

# ВЕСЦІ

## НАЦЫЯНАЛЬнай

### АКАДЭМІі НАВУК БЕЛАРУСІ

---

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК. 2017. № 1

---

# ИЗВЕСТИЯ

## НАЦИОНАЛЬНОЙ

### АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

---

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2017. № 1

---

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.

#### Главный редактор

**Никифоров Михаил Ефимович** (академик-секретарь Отделения биологических наук НАН Беларуси,  
академик, доктор биологических наук)

#### Редакционная коллегия:

**И. Д. Волотовский**, 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. Ламан**, академик, доктор биологических наук,

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

**В. Е. Падутов**, член-корреспондент, 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 РАН, доктор биологических наук, профессор (Российская Федерация),  
**Н. А. Колчанов**, академик РАН, доктор биологических наук, профессор (Российская Федерация),  
**В. В. Кузнецов**, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор (Российская Федерация),  
**В. Олех-Пясэцка**, кандидат биологических наук, профессор (Польша),  
**О. Н. Пугачев**, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук (Российская Федерация),  
**А. И. Рапопорт**, член-корреспондент Академии наук Латвии, доктор биологических наук, профессор (Латвия),  
**И. А. Тихонович**, академик РАН, доктор биологических наук, профессор (Российская Федерация),  
**В. В. Швартау**, член-корреспондент НАН Украины, доктор биологических наук, профессор (Украина)

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

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

---

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.

Серия биологических наук. 2017. № 1

*Выходит на русском, белорусском и английском языках*

---

Редактор *В. Г. Колосовская*  
Компьютерная верстка *Ю. А. Агейчик*

Подписано в печать 19.01.2017. Выход в свет 30.01.2017. Формат 60×84 <sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная.  
Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 100 экз. Заказ 8.  
Цена номера: индивидуальная подписка – 10,34 руб., ведомственная подписка – 25,29 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, 2017

# PROCEEDINGS

## OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

---

BIOLOGICAL SERIES. 2017. N 1

---

The Journal was founded in 1956

Issued four times a year

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

### Editor-in-Chief

**Nikiforov Mikhail Yefimovich**, Academician, D. Sc. (Biol.)

### Editorial Board:

**V. I. Parfyonov**, Academician, D. Sc. (Biol.) (*Associate Editor-in-Chief*),

**I. D. Volotovskii**, Academician, D. Sc. (Biol.) (*Associate Editor-in-Chief*),

**V. G. Kolosovskaya** (*Managing Editor*),

**S. N. Cherenkevich**, Academician, D. Sc. (Biol.),

**A. N. Evtushenkov**, D. Sc. (Biol.),

**L. V. Khotyleva**, Academician, D. Sc. (Biol.),

**A. V. Kilchevsky**, Corresponding Member, D. Sc. (Biol.),

**E. I. Kolomiets**, Corresponding Member, D. Sc. (Biol.),

**N. A. Laman**, Academician, D. Sc. (Biol.),

**A. G. Lobanok**, Academician, D. Sc. (Biol.),

**V. E. Padutov**, Corresponding Member, D. Sc. (Biol.),

**V. N. Reshetnikov**, Academician, D. Sc. (Biol.),

**N. V. Shalygo**, Corresponding Member, D. Sc. (Biol.),

**V. M. Shkumatov**, Corresponding Member, D. Sc. (Biol.),

**V. V. Titok**, Corresponding Member, D. Sc. (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, D. Sc. (Biol.), Professor (Latvia),

**Ya. B. Blume**, Academician of the National Academy of Sciences of Ukraine, D. Sc. (Biol.), Professor (Ukraine),

**Yu. Yu. Dgebuadze**, Academician of the Russian Academy of Sciences, D. Sc. (Biol.), Professor (Russian Federation),

**V. E. Gayduk**, D. Sc. (Biol.), Professor (Republic of Belarus),

**N. A. Kolchanov**, Academician of the Russian Academy of Sciences, D. Sc. (Biol.), Professor (Russian Federation),

**V. V. Kuznetsov**, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, D. Sc. (Biol.), Professor (Russian Federation),

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

*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)*

*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  
Website: vestibiol.belnauka.by*

---

PROCEEDING OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.

Series of Biology. 2017. N 1

*Printed in Russian, Belarusian and English languages*

---

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

It is sent of the press 19.01.2017. Appearance 30.01.2017. Format 60×84 1/8. Offset paper. The press digital.

Printed pages 14,88. Publisher's signatures 16,4. Circulation 100 copies. Order 8.

Number price: individual subscription – 10,34 byn., departmental subscription – 25,29 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, 2017

## ЗМЕСТ

<b>Береснев А. И., Рымко А. Н., Ерошевская Л. А., Квач С. В., Квасюк Е. И., Зинченко А. И.</b> Синтез флуцарабин-5'-монофосфата с использованием бактериальных рекомбинантных ферментов.....	7
<b>Рупасова Ж. А., Павловский Н. Б., Василевская Т. И., Криницкая Н. Б., Тишковская Е. В., Павловская А. Г., Решетников В. Н., Пинчукова Ю. М., Лиштван И. И.</b> Сравнительная оценка биохимического состава плодов новых интродуцированных сортов клюквы крупноплодной ( <i>Oxycoccus macrocarpus</i> (Ait.) Pers.) в условиях Беларуси.....	16
<b>Шляхтёнок А. С.</b> Дорожная оса <i>Amblyellus hasdrubal</i> (Kohl, 1894) (Hymenoptera, Pompilidae) в Беларуси ...	25
<b>Болотник Е. В., Черешнев А. А., Титок М. А., Коломиец Э. И.</b> Получение мутантов <i>Clostridium acetobutylicum</i> SI, устойчивых к бутанолу .....	30
<b>Клементьева Е. А., Овсянникова С. В., Никитин А. Н.</b> Динамика изотопов <sup>210</sup> Pb и <sup>210</sup> Po в естественных луговых экосистемах и агрофитоценозах с регулярным внесением фосфорных удобрений.....	39
<b>Острикова К. В., Голенченко С. Г., Потапович М. И., Прокулевич В. А.</b> Создание штамма-продуцента видоспецифичного интерферона-альфа для разработки противовирусных препаратов для овец .....	48
<b>Савчин Д. В., Кузмицкая П. В., Урбанович О. Ю., Федосеева И. В., Боровский Г. Б.</b> Создание трансгенных растений <i>Nicotiana tabacum</i> с геном <i>ndb2 Arabidopsis thaliana</i> для изучения ответа на стресс.....	54
<b>Межнина О. А., Урбанович О. Ю.</b> Генетическое разнообразие сортов смородины черной ( <i>Ribes nigrum</i> ) в Беларуси.....	62
<b>Бережная А. В., Романовская Т. В., Молчан О. В., Коломиец Э. И.</b> Получение иммобилизованного инокулята <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> БИМ В-439Д для отъемно-доливной ферментации .....	70
<b>Домаш В. И., Иванов О. А., Гордей И. А., Люсиков О. М., Гордей И. С., Шарпио Т. П., Забрейко С. А.</b> Роль гидролитических ферментов в устойчивости злаковых культур к прорастанию зерна в колосе.....	77
<b>Литвинова А. Г., Вежновец В. В., Семенченко В. П.</b> Состояние и прогноз развития популяций представителей рода <i>Eurytemora</i> (Copepoda, Calanoida) в водоемах Беларуси.....	84
<b>Голубкова И. Н.</b> Морфологический анализ пыльцы представителей рода <i>Persica</i> Mill. ....	90
<b>Рябцева Т. В., Седёлкина Е. Л., Макаревич Д. А., Бычко Г. Н., Кирковский В. В., Голубович В. П.</b> Синтез провоспалительных цитокинов и экспрессия молекул адгезии нейтрофилами человека <i>in vitro</i> в ответ на действие активатора на основе клеток <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	95

## АГЛЯДЫ

<b>Волуевич Е. А.</b> Генетика устойчивости рапса ( <i>Brassica napus</i> L.) к фомозу .....	101
<b>Волуевич Е. А.</b> Стратегии управления фомозом рапса ( <i>Brassica napus</i> L.) .....	119

