 1996. – Vol. 52, N 5. – P. 469–473.
8. Hasko, G. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity / G. Hasko, B. N. Cronstein // *Trends Immunol.* – 2004. – Vol. 25, N 1. – P. 33–39.
9. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells / A. Ohta [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2006. – Vol. 103. – P. 13132–13137.
10. Vaupel, P. Hypoxia-driven adenosine accumulation: a crucial microenvironmental factor promoting tumor progression / P. Vaupel, A. Mayer // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2016. – Vol. 876. – P. 177–183.
11. Kobayashi, S. Chronic hypoxia enhances adenosine release in rat PC12 cells by altering adenosine metabolism and membrane transport / S. Kobayashi, H. Zimmermann, D. E. Millhorn // *J. Neurochem.* – 2000. – Vol. 74. – P. 621–632.
12. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia / K. Synnestvedt [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 110. – P. 993–1002.
13. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release / U. K. Decking [et al.] // *Circ. Res.* – 1997. – Vol. 81. – P. 154–164.
14. International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors / B. B. Fredholm [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2001. – Vol. 53. – P. 527–552.
15. Linden, J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection / J. Linden // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2001. – Vol. 41. – P. 775–787.
16. The A2aR adenosine receptor controls cytokine production in iNKT cells / M. Nowak [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2010. – Vol. 40, N 3. – P. 682–687.
17. Vaupel, P. Adenosine can thwart antitumor immune responses elicited by radiotherapy. Therapeutic strategies alleviating protumor ADO activities / P. Vaupel, G. Multhoff // *Strahlender Onkol.* – 2016. – Vol. 192, N 5. – P. 279–287.
18. Ohta, A. A metabolic immune checkpoint: adenosine in tumor microenvironment / A. Ohta // *Front. Immunol.* – 2016. – Vol. 7: 109. doi: 10.3389/fimmu.2016.00109.
19. Hasko, G. Regulation of macrophage function by adenosine / G. Hasko, P. Pacher // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2012. – Vol. 32. – P. 865–869.
20. Myeloid cells in the tumor microenvironment: role of adenosine / S. Morello [et al.] // *Oncoimmunology*. – 2016. – Vol. 5, N 3: e1108515.
21. Itoh, K. Interleukin 2 activation of cytotoxic T-lymphocytes infiltrating into human metastatic melanomas / K. Itoh, A. B. Tilden, C. M. Balch // *Cancer Res.* – 1986. – Vol. 46. – P. 3011–3017.
22. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine / L. Antonioli [et al.] // *Nat. Rev. Cancer*. – 2013. – Vol. 13, N 12. – P. 842–857.
23. *Staphylococcus aureus* synthesizes adenosine to escape host immune responses / V. Thammavongsa [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2009. – Vol. 206. – P. 2417–2427.
24. Release of ATP during host cell killing by enteropathogenic *E. coli* and its role as a secretory mediator / J. K. Crane [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2002. – Vol. 283. – P. G74–G86.

25. Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity in intact cells of *Trichomonas vaginalis* / T. Tasca [et al.] // *Exp. Parasitol.* – 2003. – Vol. 105. – P. 167–173.
26. Targeting cancer-derived adenosine: new therapeutic approaches / A. Young [et al.] // *Cancer Discov.* – 2014. – Vol. 4, N 8. – P. 879–888.
27. Hostile, hypoxia-A2-adenosinergic tumor biology as the next barrier to overcome for tumor immunologists / M. V. Sitkovsky [et al.] // *Cancer Immunol. Res.* – 2014. – Vol. 2, N 7. – P. 598–605.
28. Ohta, A. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells / A. Ohta, M. Sitkovsky // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5: 304. doi: 10.3389/fimmu.2014.00304.
29. Adenosine pathway and cancer: where to go from here? / L. Antonioli [et al.] // *Expert Opin. Ther. Targets.* – 2014. – Vol. 18, N 9. – P. 973–977.
30. Anti-CD39 and anti-CD73 antibodies A1 and 7G2 improve targeted therapy in ovarian cancer by blocking adenosine-dependent immune evasion / S. F. Hausler [et al.] // *Am. J. Transl. Res.* – 2014. – Vol. 6, N 2. – P. 129–139.
31. A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy / S. Merighi [et al.] // *Pharmacol. Ther.* – 2003. – Vol. 100, N 1. – P. 31–48.
32. Adenosine A2A receptor antagonists: blockade of adenosinergic effects and T regulatory cells / M. Sitkovsky [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 153, suppl. 1. – P. S457–S464.
33. Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation / S. M. Hatfield [et al.] // *Sci. Transl. Med.* – 2015. – Vol. 7, N 277: 277ra230. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa1260.
34. Hatfield, S. M. A2A adenosine receptor antagonists to weaken the hypoxia-HIF-1 α driven immunosuppression and improve immunotherapies of cancer / S. M. Hatfield, M. Sitkovsky // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 29, N 1. – P. 90–96.
35. Hatfield, S. M. Oxygenation to improve cancer vaccines, adoptive cell transfer and blockade of immunological negative regulators / S. M. Hatfield, M. Sitkovsky // *Oncoimmunology.* – 2015. – Vol. 4, N 12: e1052934. doi: 10.1080/2162402X.2015.1052934.
36. Adenosine receptors: expression, function and regulation / S. Sheth [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15, N 2. – P. 2024–2052.
37. Cekic, C. Adenosine A2A receptors intrinsically regulate CD8⁺ T cells in the tumor microenvironment / C. Cekic, J. Linden // *Cancer Res.* – 2014. – Vol. 74. – P. 7239–7249.
38. Targeting CD73 enhances the anti-tumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs / B. Allard [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2013. – Vol. 19. – P. 5626–5635.
39. Adenosine receptor 2A blockade increases the efficacy of anti-PD-1 through enhanced antitumor T-cell responses / P. A. Beavis [et al.] // *Cancer Immunol. Res.* – 2015. – Vol. 3. – P. 506–517.
40. Immunosuppressive activities of adenosine in cancer / B. Allard [et al.] // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 29. – P. 7–16.
41. Cellular and humoral immunity to different types of human neoplasms / I. Hellstrom [et al.] // *Nature.* – 1968. – Vol. 220. – P. 1352–1354.
42. Lukashev, D. From “Hellstrom Paradox” to anti-adenosinergic cancer immunotherapy / D. Lukashev, M. Sitkovsky, A. Ohta // *Purin. Sign.* – 2007. – Vol. 3. – P. 129–134.
43. Malhotra, V. Classical chemotherapy: mechanisms, toxicities and the therapeutic window / V. Malhotra, M. C. Perry // *Cancer Biol. Ther.* – 2003. – Vol. 2, suppl. 1. – P. S2–S4.
44. Corrie, P. G. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects / P. G. Corrie // *Medicine.* – 2011. – Vol. 39. – P. 717–722.
45. Immune evasion in cancer: mechanistic basis and therapeutic strategies / D. S. Vinay [et al.] // *Semin. Cancer Biol.* – 2015. – Vol. 35, suppl. – P. S185–S198. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.03.004.
46. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human bloodmonocytes / T. Utsugi [et al.] // *Cancer Res.* – 1991. – Vol. 51. – P. 3062–3066.
47. Ran, S. Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels / S. Ran, A. Downes, P. E. Thorpe // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62, N 21. – P. 6132–6140.
48. Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer / R. B. Birge [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2016. – Vol. 23, N 6. – P. 962–978.
49. Zwaal, R. F. Pathophysiological implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells / R. F. Zwaal, A. J. Schroit // *Blood.* – 1997. – Vol. 89. – P. 1121–1132.
50. Regulatory mechanisms of transmembrane phospholipid distributions and pathophysiological implications of transbilayer lipid scrambling / E. M. Bevers [et al.] // *Lupus.* – 1998. – Vol. 7, suppl. 2. – P. 126–131.
51. Variation in human cancer cell external phosphatidylserine is regulated by flippase activity and intracellular calcium / S. D. Vallabhapurapu [et al.] // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6, N 33. – P. 34375–34388.
52. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery / S. Ganta [et al.] // *J. Control. Release.* – 2008. – Vol. 126, N 3. – P. 187–204.
53. In search of new targets – the membrane lipid phosphatidylserine – the underestimated Achilles’ Heel of cancer cells / D. Zweytick [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2011. – Vol. 22, Suppl. 3. – P. 43.
54. Schick, P. K. Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane / P. K. Schick, K. B. Kurica, G. K. Chacko // *J. Clin. Invest.* – 1976. – Vol. 57. – P. 1221–1226.
55. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers / H. A. Andree [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol. 265. – P. 4923–4928.
56. Kraiss, J. J. Purine nucleoside phosphorylase targeted by Annexin V to breast cancer vasculature for enzyme prodrug therapy / J. J. Kraiss, O. De Crescenzo, R. G. Harrison // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8, N 10: e76403.

57. Application of recombinant enzymes for the synthesis of pharmaceutically valuable nucleosides and nucleotides / D. V. Burko [et al.] // *Biotechnology in Medicine, Foodstuffs, Biocatalysis, Environment and Biogeotechnology* / eds: S. D. Varfolomeev, G. E. Zaikov, L. P. Krylova. – New York: Nova Science Publishers, Inc., 2010. – P. 1–13.
58. Enzymatic synthesis of c-di-GMP using inclusion bodies of *Thermotoga maritima* full-length diguanylate cyclase / A. S. Korovashkina [et al.] // *J. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 164, N 2. – P. 276–280.
59. Рымко, А. Н. Создание штамма *Escherichia coli*, продуцирующего дезоксирибонуклеозидкиназу *Drosophila melanogaster* / А. Н. Рымко, С. В. Квач, А. И. Зинченко // *Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2013. – № 2. – С. 87–90.
60. Мишура, А. А. Создание штаммов-продуцентов химерных белков, содержащих в своей структуре хитинсвязывающий домен / А. А. Мишура, А. Н., Рымко, А. И. Зинченко // *Сахаровские чтения 2016 г.: экол. проблемы XXI века: материалы 15-й междунар. науч. конф., Минск, 19–20 мая 2016 г. / МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ.* – С. 85.
61. Квач, С. В. Оптимизация условий экспрессии штамма-суперпродуцента аденозиндезаминазы *Escherichia coli* / С. В. Квач, Л. А. Ерошевская, А. И. Зинченко // *Динамика исследования – 2008: материалы за IV Междунар. науч.-практ. конф., София, 16–31 июля 2008 г.* – Т. 22. – С. 26–29.
62. Ерошевская, Л. А. Получение и использование генно-инженерной аденозиндезаминазы *Escherichia coli* / Л. А. Ерошевская, С. В. Квач, А. И. Зинченко // *Совр. пробл. физиол., экол. и биотехнол. микроорганизмов: материалы Всерос. симп. с междунар. участием. М., МГУ, 24–27 дек. 2009 г.* – С. 61.
63. Синтез пуриновых 3'-α-фторнуклеозидов с использованием пиримидиннуклеозидфосфорилазы *Thermus thermophilus* и пуридиннуклеозидфосфорилазы *Escherichia coli* / А. И. Береснев [и др.] // *Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2013. – № 4. – С. 71–76.