## CONTENTS

<b>Beresnev A. I., Rymko A. N., Eroshevskaya L. A., Kvach S. V., Kvasyuk E. I., Zinchenko A. I.</b> Synthesis of fludarabine 5'-monophosphate using bacterial recombinant enzymes .....	7
<b>Rupasova Zh. A., Pavlovskii N. B., Vasileuskaya T. I., Krinitskaya N. B., Tishkovskaya E. V., Pavlovskaya A. G., Reshetnikov V. N., Pinchukova Y. M., Lishtvan I. I.</b> Comparative estimation of biochemical composition of introduced fruits of <i>Oxycoccus macrocarpus</i> (Ait.) Pers. cultivars under conditions of Belarus .....	16
<b>Shlyakhtenok A. S.</b> The species <i>Amblyellus hasdrubal</i> (Kohl, 1894) (Hymenoptera, Pompilidae) in Belarus .....	25
<b>Bolotnik E. V., Chereshev A. A., Titok M. A., Kolomiets E. I.</b> Selection of butanol-resistant mutants of <i>Clostridium acetobutylicum</i> S1.....	30
<b>Klementjeva E. A., Ovsiannikova S. V., Nikitin A. N.</b> Dynamics of isotopes <sup>210</sup> Pb and <sup>210</sup> Po in natural meadow ecosystems and agrophytocenoses with the regular application of phosphorus fertilizers.....	39
<b>Vostrykava K. V., Golenchenko S. G., Patapovich M. I., Prakulevich U. A.</b> Creation of strain producing species-specific interferon-alpha for development of antiviral preparations for sheeps.....	48
<b>Sauchyn D. V., Kuzmitskaya P. V., Urbanovich O. Yu., Borovskii G. B., Fedoseeva I. V.</b> The creation of transgenic plants <i>Nicotiana tabacum</i> with gene <i>ndb2 Arabidopsis thaliana</i> to study response to stress.....	54
<b>Mezhnina O. A., Urbanovich O. Yu.</b> Genetic variability of blaccurrant varieties ( <i>Ribes nigrum</i> ) in Belarus.....	62
<b>Berezhnaya A. V., Romanovskaya T. V., Molchan O. V., Kolomiets E. I.</b> Creating immobilized inoculum of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> BIM B-439Д for weaning-topping cultivation.....	70
<b>Domash V. I., Ivanov O. A., Gordei I. A., Lyusikov O. M., Gordei I. S., Sharpio T. P., Zabreiko S. A.</b> The role of hydrolytic enzymes in cereal resistance to grain germination in the ear.....	77
<b>Litvinova A. G., Vezhnavets V. V., Semenchenko V. P.</b> State assessment and development forecast of populations of representatives genus <i>Eurytemora</i> (Copepoda, Calanoida) in water reservoirs of Belarus.....	84
<b>Golubkova I. N.</b> Morphological analysis of pollen of the genus <i>Persica</i> Mill. species .....	90
<b>Ryabtseva T. V., Sedelkina E. L., Makarevich D. A., Bychko G. N., Kirkovskiy V. V., Golubovich V. P.</b> Proinflammatory cytokines synthesis and adhesion molecules expression by neutrophils <i>in vitro</i> in response to activator based on <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	95
<b>REVIEWS</b>	
<b>Voluevich E. A.</b> Genetics of rape ( <i>Brassica napus</i> L.) resistance to blackleg.....	101
<b>Voluevich E. A.</b> Blackleg of rape ( <i>Brassica napus</i> L.) management strategies .....	119

ISSN 0002-3558 (print)  
УДК 579.66+577.27

Поступила в редакцию 21.06.2016  
Received 21.06.2016

**А. И. Береснев, А. Н. Рымко, Л. А. Ерошевская, С. В. Квач, Е. И. Квасюк, А. И. Зинченко**

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

### **СИНТЕЗ ФЛУДАРАБИН-5'-МОНОФОСФАТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИАЛЬНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ**

Разработана и экспериментально обоснована схема ферментативного получения флударабин-5'-монофосфата из 2-фтораденина и циклоцитидина как донора арабинозного фрагмента. При этом донором фосфатной группы служил ацетилфосфат. В качестве биокатализаторов применяли цитидиндеаминазу, уридинфосфорилазу, пуридиннуклеозидфосфорилазу и дезоксинуклеозидкиназу, выделенные из клеток ранее сконструированных штаммов *Escherichia coli*. Полученный препарат флударабин-5'-монофосфата планируется использовать в качестве пролекарства в разрабатываемом ферментативном пролекарственном подходе к терапии рака.

*Ключевые слова:* флударабин, флударабин-5'-монофосфат, рекомбинантный штамм, *Escherichia coli*, ферментативный катализ, модифицированный нуклеозид.

**A. I. Beresnev, A. N. Rymko, L. A. Eroshevskaya, S. V. Kvach, E. I. Kvasyuk, A. I. Zinchenko**

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

### **SYNTHESIS OF FLUDARABINE 5'-MONOPHOSPHATE USING BACTERIAL RECOMBINANT ENZYMES**

The scheme of enzymatic preparation of fludarabine-5'-monophosphate from 2-fluoroadenine and cyclocytidine as a donor of arabinose fragment was developed and experimentally proved. Acetylphosphate was used as a donor of phosphate group. Cytidine deaminase, uridine phosphorylase, purine nucleoside phosphorylase and deoxynucleoside kinase recovered from earlier designed strains of *Escherichia coli* were used as biocatalysts. The synthesized fludarabine-5'-monophosphate is planned for using as a pro-drug in enzymatic pro-medicinal approach to therapy of cancer.

*Keywords:* fludarabine, fludarabine 5'-monophosphate, recombinant strain, *Escherichia coli*, enzymatic catalysis, modified nucleoside.

**Введение.** В последние десятилетия наблюдается значительный прогресс в диагностике, хирургии и радиотерапии рака. В то же время применение химиотерапии при многих видах рака нельзя признать удовлетворительным. Основной проблемой при проведении химиотерапии остаются не только высокая токсичность препаратов, но и многочисленные побочные эффекты после их длительного применения. Такую ситуацию принято объяснять отсутствием у данных препаратов адекватной специфичности в отношении раковых клеток. Поэтому поиск более специфичных мишеней, экспрессирующихся в опухолях, до настоящего времени остается одним из приоритетных направлений в онкофармакологии.

В пионерских исследованиях [1, 2] установлено, что на внешней стороне клеток, относящихся к трем разным типам рака, имеется локализация фосфатидилсерина. Позднее, в 2002 г. [3], повышенное содержание анионных фосфолипидов выявлено также на поверхности опухолевых кровеносных сосудов. Наконец, S. Riedl с соавт. [4], расширив число исследуемых типов опухолевых клеток, включая метастазы, отчетливо продемонстрировали, что расположение фосфатидилсерина на внешней стороне бислоя плазматической мембраны представляет собой общий феномен для раковых клеток, а также для клеток, образующих опухолевые сосуды и метастазы.

Таким образом, использование фосфатидилсерина как маркера, дающее возможность различать раковые и нормальные клетки, позволит разработать новый метод лечения онкологических заболеваний, который существенно дополнит, а в перспективе даже заменит стандартную химиотерапию.

Следует отметить, что наличие специфического маркера в составе опухолевой клетки – необходимое, но недостаточное условие для осуществления направленной доставки противоопухо-

левого препарата только в эти клетки-мишени. Кроме «адреса» необходим также и «почтальон» – транспортер, способный доставить препарат в опухоль в интактном виде. В настоящее время известно, что одним из таких транспортеров может выступать плацентарный человеческий белок аннексин А5.

Аннексин А5 – член семейства кальций-зависимых белков, который высокоаффинно связывается преимущественно с фосфатидилсеринем [5, 6]. Такое специфическое их взаимодействие позволяет предположить, что данный белок может быть использован в качестве средства адресной доставки в микроокружение опухолевой клетки различных противоопухолевых соединений (в том числе ферментов), предварительно связанных с аннексином А5 [7].

Одним из перспективных противоопухолевых препаратов нового поколения является флударабин-5'-монофосфат (синонимы: 9-β-D-арабинофуранозил-2-фторадеин-5'-монофосфат, 2-F-ara-AMP). Этот модифицированный нуклеотид, обладающий цитотоксическими свойствами, используется в медицине в качестве лекарственного средства для терапии хронической лимфоцитарной лейкемии [8]. Однако более широкому применению препарата препятствует его токсичность в отношении нормальных клеток организма, приводящая к поражению нервной системы [9].

Известно, что в ряде случаев проблема системной токсичности может быть решена путем локальной активации так называемых пролекарств. Так, в научной литературе описан многообещающий подход к терапии злокачественных новообразований, основанный на введении в опухолевые клетки «генов самоубийства», кодирующих ферменты, которые трансформируют введенные системно пролекарства (инертные или относительно терапевтически инертные химические соединения) в летальные для клетки субстанции [10].

К числу наиболее изученных ферментов, кодируемых «генами самоубийства», следует отнести кодируемую геном *deoD Escherichia coli* пуридиннуклеозидфосфорилазу (ПНФазу), которая способна превращать умеренно токсичное соединение флударабин (синонимы: арабинофуранозил-2-фторадеин, 2-F-ara-A) в губительный для клетки 2-фторадеин (2-F-Ade) [11].

Основной проблемой, препятствующей применению суицидной генотерапии в клинической практике, является низкая эффективность доставки терапевтических генов (в том числе гена ПНФазы) в опухолевые клетки [12].

В 2013 г. был предложен альтернативный описанному выше вариант использования флударабина в качестве пролекарства. В частности, J. J. Krajs и соавт. [13] сконструировали штамм *E. coli*, продуцирующий химерный белок, состоящий из гомологичной ПНФазы и человеческого аннексина А5. Этот белок (обозначенный как ПНФаза-аннексин) обладает способностью специфически связываться с фосфатидилсеринем и эффективно отщеплять от пуриновых нуклеозидов азотистые основания. Предлагаемый авторами ферментативный пролекарственный подход был успешно реализован в эксперименте с культурой клеток рака молочной железы человека, который завершился спустя неделю гибелью 80 % раковых клеток. Использованный авторами подход к ферментной пролекарственной терапии рака с целью превращения пролекарства в его активную форму, которая непосредственно и вызывает ингибирование биосинтеза опухолевых ДНК, РНК и белка, предполагает следующую последовательность развития событий (рис. 1):

1) после введения пациенту химерного белка происходит накопление последнего в опухоли в результате таргетирования аннексином А5 раковых клеток и сосудистой сети опухоли;

2) после введения пациенту безопасной дозы флударабин-5'-монофосфата последний под действием фосфатазы крови тут же трансформируется в флударабин [14];

3) на поверхности опухолевых клеток под действием ПНФазы начинается протекать реакция расщепления флударабина с образованием 2-F-Ade;

4) легко диффундирующая молекула 2-F-Ade входит в клетку и ингибирует синтез белка, РНК и ДНК [11].

Здесь важно подчеркнуть следующее. Во-первых, флударабин не является субстратом человеческой ПНФазы [15], поэтому его конверсии в 2-F-Ade в нормальных тканях не происходит. Во-вторых, токсичность 2-F-Ade в отношении раковых клеток проявляется при концентрации на несколько порядков меньше, чем требуется для аналогичного эффекта при использовании флударабина [16], что допускает системное использование флударабин-5'-монофосфата в дозах,

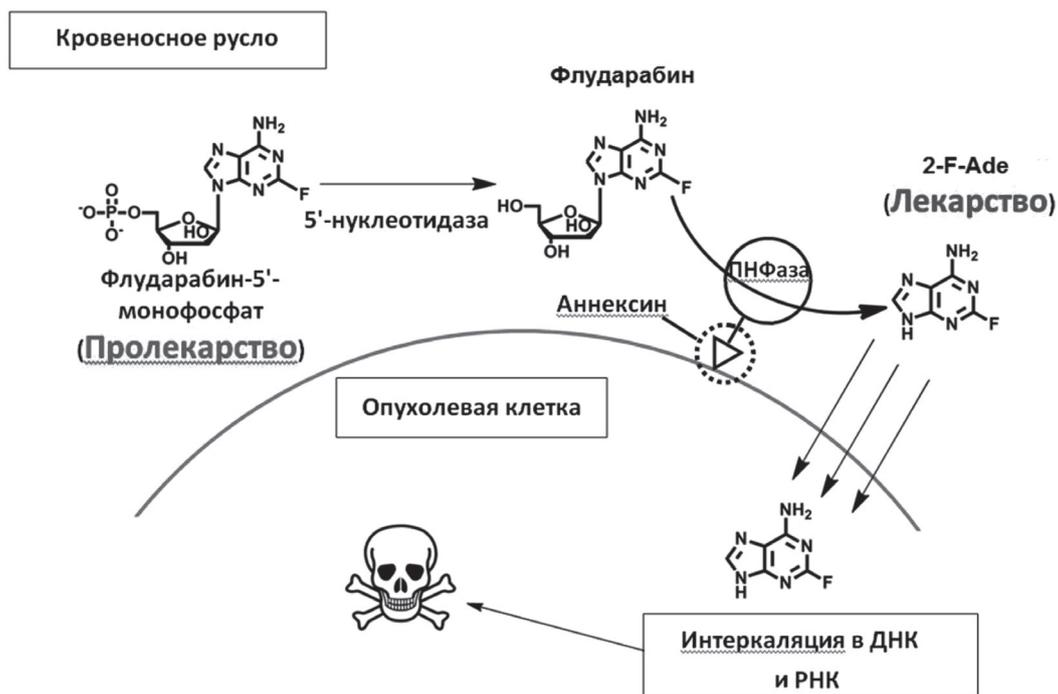


Рис. 1. Схематическое представление ферментной пролекарственной терапии рака

Fig. 1. Schematic presentation of enzymatic prodrug cancer therapy

значительно ниже проблемных уровней. В-третьих, образующийся в результате активации пролекарства 2-F-Ade активен не только против пролиферирующих, но и против неделящихся опухолевых клеток и, таким образом, в отличие от других противоопухолевых агентов, убивает и молчащие (индолентные) опухоли.

Для создания отечественной пролекарственной ферментной технологии, аналогичной описанной выше, необходимо решить проблему доступности пролекарства – флударабин-5'-монофосфата, а также сконструировать штамм-продуцент химерного белка ПНФаза-аннексин А5.

Цель настоящего исследования – экспериментальное обоснование возможности использования отечественных рекомбинантных ферментов для получения флударабин-5'-монофосфата, способного служить пролекарством в разрабатываемом ферментативном пролекарственном подходе к терапии рака.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали ранее полученные в лаборатории молекулярной биотехнологии Института микробиологии НАН Беларуси рекомбинантные ферменты нуклеинового обмена *E. coli*: цитидиндезаминазу (ЦДазу) [17], уридиндифосфорилазу (УРФазу) [18], ПНФазу [19], ацетаткиназу (АцК) [20], а также дезоксиинуклеозидкиназу (дНК) *Drosophila melanogaster* [21].

Для получения 1-(β-D-арабинофуранозил)-цитозина (ага-С) к 1 л охлажденного до 4 °С 0,5 М раствора 2,2'-ангидро-(1-β-D-арабинофуранозил)-цитозина (сусло-С) фирмы Sigma-Aldrich по каплям приливали 525 мл 2 М КОН в течение 5 ч для поддержания уровня pH раствора в диапазоне 10–10,5. Затем смесь осветляли, пропуская ее через бумажный фильтр.

Для синтеза 1-(β-D-арабинофуранозил)-урацила (ага-У) к полученному на предыдущей стадии фильтрату добавляли 2,2 мл 85 %-ного  $H_3PO_4$  и 30 ед/мл ЦДазы. Смесь инкубировали в течение 24 ч при 40 °С, после чего температуру поднимали до 60 °С и продолжали инкубацию в течение 1 ч. По завершении реакции (протекающей с количественным выходом) реакцию смесь упаривали в роторном испарителе (при 60 °С) до момента начала кристаллизации ага-У и оставляли на ночь при 4 °С. Затем образовавшийся осадок отделяли путем фильтрования и высушивали в суховоздушном шкафу при 70 °С. Получали около 92 г (380 ммоль) ага-У с выходом 75 % в расчете на сусло-С.

При проведении ферментативного синтеза флударабина в реакционную смесь объемом 150 мл, состоящую из 0,1 М 2-F-Ade, 0,2 М ага-U, 50 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,0), вносили 50 ед/мл УРФазы и 100 ед/мл ПНФазы, после чего ее инкубировали при 50 °С в течение 72 ч при постоянном помешивании. По окончании реакции к смеси добавляли 150 мл дистиллированной воды, нагревали до 90 °С и оставляли охлаждаться при 4 °С для кристаллизации флударабина. Полученный осадок собирали путем фильтрования и растворяли в 250 мл воды, после чего повторно проводили процедуры кристаллизации и фильтрации с последующей сушкой целевого продукта в термостате при 60 °С. Получали 3,74 г (13,1 ммоль) флударабина с 87 %-ным выходом в расчете на 2-F-Ade. Выход в расчете на введенный в реакцию ага-U составлял 43,5 %.

Для получения флударабин-5'-монофосфата реакционную смесь объемом 100 мл, содержащую 0,1 М флударабин, 0,1 М ацетилфосфат (AcP) фирмы Sigma-Aldrich, 50 мМ Трис-HCl-буфер (рН 8,0), 1 ед/мл АцК и 1 ед/мл дНК, инкубировали в течение 4 ч при 30 °С. После окончания реакции полученный флударабин-5'-монофосфат выделяли с использованием ионообменной хроматографии на смоле Dowex 50×4 (Sigma, США). Элюцию флударабин-5'-монофосфата с сорбента осуществляли дистиллированной водой. Элюат упаривали досуха в роторном испарителе при температуре 50 °С. Получали около 4,24 г (12,3 ммоль) флударабин-5'-монофосфата, что соответствует 82 %-ному выходу в расчете на 2-F-Ade и 40,9 %-ному выходу в расчете на введенный в реакцию ага-U.