References

- Blay J. (2012) "Adenosine and tumor microenvironment", *Encyclopedia of Cancer*, 3rd ed., Springer, Heidelberg, DE, pp. 49-53.
- Ramakers, B. P., Wever, K. E., Cox, M., van den Broek, P. H., Mbuyi, F., Rongen, G., Masereeuw, R., van der Hoeven, J. G., Smits, P., Riksen, N. P. and Pickkers, P. (2012) "How systemic inflammation modulates adenosine metabolism and adenosine receptor expression in humans *in vivo*", *Critical Care Medicine*, vol. 40, no. 9, pp. 2609-2616.
- Spychala, J. (2000) "Tumor-promoting functions of adenosine", *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 87, no. 2–3, pp. 161-173.
- Volmer, J. B., Thompson, L. F. and Blackburn, M. R. (2006) "Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated adenosine production is tissue protective in a model of bleomycin-induced lung injury", *Journal of Immunology*, vol. 176, pp. 4449-4458.
- Grenz, A., Zhang, H., Weingart, J., von Wietersheim, S., Eckle, T., Schnermann, J., Kohle, C., Kloor, D., Gleiter, C. H., Vallon, V., Eltzschig, H. K. and Osswald, H. (2007) "Lack of effect of extracellular adenosine generation and signaling on renal erythropoietin secretion during hypoxia", *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, vol. 293, pp. 1501-1511.
- Baldwin, S. A., Beal, P. R., Yao, S. Y., King, A. E., Cass, C. E. and Young, J. D. (2004) "The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29", *Pflugers Arch*, vol. 447, no. 5, pp. P. 735-743.
- Busse, M. and Vaupel, P. (1996) "Accumulation of purine catabolites in solid tumors exposed to therapeutic hyperthermia", *Experientia*, vol. 52, no. 5, pp. 469-473.
- Hasko, G. and Cronstein, B. N. (2004) "Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity", *Trends in Immunology*, vol. 25, no. 1, pp. 33-39.
- Ohta, A., Gorelik, E., Prasad, S. J., Ronchese, F., Lukashev, D., Wong, M., Huang, X., Caldwell, S., Liu, K., Smith, P. Chen, J. F., Jackson, E. K., Apasov, S., Abrams, S. and Sitkovsky, M. (2006) "A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, pp. 13132-13137.
- Vaupel, P. and Mayer, A. (2016) "Hypoxia-driven adenosine accumulation: a crucial microenvironmental factor promoting tumor progression", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 876, pp. 177-183.
- Kobayashi, S., Zimmermann, H. and Millhorn, D. E. (2000) "Chronic hypoxia enhances adenosine release in rat PC12 cells by altering adenosine metabolism and membrane transport", *Journal of Neurochemistry*, vol. 74, pp. 621-632.
- Synnestvedt, K., Furuta, G. T., Comerford, K. M., Louis, N., Karhausen, J., Eltzschig, H. K., Hansen, K. R., Thompson, L. F. and Colgan, S. P. (2002) "Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia", *Journal of Clinical Investigation*, vol. 110, pp. 993-1002.
- Decking, U. K., Schlieper, G., Kroll, K. and Schrader, J. (1997) "Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release", *Circulation Research*, vol. 81, pp. 154-164.
- Fredholm, B. B., Izman, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K. N. and Linden, J. (2001) "International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors", *Pharmacological Reviews*, vol. 53, pp. 527-552.
- Linden, J. (2001) "Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 41, pp. 775-787.
- Nowak, M., Lynch, L., Yue, S., Ohta, A., Sitkovsky, M., Balk, S. P. and Exley, M. A. (2010) "The A2aR adenosine receptor controls cytokine production in iNKT cells", *European Journal of Immunology*, vol. 40, no. 3, pp. 682-687.
- Vaupel, P. and Multhoff, G. (2016) "Adenosine can thwart antitumor immune responses elicited by radiotherapy. Therapeutic strategies alleviating protumor ADO activities", *Strahlentherapie und Onkologie*, vol. 192, no. 5, pp. 279-287.
- Ohta, A. (2016) "A metabolic immune checkpoint: adenosine in tumor microenvironment", *Frontiers in Immunology*, Available at: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2016.00109>.
- Hasko, G. and Pacher, P. (2012) "Regulation of macrophage function by adenosine", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 32, pp. 865-869.