Накопление целевых продуктов в ходе биокаталитических синтезов контролировали с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках Silica gel 60F<sub>254</sub> (Merck, Германия). Расположение пятен субстратов и продуктов на хроматографической пластине регистрировали в ультрафиолетовом свете, после чего вещества из пятен элюировали в 10 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,0). Концентрацию продуктов в элюатах определяли с помощью спектрофотометрии, используя известные коэффициенты молярной экстинкции. Спектры поглощения записывали на регистрирующем спектрофотометре UV-1202 фирмы Shimadzu (Япония). ЯМР-анализ проводили на спектрометре Avance-500-DRX (Bruker, Германия). Чистоту синтезированного флударабин-5'-монофосфата анализировали на хроматографе Nexera SR (Shimadzu, Япония), используя ВЭЖХ.

Приведенные в работе экспериментальные данные представляют собой доверительные интервалы среднего арифметического для 95 %-ного уровня вероятности.

**Результаты и их обсуждение.** Общая схема получения флударабин-5'-монофосфата с использованием химических и ферментативных процессов представлена на рис. 2.

На начальном этапе работы проводили химическую трансформацию cyclo-C в ага-C в течение 5–6 ч. Синтезированный на первой стадии ага-C способен выступать в качестве субстрата для ЦДазы, которая осуществляет замещение NH<sub>2</sub>-группы в четвертом положении азотистого гетероцикла на кетогруппу с образованием ага-U – донора углеводного компонента в реакциях трансгликозилирования под действием нуклеозидфосфорилаз. Процесс дезаминирования ага-C является необратимым, что обусловлено образованием в ходе протекания реакции газообразного аммиака, который самопроизвольно удаляется из реакционной смеси ввиду его высокой летучести, сдвигая тем самым равновесие реакции в сторону образования целевого продукта. Таким образом, конечный выход ага-U в расчете на внесенный в реакционную среду ага-C оказался близок к 100 %.

Основным этапом предложенной нами схемы получения флударабин-5'-монофосфата является стадия ферментативного трансгликозилирования, которая заключается в фосфоролитическом расщеплении под действием УРФазы ага-U с образованием арабинозо-1-фосфата, который в присутствии ПНФазы переносится на молекулу 2-F-Ade с образованием флударабина. На рис. 3 представлена зависимость накопления флударабина от времени протекания реакции.

Как следует из рис. 3, синтез целевого продукта длится около 80 ч, что связано с крайне низкой растворимостью исходного субстрата – 2-F-Ade. Выход флударабина по окончании реакции в расчете на внесенный 2-F-Ade составляет 96–98 %. Такой высокий выход продукта обратимой реакции обуславливается повышенной стабильностью 9-1'-гликозидной связи ввиду наличия атома фтора во втором положении азотистого гетероцикла и арабино-конфигурации углеводного компонента [22]. Данные особенности молекулы целевого продукта должны значительно замед-

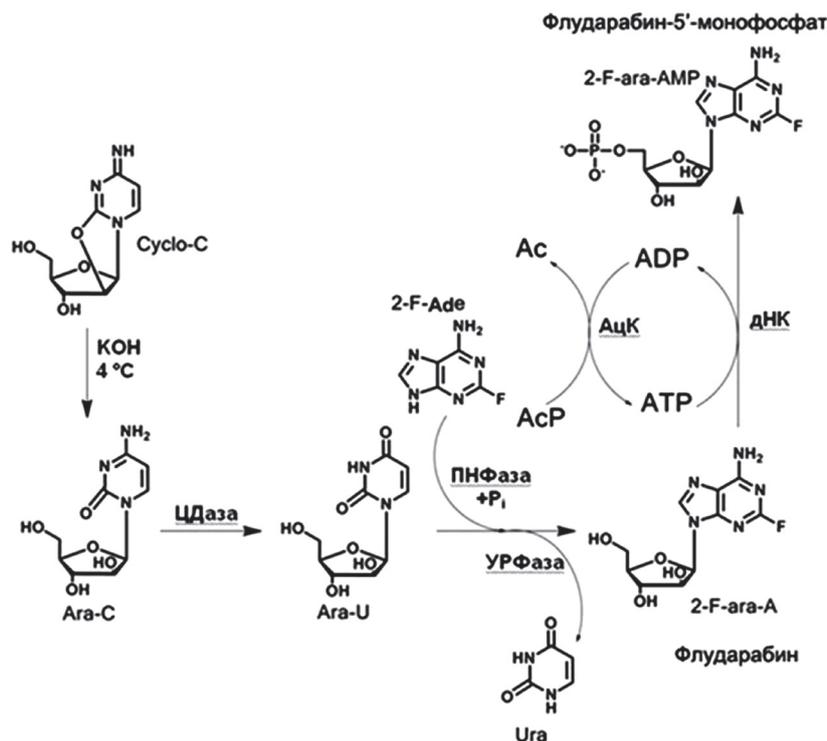


Рис. 2. Схема синтеза флударабин-5'-монофосфата с использованием бактериальных рекомбинантных ферментов  
 Fig. 2. Scheme of synthesis of fludarabine-5'-monophosphate using bacterial recombinant enzymes

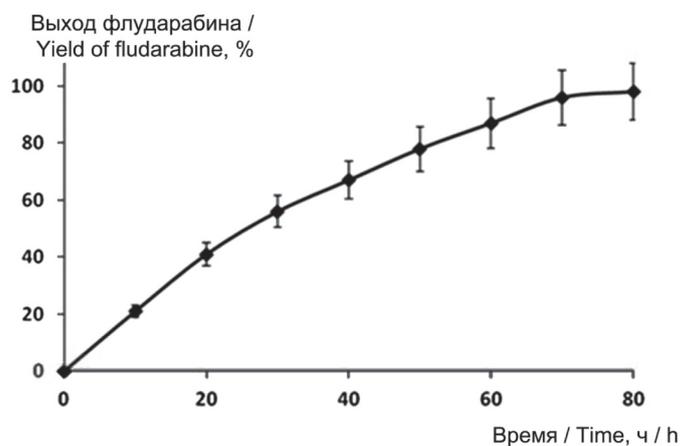


Рис. 3. Динамика накопления флударабина в реакционной смеси  
 Fig. 3. Dynamics of fludarabine accumulation in reaction mixture

лять обратный процесс ее фосфолиза. Кроме того, образующийся в процессе синтеза флударабин обладает низкой растворимостью и в ходе реакции выпадает в осадок, что дополнительно приводит к смещению равновесия реакции в сторону образования целевого продукта.

Образовавшийся осадок флударабина собирали путем фильтрования и подвергали 5'-монофосфорилированию с помощью дНК *D. melanogaster*. В качестве источника фосфатной группы использовали АТФ, который в ходе реакции превращался в АДФ.

В связи с тем, что АТФ является сравнительно дорогостоящим соединением и его использование в препаративном синтезе дезоксирибонуклеотидов экономически нецелесообразно [20], возникла необходимость введения дополнительной ферментативной системы регенерации АТФ. Примененная нами система основана на использовании АцК и сравнительно доступного донора фосфатной группы – АсР.

Из рис. 4 видно, что предложенный в настоящем исследовании метод 5'-монофосфорилирования флударабина с помощью рекомбинантной киназы позволяет достигать более 99 % выхода целевого продукта в ходе 4-часовой реакции. Относительные затраты донора фосфатной (АсР) группы при этом составляют около 110 %.

Чистоту полученного после хроматографической очистки флударабин-5'-монофосфата контролировали с использованием обращенно-фазной ВЭЖХ (рис. 5). Как видно из данных хроматограммы, синтезированный целевой продукт после очистки имеет степень чистоты более 99 %.

Следует отметить, что в литературе описано несколько способов химического получения флударабин-5'-монофосфата. Все они включают трудновыполнимые технологические стадии с использованием токсичных фосфорилирующих агентов и органических растворителей.

Наиболее близким к предложенному нами по эффективности является химико-ферментативный способ получения флударабин-5'-монофосфата [23], предусматривающий:

реакцию 2-F-Ade с Ara-U в присутствии целых клеток *Enterobacter aerogenes* в течение 24–26 ч при 50–70 °С;

обработку образовавшегося продукта уксусным ангидридом (90–100 °С, 10–12 ч) с получением 2',3',5'-три-О-ацетилфлударабина;

гидролиз интермедиата (метанол с аммиаком, 20 ч) с получением после кристаллизации флударабина с выходом 23,1 % в расчете на 2-F-Ade;

5'-фосфорилирование флударабина смесью  $\text{POCl}_3$  и триэтилфосфата (–10 °С, 24 ч) с получением после кристаллизации флударабин-5'-монофосфата с выходом 14,1 % в расчете на введенный в реакцию 2-F-Ade.