20. Morello, S., Pinto, A., Blandizzi, C. and Antonioli, L. (2016) "Myeloid cells in the tumor microenvironment: role of adenosine", *Oncoimmunology*, Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2015.1108515>.
21. Itoh, K., Tilden, A. B. and Balch, C. M. (1986) "Interleukin 2 activation of cytotoxic T-lymphocytes infiltrating into human metastatic melanomas", *Cancer research*, vol. 46, pp. 3011-3017.
22. Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P. and Hasko, G. (2013) "Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine", *Nature Reviews Cancer*, vol. 13, no. 12, pp. 842-857.
23. Thammarongsa, V., Kern, J. W., Missiakas, D. M. and Schneewind, O. (2009) "Staphylococcus aureus synthesizes adenosine to escape host immune responses", *Journal of Experimental Medicine*, vol. 206, pp. 2417-2427.
24. Crane, J. K., Olson, R. A., Jones, H. M. and Duffey, M. E. (2002) "Release of ATP during host cell killing by enteropathogenic *E. coli* and its role as a secretory mediator", *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 283, pp. G74-G86.
25. Tasca, T., Bonan, C. D., Carli, G. A., Battastini, A. M. and Sarkis, J. J. (2003) "Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity in intact cells of *Trichomonas vaginalis*", *Experimental Parasitology*, vol. 105, pp. 167-173.
26. Young, A., Mittal, D., Stagg, J. and Smyth, M. J. (2014) "Targeting cancer-derived adenosine: new therapeutic approaches", *Cancer Discovery*, vol. 4, no. 8, pp. 879-888.
27. Sitkovsky, M. V., Hatfield, S., Abbott, R., Belikoff, B., Lukashev, D. and Ohta, A. (2014) "Hostile, hypoxia-A2-adenosinergic tumor biology as the next barrier to overcome for tumor immunologists", *Cancer Immunology Research*, vol. 2, no. 7, pp. 598-605.
28. Ohta, A. and Sitkovsky, M. (2014) "Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells", *Frontiers in Immunology*, Available at: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00304>.
29. Antonioli, L., Hasko, G., Fornai, M., Colucci, R. and Blandizzi, C. (2014) "Adenosine pathway and cancer: where to go from here?", *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 18, no. 9, pp. 973-977.
30. Hausler, S. F., Del Barrio, I. M., Diessner, J., Stein, R. G., Strohschein, J., Honig, A., Dietl, J. and Wischhusen, J. (2014) "Anti-CD39 and anti-CD73 antibodies A1 and 7G2 improve targeted therapy in ovarian cancer by blocking adenosine-dependent immune evasion", *American Journal of Translational Research*, vol. 6, no. 2, pp. 129-139.
31. Merighi, S., Mirandola, P., Varani, K., Gessi, S., Leung, E., Baraldi, P. G., Tabrizi, M. A. and Borea, P. A. (2003) "A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy", *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 100, no. 1, pp. 31-48.
32. Sitkovsky, M., Lukashev, D., Deaglio, S., Dwyer, K., Robson, S. C. and Ohta, A. (2008) "Adenosine A2A receptor antagonists: blockade of adenosinergic effects and T regulatory cells", *British Journal of Pharmacology*, vol. 153, suppl. 1, pp. S457-S464.