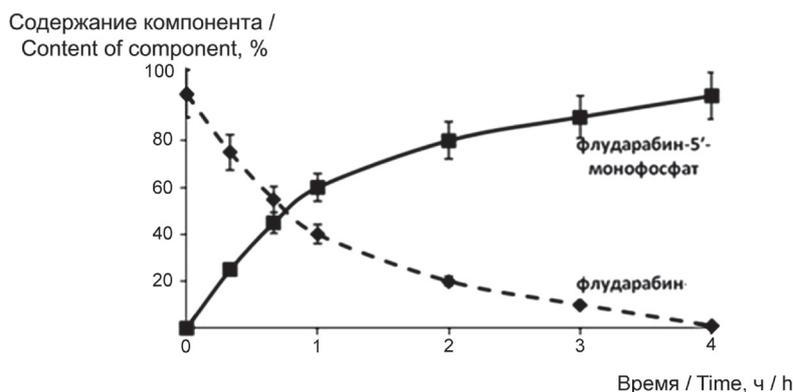


Рис. 4. Динамика убывания флударабина и накопления флударабин-5'-монофосфата в реакционной смеси

Fig. 4. Dynamics of fludarabine-5'-monophosphate decreasing in reaction mixture

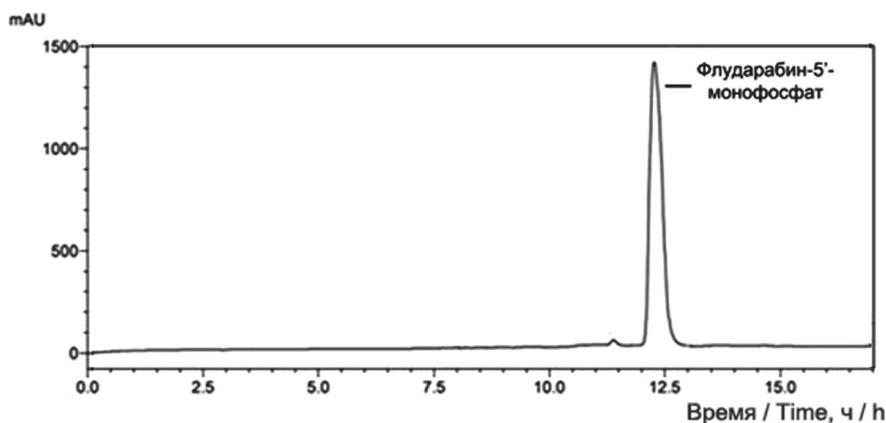


Рис. 5. Хроматограмма флударабин-5'-монофосфата, полученная с помощью ВЭЖХ

Fig. 5. HPLC chromatogram of fludarabine-5'-monophosphate

Недостатками этого способа являются низкий выход целевого продукта, а также использование экологически небезопасных реагентов и растворителей, таких как ацетон, метанол, метилхлорид, хлорокись фосфора и триэтилфосфат. Предложенный в настоящем исследовании метод превосходит описанный аналог по выходу целевого продукта в расчете на затраченный 2-F-Ade (80–82 % вместо 14,1 %), осуществляется в мягких экспериментальных условиях и без применения токсичных реагентов и органических растворителей.

**Заключение.** Впервые экспериментально обоснована схема ферментативного получения флу-дарабин-5'-монофосфата из 2-F-Ade, суcло-С как донора арабинозного фрагмента и АсР в качестве донора фосфатной группы. В разрабатываемом нами подходе к терапии рака, предусматривающем ферментативную трансформацию его в ткани-мишени в противоопухолевый 2-F-Ade, полученный препарат планируется использовать в качестве пролекарства.

### Список использованных источников

1. Differentiation-dependent expression of phosphatidylserine in mammalian plasma membranes quantitative assessment of outer-leaflet lipid by prothrombinase complex formation / J. Connor [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – Vol. 86. – P. 3184–3188.
2. 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.
3. 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. – P. 6132–6140.
4. In search of a novel target – Phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy / S. Riedl [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – Vol. 1808. – P. 2638–2645.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Boogaerts, M. A. Oral fludarabine therapy in chronic lymphocytic leukemia-increased convenience / M. A. Boogaerts // Hematol. J. – 2004. – Vol. 5, suppl. 1. – P. S31–S37.
9. Ocular toxicity of fludarabine: a purine analog / X. Ding [et al.] // Expert Rev. Ophthalmol. – 2008. – Vol. 3. – P. 97–109.
10. Portsmouth, D. Suicide genes for cancer therapy / D. Portsmouth, J. Hlavaty, M. Renner // Mol. Asp. Med. – 2007. – Vol. 28. – P. 4–41.
11. In vivo gene therapy of cancer with *E. coli* purine nucleoside phosphorylase / W. B. Parker [et al.] // Hum. Gene Ther. – 1997. – Vol. 8. – P. 1637–1644.
12. Karjoo, Z. Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy / Z. Karjoo, X. Chen, A. Hatefi // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2016. – Vol. 99 (pt A). – P. 113–128.
13. 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. – e76403.
14. Old and new insights into the mechanisms of action of two nucleoside analogs active in lymphoid malignancies: fludarabine and cladribine (review) / E. Van den Neste [et al.] // Int. J. Oncol. – 2005. – Vol. 27. – P. 1113–1124.
15. Expression, purification, and characterization of recombinant purine nucleoside phosphorylase from *Escherichia coli* / J. Lee [et al.] // Protein Expr. Purif. – 2001. – Vol. 22. – P. 180–188.
16. Montgomery, J. A. Nucleosides of 2-fluoroadenine / J. A. Montgomery, K. Hewson // J. Med. Chem. – 1969. – Vol. 12. – P. 498–504.
17. Береснев, А. И. Биотехнологический синтез модифицированных нуклеозидов с использованием рекомбинантных ферментов нуклеинового обмена *Thermus thermophilus* и *Escherichia coli*: автореф. ... дис. канд. биол. наук: 03.01.06 / А. И. Береснев; Ин-т микробиол. Нац. акад. наук Беларуси. – Минск, 2015. – 23 с.
18. Штамм бактерий *Escherichia coli*, продуцирующий уридинфосфорилазу: пат. 15563 Респ. Беларусь, МПК7 C12N1/21 / С. В. Квач, Л. А. Ерошевская, А. И. Зинченко, А. В. Шахбазов, Н. А. Картель; заявитель ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси». – № a20100585; заявл. 19.04.2010; опубл. 28.02.2012 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2012. – № 1. – С. 116
19. Штамм бактерий *Escherichia coli* – продуцент пуриннуклеозидфосфорилазы: пат. 13127 Респ. Беларусь, МПК7 C12N1/21 / С. В. Квач, Л. А. Ерошевская, А. И. Зинченко, А. В. Шахбазов, Н. А. Картель; заявитель ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси». – № a20080951; заявл. 17.07.2008; опубл. 30.04.2010 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2010. – № 2. – С. 103.
20. Рымко, А. Н. Разработка биотехнологического способа получения 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов: автореф. ... дис. канд. биол. наук: 03.01.06 / А. Н. Рымко; Ин-т микробиол. Нац. акад. наук Беларуси. – Минск, 2014. – 22 с.

21. Штамм бактерий *Escherichia coli*, продуцирующий дезоксирибонуклеозидкиназу *Drosophila melanogaster*: пат. 19750 Респ. Беларусь, МПК7 C12N1/21 / А. Н. Рымко, С. В. Квач, А. И. Зинченко; заявитель ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси». – № а20121660; заявл. 30.11.2012; опубл. 30.12.2015 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2015. – № 6. – С. 61
22. Dolbier, W. R. Fluorine chemistry at the millennium / W. R. Dolbier // *J. Fluor. Chem.* – 2005. – Vol. 126. – P. 157–163.
23. A process for the preparation of fludarabine phosphate from 2-fluoroadenine: pat. 1464708 EP, C12P 19/32 / P. Farina, L. Petrucciani, P. Colombo, G. Caprioli. – N 03007679.8; appl. 03.04.2003; publ. 06.10.2004.