33. Hatfield, S. M., Kjaergaard, J., Lukashev, D., Schreiber, T. H., Belikoff, B., Abbott, R., Sethumadhavan, S., Philbrook, P., Ko, K., Cannici, R., Thayer, M., Rodig, S., Kutok, J. L., Jackson, E. K., Karger, B., Podack, E. R., Ohta, A. and Sitkovsky, M. V. (2015) "Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation", *Science Translational Medicine*, vol. 7, no. 277, Available at: <http://stm.sciencemag.org/content/7/277/277ra30>.
34. Hatfield, S. M. and Sitkovsky, M. (2016) "A2A adenosine receptor antagonists to weaken the hypoxia-HIF-1 α driven immunosuppression and improve immunotherapies of cancer", *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 29, no. 1, pp. 90-96.
35. Hatfield, S. M. and Sitkovsky, M. (2015) "Oxygenation to improve cancer vaccines, adoptive cell transfer and blockade of immunological negative regulators", *Oncoimmunology*, vol. 4, no. 12, Available at: <https://dash.harvard.edu/bitstream/handle/1/25658394/4635883.pdf?sequence=1>.
36. Sheth, S., Brito, R., Mukherjee, D., Rybak, L. P. and Ramkumar, V. (2014) "Adenosine receptors: expression, function and regulation", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 15, no. 2, pp. 2024-2052.
37. Cekic, C. and Linden, J. (2014) "Adenosine A2A receptors intrinsically regulate CD8+ T cells in the tumor microenvironment", *Cancer Research*, vol. 74, pp. 7239-7249.
38. Allard, B., Pommey, S., Smyth, M. J. and Stagg, J. (2013) "Targeting CD73 enhances the anti-tumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs", *Clinical Cancer Research*, vol. 19, pp. 5626-5635.
39. Beavis, P. A., Milenkovski, N., Henderson, M. A., John, L. B., Allard, B., Loi, S., Kershaw, M. H., Stagg, J. and Darcy, P. K. (2015) "Adenosine receptor 2A blockade increases the efficacy of anti-PD-1 through enhanced antitumor T-cell responses", *Cancer Immunology Research*, vol. 3, pp. 506-517.
40. Allard, B., Beavis, P. A., Darcy, P. K. and Stagg, J. (2016) "Immunosuppressive activities of adenosine in cancer", *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 29, pp. 7-16.
41. Hellstrom, I., Hellstrom, K. E., Pierce, G. E. and Yang, J. P. (1968) "Cellular and humoral immunity to different types of human neoplasms", *Nature*, vol. 220, pp. 1352-1354.
42. Lukashev, D., Sitkovsky, M. and Ohta, A. (2007) "From "Hellstrom Paradox" to anti-adenosinergic cancer immunotherapy", *Purinergic Signalling*, vol. 3, pp. 129-134.
43. Malhotra, V. and Perry, M. C. (2003) "Classical chemotherapy: mechanisms, toxicities and the therapeutic window", *Cancer Biology & Therapy*, vol. 2, suppl. 1, pp. S2-S4.
44. Corrie, P. G. (2011) "Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects", *Medicine*, vol. 39, pp. 717-722.
45. Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., Lichter, T., Decker, W. K., Whelan, R. L. and Kumara, H. M. (2015) "Immune evasion in cancer: mechanistic basis and therapeutic strategies", *Seminars in Cancer Biology*, vol. 35, pp. 185-198.
46. Utsugi, T., Schroit, A. J., Connor, J., Bucana, C. D. and Fidler, I. J. (1991) "Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes", *Cancer Research*, 1991, vol. 51, pp. 3062-3066.
47. Ran, S., Downes, A. and Thorpe, P. E. (2002) "Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels", *Cancer Research*, vol. 62, no. 21, pp. 6132-6140.

48. Birge, R. B., Boeltz, S., Kumar, S., Carlson, J., Wanderley, J., Calianese, D., Barcinski, M., Brekken, R. A., Huang, X., Hutchins, J. T. and Freimark, B. (2016) "Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer", *Cell Death Differ*, vol. 23, no. 6, pp. 962-978.
49. Zwaal, R. F. and Schroit, A. J. (1997) "Pathophysiological implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells", *Blood*, vol. 89, pp. 1121-1132.
50. Bevers, E. M., Comfurius, P., Dekkers, D. W., Harmsma, M. and Zwaal, R. F. (1998) "Regulatory mechanisms of transmembrane phospholipid distributions and pathophysiological implications of transbilayer lipid scrambling", *Lupus*, vol. 7, suppl. 2, pp. 126-131.
51. Vallabhapurapu, S. D., Blanco, V. M., Sulaiman, M. K., Vallabhapurapu, S. L., Chu, Z., Franco, R. S. and Qi, X. (2015) "Variation in human cancer cell external phosphatidylserine is regulated by flippase activity and intracellular calcium", *Oncotarget*, vol. 6, no. 33, pp. 34375-34388.
52. Ganta, S., Devalapally, H., Shahiwal, A. and Amiji, M. (2008) "A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery", *Journal of Controlled Release*, vol. 126, no. 3, pp. 187-204.
53. Zweytick, D., Riedl, S., Rinner, B., Asslaber, M., Schaidler, H., Walzer, S., Novak, A. and Lohner, K. (2011) "In search of new targets – the membrane lipid phosphatidylserine – the underestimated Achilles' Heel of cancer cells", *Annals of Oncology*, vol. 22, suppl. 3, p. 43.
54. Schick, P. K., Kurica, K. B. and Chacko, G. K. (1976) "Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane", *Journal of Clinical Investigation*, vol. 57, pp. 1221-1226.
55. Andree, H. A., Reutelingsperger, C. P., Hauptmann, R., Hemker, H. C., Hermens, W. T. and Willems, G. M. (1990) "Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, pp. 4923-4928.
56. Kraus, J. J., De Crescenzo, O. and Harrison, R. G. (2013) "Purine nucleoside phosphorylase targeted by Annexin V to breast cancer vasculature for enzyme prodrug therapy", *Public Library of Science ONE*, vol. 8, no. 10.
57. Burko, D. V., Eroshevskaya, L. A., Kvach, S. V., Shakhbazov, A. V., Kartel, N. A. and Zinchenko, A. I. (2010) "Application of recombinant enzymes for the synthesis of pharmaceutically valuable nucleosides and nucleotides", *Biotechnology in Medicine, Biocatalysis, Environment and Biogeotechnology*, Nova Science Publishers, New York, US, pp. 1-13.
58. Korovashkina, A. S., Rymko, A. N., Kvach, S. V. and Zinchenko, A. I. (2013) "Enzymatic synthesis of c-di-GMP using inclusion bodies of *Thermotoga maritima* full-length diguanylate cyclase", *Journal of Biotechnology*, vol. 164, no. 2, pp. 276-280.
59. Rymko, A. N., Kvach, S. V. and Zinchenko, A. I. (2013) "Creation of *Escherichia coli* strain producing deoxynucleoside kinase of *Drosophila melanogaster*", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the National academy of sciences of Belarus, biological series], no. 2, pp. 87-90.
60. Mishura, A. A., Rymko, A. N. and Zinchenko, A. I. (2016) "Construction of chimeric proteins producing strains containing in their structure chitin-binding domain", *Sakharovskie chteniya 2016 g.: ekologicheskie problemy XXI veka: materialy 15-i mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii, Minsk, 19–20 maya 2016 g., MGEI im. A. D. Sakharova BGU [Proc. 15th Int. Conf. "Sakharov readings 2016: environmental problems of the 21st century"]*, Minsk, 19–20 May 2016, Minsk, BY, p. 85.
61. Kvach, S. V., Eroshevskaya, L. A. and Zinchenko, A. I. (2008) "Optimization of expression conditions of the strain-superproducer of *Escherichia coli* adenosine deaminase", *Dinamika izsledovaniya–2008: materialy za IV Mezhdunar. nauch.-prakt. konf., Sofiya, 16–31 yuli 2008 g. [Proceed. 4th Int. Scientific and Practical Conf. "Dynamics of a Research-2008"]*, Sofia, July 16–31 2008, Sofia, BG, vol. 22, pp. 26–29.
62. Eroshevskaya, L. A., Kvach, S. V. and Zinchenko, A. I. (2009) "Construction and use of genetically engineered *Escherichia coli* adenosine deaminase", *Sovremennye problemy fiziologii, ekologii i biotekhnologii mikroorganizmov: materialy Vserossiiskogo simpoziuma s mezhdunarodnym uchastiem, Moskva, MGU, 24–27 dek. 2009 g.* [Proceedings All-Russian Symposium with the International Participation "Modern problems of physiology, ecology and biotechnology of microorganisms"], Moscow, December 24–27 2009, Moscow, RU, p. 61.
63. Beresnev, A. I., Kvach, S. V., Sivets, G. G. and Zinchenko, A. I. (2013) "Synthesis of purine 3'- α -fluornucleosides with application of *Thermus thermophilus* pyrimidine nucleoside phosphorylase and *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], no. 4, pp. 71-76.

Информация об авторе

Зинченко Анатолий Иванович – д-р биол. наук, проф., зав. лабораторией Института микробиологии НАН Беларуси (ул. акад. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by

Для цитирования

Зинченко, А. И. Аденозин как потенциальная мишень для биотерапии рака / А. И. Зинченко // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2016. – № 4. – С. 118–128.

Information about the author

Zinchenko Anatoli Ivanovich – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by

For citation

Zinchenko A. I. Adenosine as a potential target for cancer biotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 118–128.