## References

- Connor, J., Bucana, C., Fidler, I. J. and Schroit, A. J. (1989), “Differentiation-dependent expression of phosphatidylserine in mammalian plasma membranes: quantitative assessment of outer-leaflet lipid by prothrombinase complex formation”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 86, pp. 3184–3188.
- 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 bloodmonocytes”, *Cancer Research*, vol. 51, pp. 3062–3066.
- 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, pp. 6132–6140.
- Riedl, S., Rinner, B., Asslaber, M., Schaidler, H., Walzer, S., Novak, A., Lohner, K. and Zwegtlick, D. (2011), “In search of a novel target – Phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy”, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1808, pp. 2638–2645.
- 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.
- 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.
- Riedl, S., Rinner, B., Asslaber, M., Schaidler, H., Walzer, S., Novak, A., Lohner, K. and Zwegtlick, D. (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.
- Boogaerts, M. A. (2004) “Oral fludarabine therapy in chronic lymphocytic leukemia-increased convenience”, *Hematology journal*, vol. 5, suppl. 1, pp. 31–37.
- Ding, X., Herzlich, A. A., Bishop, R., Tuo, J. and Chan, C. C. (2008), “Ocular toxicity of fludarabine: a purine analog”, *Expert Review of Ophthalmology*, vol. 3, pp. 97–109.
- Portsmouth, D., Hlavaty, J. and Renner, M. (1997), “Suicide genes for cancer therapy”, *Human Gene Therapy*, vol. 8, pp. 1637–1644.
- Parker, W. B., King, S. A., Allan, P. W., Bennett, L. L. Jr., Secrist, J. A., Montgomery, J. A., Gilbert, K. S., Waud, W. R., Wells, A. H., Gillespie, G. Y. and Sorscher, E. J. (1997), “*In vivo* gene therapy of cancer with *E. coli* purine nucleoside phosphorylase”, *Human Gene Therapy*, vol. 8, pp. 1637–1644.
- Karjoo, Z., Chen, X. and Hatefi, A. (2016), “Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 99 (pt A), pp. 113–128.
- Krais, 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”, *PLoS ONE*, vol. 8, e76403.
- Van den Neste, E., Cardoen, S., Offner, F., Bontemps, F. (2005), “Old and new insights into the mechanisms of action of two nucleoside analogs active in lymphoid malignancies: fludarabine and cladribine (review)”, *International Journal of Oncology*, vol. 27, pp. 1113–1124.
- Lee, J., Filosa, S., Bonvin, J., Guyon, S., Aponte, R. A. and Turnbull, J. L. (2001), “Expression, purification, and characterization of recombinant purine nucleoside phosphorylase from *Escherichia coli*”, *Protein Expression and Purification*, vol. 22, pp. 180–188.
- Montgomery, J. A. and Hewson, K. (1969), “Nucleosides of 2-fluoroadenine”, *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 12, pp. 498–504.
- Beresnev, A. I. (2015) “Biotechnological synthesis of modified nucleosides using recombinant enzymes of nucleic acid metabolism of *Thermus thermophilus* and *Escherichia coli*”, Abstract of Ph. D. dissertation, Biotechnology, Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, BY.
- Kvach S. V., Eroshevskaya, L. A., Zinchenko, A. I., Shakhbazov, A. V. and Kartel’, N. A., Institut mikrobiologii Natsional’noi akademii nauk Belarusi, Institut genetiki i tsitologii Natsional’noi akademii nauk Belarusi (2012), *Shtamm bakterii Escherichia coli, produtsiruyushchii uridinforilazu* [Bacterial strain of *Escherichia coli* producing uridine phosphorylase], BY, Pat. 15563.
- Kvach, S. V., Eroshevskaya, L. A., Zinchenko, A. I., Shakhbazov, A. V. and Kartel’, N. A., Institut mikrobiologii Natsional’noi akademii nauk Belarusi, Institut genetiki i tsitologii Natsional’noi akademii nauk Belarusi (2010), *Shtamm bakterii Escherichia coli – produtsent purinnukleozidfosforilazy* [Bacterial strain of *Escherichia coli* producing purine nucleoside phosphorylase], BY, Pat. 13127.
- Rymko, A. N. (2014), “Development of biotechnological approach for producing of 2'-deoxynucleoside-5'-triphosphates”, Abstract of Ph. D. dissertation, Biotechnology, Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, BY.

21. Rymko A. N., Kvach, S. N. and Zinchenko, A. I., Institut mikrobiologii Natsional'noi akademii nauk Belarusi (2015), *Shtamm bakterii Escherichia coli, produtsiruyushchii dezoksinukleozidkinazu Drosophila melanogaster* [Bacterial strain of *Escherichia coli* producing deoxy nucleoside kinase], BY, Pat. 19750.
22. Dolbier, W. R. (2005), "Fluorine chemistry at the millennium", *Journal of Fluorine Chemistry*, vol. 126, pp. 157–163.
23. Farina, P., Petrucciani, L., Colombo, P., Caprioli, G., Pro. Bio. Sint. S.p.A. (2004), *A process for the preparation of fludarabine phosphate from 2-fluoroadenine*, IT, Pat. EP1464708.

### Информация об авторах

Береснев Андрей Игоревич – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrey\_beresnev@mbio.bas-net.by

Рымко Александр Николаевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ingecate@mail.ru

Ерошевская Людмила Анатольевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ljarosha@yandex.com

Квач Сергей Вячеславович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Sergkvach@mbio.bas-net.by

Квасюк Евгений Иванович – д-р хим. наук, профессор. Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ (ул. Долгобродская, 23, 220009, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ekvasyuk@inbox.ru

Зинченко Анатолий Иванович – чл.-кор., д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zinch@mbio.bas-net.be

### Для цитирования

Синтез флударабин-5'-монофосфата с использованием бактериальных рекомбинантных ферментов / А. И. Береснев [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2017. – № 1. – С. 7–15.

### Information about the authors

*Beresnev Andrey* – Ph. D. (Biol.), Senior scientific researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrey\_beresnev@mbio.bas-net.by

*Rymko Alexander* – Ph. D. (Biol.), Senior scientific researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ingecate@mail.ru

*Jeroshevskaya Ludmila* – Ph. D. (Biol.), Lead scientific researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ljarosha@yandex.com

*Kvach Sergey* – Ph. D. (Biol.), Lead scientific researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Sergkvach@mbio.bas-net.by

*Kvasyuk Evgeniy* – D. Sc. (Chem.), Professor. International State Ecological Institute named after A. D. Sakharov of the Belarusian State University (23, Dolgobrodskaya Str., 220009, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ekvasyuk@inbox.ru

*Zinchenko Anatoliy* – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by

### For citation

Beresnev, A. I., Rymko, A. N., Eroshevskaya, L. A., Kvach, S. V., Kvasyuk, E. I. and Zinchenko, A. I. (2017), "Synthesis of fludarabine 5'-monophosphate using bacterial recombinant enzymes", *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, no. 1, pp. 7–15.

**Ж. А. Рупасова, Н. Б. Павловский, Т. И. Василевская, Н. Б. Криницкая, Е. В. Тишковская,  
А. Г. Павловская, В. Н. Решетников, Ю. М. Пинчукова, И. И. Лиштван**

*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

### **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ПЛОДОВ НОВЫХ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ СОРТОВ КЛЮКВЫ КРУПНОПЛОДНОЙ (*OXYCOCCUS MACROCARPUS* (AIT.) PERS.) В УСЛОВИЯХ БЕЛАРУСИ**

Приведены результаты сравнительного исследования показателя сахарокислотного индекса, содержания свободных органических, аскорбиновой и гидроксикоричных кислот, сухих, дубильных и пектиновых веществ, растворимых сахаров и основных групп биофлавоноидов в плодах 6 новых интродуцированных в Беларуси сортов *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers. – *Stevens(st)*, *Bain Favorit*, *Hiliston*, *Holistar Red*, *Stankovich*, *WSU 108*. Установлено, что наиболее высоким интегральным уровнем питательной и витаминной ценности плодов по совокупности анализируемых признаков, превосходящим таковой у остальных сортов в 1,8–11 раз, характеризуется сорт *Holistar Red*, тогда как наименьшим – сорта *WSU 108* и особенно *Bain Favorit*.

*Ключевые слова:* клюква крупноплодная, сорта, плоды, биохимический состав, органические кислоты, углеводы, биофлавоноиды.

**Zh. A. Rupasova, N. B. Pavlovskii, T. I. Vasileuskaya, N. B. Krinitskaya, E. V. Tishkovskaya,  
A. G. Pavlovskaya, V. N. Reshetnikov, Y. M. Pinchukova, I. I. Lishtvan**

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

### **COMPARATIVE ESTIMATION OF BIOCHEMICAL COMPOSITION OF NEW INTRODUCED FRUITS OF *OXYCOCCUS MACROCARPUS* (AIT.) PERS. CULTIVARS UNDER CONDITIONS OF BELARUS**

The results of a comparative study of the sugar acid ratio, the content of free organic, ascorbic acid and hydroxycinnamic acids, solids content, pectin and tannins, soluble sugars and major groups bioflavonoids in the fruit of 6 new cultivars of *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers. – *Stevens(st)*, *Bain Favorit*, *Hiliston*, *Holistar Red*, *Stankovich*, *WSU 108* introduced in Belarus. It was found that the highest level of integrated nutritional and vitamin value of fruits of analyzed attributes on jointly. The cultivar *Holistar Red* is superior to that of the other varieties in 1.8–11 times, while the lowest is *WSU 108* and especially *Bain Favorit*.

*Keywords:* *Oxycoccus macrocarpus*, cultivars, fruits, biochemical composition, organic acid, carbohydrates, biophlavonoids.

**Введение.** В настоящее время данные о биохимическом составе плодов клюквы крупноплодной (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers.) достаточно широко представлены в мировой научной литературе [1–7]. За 45-летний период интродукционных исследований сотрудниками Центрального ботанического сада НАН Беларуси также накоплен значительный объем научной информации по этому вопросу, на что указывают многочисленные публикации, в том числе несколько крупных монографий [8–14].

В последние годы коллекционный фонд Ботанического сада пополнился новыми сортами клюквы крупноплодной. По результатам комплексной оценки не только растениеводческих и биопродукционных параметров, но также питательной и витаминной ценности плодов этих сортов впервые проведен сравнительный мониторинг содержания в них наиболее ценных в физиологическом плане соединений для определения наиболее перспективных среди них для районирования и селекции.

Цель работы – выявить сорта клюквы крупноплодной с наиболее высоким уровнем питательной и витаминной ценности плодов.

**Объекты и методы исследований.** Исследования выполнены в 2015–2016 гг. на научно-экспериментальной базе ЦБС НАН Беларуси (Ганцевичский р-н Брестской обл.), находящейся на территории центральной агроклиматической зоны Беларуси, где распространены легкие песчаные дерново-подзолистые почвы и осушенные верховые торфяники. Погодные условия в годы наблюдений характеризовались повышенным температурным фоном и относительно благоприятным режимом выпадения атмосферных осадков в течение сезона.

В качестве объектов исследований были выбраны плоды 6 сортов *Oxycoccus macrocarpus* – *Stevens(st)*, *Bain Favorit*, *Hiliston*, *Holistar Red*, *Stankovich*, *WSU 108*.

Сравнительную оценку биохимического состава их плодов осуществляли по широкому спектру показателей, относящихся к разным классам действующих веществ. В свежих усредненных пробах зрелых плодов определяли содержание: сухих веществ – по ГОСТ 28561-90 [15]; аскорбиновой кислоты (витамина С) – стандартным индофенольным методом [16]; титруемых кислот (общей кислотности) – объемным методом [16]. В высушенных при температуре 60 °С пробах растительного материала определяли содержание: гидроксикоричных кислот (в пересчете на хлорогеновую) – спектрофотометрическим методом [17]; растворимых сахаров – ускоренным полумикрометодом [18]; пектиновых веществ – кальциево-пектатным методом [16]; суммы антоциановых пигментов – по методу Т. Swain, W. E. Hillis [19] (с построением градуировочной кривой по кристаллическому цианидину, полученному из плодов аронии черноплодной и очищенному по методике Ю. Г. Скориковой и Э. А. Шафтан [20]); собственно антоцианов и суммы катехинов (с использованием ванилинового реактива) – фотоэлектроколориметрическим методом [21, 16]; суммы флавонолов (в пересчете на рутин) – спектрофотометрическим методом [16]; дубильных веществ – титрометрическим методом Левентала [22]. Все аналитические определения выполнены в 3-кратной биологической повторности. Данные статистически обработаны с использованием программы Excel.

Выявление сортов клюквы крупноплодной с наиболее высоким интегральным уровнем питательной и витаминной ценности плодов по совокупности анализируемых признаков осуществляли на основе запатентованного способа ранжирования растений [23].

**Результаты и их обсуждение.** При проведении биохимического скрининга новых сортов *Oxycoccus macrocarpus* в качестве эталона сравнения был принят районированный в Беларуси позднеспелый сорт *Stevens*.

По нашим данным, содержание сухих веществ в плодах исследуемых сортов клюквы крупноплодной составляло 12,0–15,7 % (табл. 1). Содержание в их сухой массе свободных органических кислот варьировалось в диапазоне от 17,2 до 25,3 %, аскорбиновой кислоты – от 345,5 до 568,2 мг%, гидроксикоричных кислот – от 549,8 до 710,8 мг%, что было вполне сопоставимо с результатами, полученными нами ранее для других сортов данного вида вересковых [13].

Т а б л и ц а 1. Содержание сухих веществ и органических кислот (в сухой массе) в плодах интродуцированных сортов *Oxycoccus macrocarpus*

Table 1. The content of solids and organic acids (dry weight) in fruits introduced varieties *Oxycoccus macrocarpus*

Сорт	Сухие вещества, %		Титруемые кислоты, %		Аскорбиновая кислота, мг %		Гидроксикоричные кислоты, мг%	
	X ± st	t <sub>cr</sub>	X ± st	t <sub>cr</sub>	X ± st	t <sub>cr</sub>	X ± st	t <sub>cr</sub>
<i>Stevens(st)</i>	14,0 ± 0,2		22,5 ± 0,1		370,5 ± 6,9		651,0 ± 12,2	
<i>Bain Favorit</i>	12,7 ± 0,3	-4,0*	24,4 ± 0,1	34,9*	476,2 ± 3,9	13,3*	589,0 ± 14,1	-3,3*
<i>Hiliston</i>	15,7 ± 0,1	9,2*	17,2 ± 0,1	-76,6*	345,5 ± 6,3	-2,8*	667,2 ± 13,9	0,9
<i>Holistar Red</i>	13,3 ± 0,1	-4,0*	22,4 ± 0,1	-0,3	426,1 ± 4,8	6,6*	710,8 ± 25,5	2,8*
<i>Stankovich</i>	12,0 ± 0,1	-9,5*	25,2 ± 0,1	46,3*	568,2 ± 2,8	26,6*	549,8 ± 14,0	-5,4*
<i>WSU 108</i>	13,0 ± 0,1	-5,8*	25,3 ± 0,1	35,9*	445,1 ± 2,5	10,2*	563,7 ± 13,9	-4,7*

П р и м е ч а н и е. В табл. 1–3 \* – статистически значимые по t-критерию Стьюдента различия с эталонным (стандартным) сортом при p < 0,05.

Общее содержание растворимых сахаров в плодах исследуемых сортов клюквы изменялось в сравнительно узком диапазоне весьма низких значений – от 26,5 до 31,5 % сухой массы (табл. 2). При этом из-за высокого содержания титруемых кислот плоды характеризовались крайне низкими показателями сахарокислотного индекса, не превышавшими 1,1–1,7, что свидетельствовало об их чрезвычайно кислом вкусе. У плодов клюквы были довольно высокие, сопоставимые с установленными нами ранее для голубики высокорослой и брусники обыкновенной [13], показатели накопления пектиновых веществ, варьировавшиеся в сортовом ряду в интервале от 5,2 до 10,0 % сухой массы (табл. 2).

Таблица 2. Содержание растворимых сахаров и пектиновых веществ в сухой массе плодов интродуцированных сортов *Oxycoccus macrocarpus*Table 2. The content of soluble sugars and pectin in the fruit dry weight introduced varieties *Oxycoccus macrocarpus*

Сорт	Растворимые сахара		Сахарокислотный индекс		Пектиновые вещества	
	X ± st	t <sub>cr</sub>	X ± st	t <sub>cr</sub>	X ± st	t <sub>cr</sub>
<i>Stevens(st)</i>	26,5 ± 0,1		1,2 ± 0,1		10,0 ± 0,1	
<i>Bain Favorit</i>	26,5 ± 0,1	0	1,1 ± 0,1	-7,6*	9,4 ± 0,1	-5,2*
<i>Hiliston</i>	29,7 ± 0,3	9,5*	1,7 ± 0,1	26,7*	8,1 ± 0,1	-14,0*
<i>Holistar Red</i>	29,3 ± 0,3	8,5*	1,3 ± 0,1	6,9*	7,6 ± 0,1	-20,8*
<i>Stankovich</i>	31,5 ± 0,5	10,0*	1,3 ± 0,1	3,4*	5,2 ± 0,1	-39,7*
<i>WSU 108</i>	28,5 ± 0,5	4,0*	1,1 ± 0,1	-3,2*	6,8 ± 0,1	-27,7*

Известно, что плоды *Oxycoccus macrocarpus* чрезвычайно богаты биофлавоноидами, обладающими выраженным Р-витаминным действием [24]. По нашим данным, их общее количество в сухой массе плодов исследуемых сортов варьировалось в диапазоне от 7461,0 до 11032,2 мг/100 г (табл. 3). Доминирующее положение в комплексе биофлавоноидов, как и у всех представителей сем. Ericaceae, принадлежало антоциановым пигментам, суммарное содержание которых составляло 5581,3–8463,0 мг/100 г и на долю которых приходилось 74–77 %. Преобладающей фракцией данных соединений, в отличие от растений рода *Vaccinium* [3], являлись лейкоантоцианы, содержание которых, составлявшее в плодах исследуемых сортов клюквы 3878,0–5908,0 мг/100 г, превосходило таковое собственно антоцианов (1703,3–2555,0 мг/100 г) в 2,3–3,2 раза. Различия у сортов *Bain Favorit*, *Holistar Red* и *WSU 108* были наименьшими, у сорта *Hiliston* – наибольшими. Содержание катехинов в сухой массе плодов клюквы крупноплодной варьировалось в сортовом ряду в диапазоне от 1016,2 до 1827,6 мг/100 г, при этом долевое участие этих восстановленных соединений в составе биофлавоноидного комплекса колебалось в пределах от 13 % у *WSU 108* до 18 % у сорта *Stankovich*. Наименьшая доля в Р-витаминном комплексе плодов клюквы, составлявшая в таксономическом ряду от 7 % у сорта *Holistar Red* до 12 % у сорта *Bain Favorit*, отмечена у флавонолов, содержание которых в таксономическом ряду варьировалось в диапазоне значений от 771,8 до 1092,8 мг/100 г. При этом количество дубильных веществ в плодах клюквы было довольно высоким и составляло 2,62–3,37 % сухой массы (табл. 3).

Таблица 3. Содержание фенольных соединений в сухой массе плодов интродуцированных сортов *Oxycoccus macrocarpus*Table 3. The content of phenolic compounds in the dry weight of the fruit varieties introduced *Oxycoccus macrocarpus*

Сорт	Биофлавоноиды, мг/100 г							
	Собственно антоцианы		Лейкоантоцианы		Сумма антоциановых пигментов		Катехины	
	X ± st	t <sub>cr</sub>	X ± st	t <sub>cr</sub>	X ± st	t <sub>cr</sub>	X ± st	t <sub>cr</sub>
<i>Stevens(st)</i>	2041,7 ± 42,1		5268,7 ± 122,2		7310,3 ± 80,3		1524,3 ± 13,1	
<i>Bain Favorit</i>	1703,3 ± 11,7	-7,8*	3878,0 ± 71,8	-9,8*	5581,3 ± 80,3	-15,2*	1016,2 ± 15,2	-25,3*
<i>Hiliston</i>	1761,7 ± 30,9	-5,4*	5609,3 ± 69,1	2,8*	7371,0 ± 52,5	0,6	1456,0 ± 52,5	-1,3
<i>Holistar Red</i>	2555,0 ± 20,2	11,0*	5908,0 ± 32,3	5,1*	8463,0 ± 52,5	12,0*	1774,5 ± 26,3	8,5*
<i>Stankovich</i>	1948,3 ± 5,8	-2,2	5559,2 ± 31,5	2,8*	7507,5 ± 26,3	2,8*	1827,6 ± 20,1	12,6*
<i>WSU 108</i>	2070,8 ± 35,5	0,5	4921,0 ± 11,3	-2,8*	6991,8 ± 40,1	-3,5*	1243,7 ± 54,7	-5,0*
Сорт	Биофлавоноиды, мг/100 г						Дубильные вещества, %	
	Флавонолы		Флавонолы/катехины		Общее содержание			
	X ± st	t <sub>cr</sub>	X ± st	t <sub>cr</sub>	X ± st	t <sub>cr</sub>	X ± st	t <sub>cr</sub>
<i>Stevens(st)</i>	1092,8 ± 33,3		0,7 ± 0,03		9927,3 ± 103,8	59,9*	3,12 ± 0,02	
<i>Bain Favorit</i>	863,5 ± 33,3	-4,9*	0,9 ± 0,03	3,0*	7461,0 ± 45,9	-32,7*	2,62 ± 0,02	-15,3*
<i>Hiliston</i>	1054,6 ± 26,5	-0,9	0,7 ± 0,01	0,3	9881,6 ± 26,5	-0,7	2,99 ± 0,01	-5,6*
<i>Holistar Red</i>	794,7 ± 7,6	-8,7*	0,4 ± 0,01	-9,3*	11032,2 ± 79,2	11,1*	3,16 ± 0,01	1,7
<i>Stankovich</i>	771,8 ± 42,6	-5,9*	0,4 ± 0,03	-7,6*	10106,9 ± 26,5	2,8*	3,37 ± 0,02	7,7*
<i>WSU 108</i>	985,8 ± 35,0	-2,8*	0,8 ± 0,01	2,6*	9221,3 ± 125,6	-5,1*	2,95 ± 0,02	-5,2*

Тестируемые сорта клюквы крупноплодной весьма существенно отличались от стандартного сорта *Stevens* по биохимическому составу плодов (табл. 4). Наибольшим количеством титруемых кислот, превышавшим таковое у эталонного сорта на 8–12 %, характеризовались сорта *Bain Favorit*, *Stankovich* и *WSU 108*. Вместе с тем у плодов сорта *Holistar Red* уровень накопления свободных органических кислот был сопоставим с таковым у сорта *Stevens*, тогда как у сорта *Hiliston* он был ниже на 24 %.

Плоды всех тестируемых сортов клюквы (за исключением *Hiliston*) были богаче аскорбиновой кислотой, чем плоды эталонного сорта, на 15–53 %, при наибольших различиях у сорта *Stankovich*. При этом у большинства новых сортов содержание гидроксикоричных кислот на 10–16 % уступало таковому у сорта *Stevens*, и лишь у сорта *Holistar Red* оно было выше на 9 %. Вместе с тем у сорта *Hiliston* достоверные различия с сортом *Stevens* по данному признаку отсутствовали.

Все новые сорта клюквы крупноплодной, за исключением *Bain Favorit*, характеризовались на 8–19 % более высоким, чем у районированного сорта, содержанием в плодах растворимых сахаров. При этом у сортов *Holistar Red*, *Stankovich* и особенно у *Hiliston* сахарокислотный индекс был на 8–42 % выше, чем у сорта *Stevens*, что свидетельствовало о более сладком вкусе их плодов (табл. 4).

Таблица 4. Относительные различия интродуцированных сортов *Oxycoccus macrocarpus* с районированным сортом *Stevens* по содержанию в плодах действующих веществ, %

Table 4. The relative differences introduced varieties *Oxycoccus macrocarpus* with *Stevens* released varieties on the content in the fruit of active substances, %

Показатель	<i>Bain Favorit</i>	<i>Hiliston</i>	<i>Holistar Red</i>	<i>Stankovich</i>	<i>WSU 108</i>
Сухие вещества	-9,3	+12,1	-5,0	-14,3	-7,1
Свободные орган. кислоты	+8,4	-23,6	-	+12,0	+12,4
Аскорбиновая кислота	+28,5	-6,7	+15,0	+53,4	+20,1
Гидроксикоричные кислоты	-9,5	-	+9,2	-15,5	-13,4
Растворимые сахара	-	+12,1	+10,6	+18,9	+7,5
Сахарокислотный индекс	-8,3	+41,7	+8,3	+8,3	-8,3
Пектиновые вещества	-6,0	-19,0	-24,0	-48,0	-32,0
Собственно антоцианы	-16,6	-13,7	+25,1	-	-
Лейкоантоцианы	-26,4	+6,5	+12,1	+5,5	-6,6
Антоциановые пигменты	-23,7	-	+15,8	+2,7	-4,4
Катехины	-33,3	-	+16,4	+19,9	-18,4
Флавонолы	-21,0	-	-27,3	-29,4	-9,8
Биофлавоноиды	-24,8	-	+11,1	+1,8	-7,1
Дубильные вещества	-16,0	-4,2	-	+8,0	-5,4

Примечание. Прочерк означает отсутствие статистически значимых по *t*-критерию Стьюдента различий с эталонным (стандартным) сортом при  $p < 0,05$ .

Вместе с тем у сортов *Bain Favorit* и *WSU 108* значения данного показателя на 8 % уступали таковому у эталонного сорта. В отличие от растворимых сахаров, в плодах всех тестируемых сортов клюквы содержание пектиновых веществ отставало от такового у районированного сорта на 6–48 %, при наибольших различиях у сорта *Stankovich*. В характере различий тестируемых сортов *Oxycoccus macrocarpus* с сортом *Stevens* прослеживались весьма неоднозначные тенденции в общем содержании в плодах биофлавоноидов. Так, лишь у сорта *Holistar Red* оно оказалось существенно (на 11 %) выше, при крайне незначительном (в пределах 2 %), но все же достоверном превышении эталонного уровня у сорта *Stankovich*. В отличие от данных объектов, для сортов *WSU 108* и особенно для *Bain Favorit* установлено отставание от эталонного сорта *Stevens* соответственно на 7 и 25 % в общем содержании в плодах Р-витаминов на фоне отсутствия различий с ним в этом плане у сорта *Hiliston*. Весьма неоднозначными оказались различия и в накоплении отдельных групп биофлавоноидов. Так, лишь в плодах сорта *Holistar Red* содержание наиболее ценных их представителей (собственно антоцианов) превышало таковое у районированного сорта на 25 %, тогда как у сортов *Bain Favorit* и *Hiliston*, напротив, уступало ему на 14–17 % при отсутствии достоверных различий с ним у сортов *Stankovich* и *WSU 108*. Содержание лейкоантоцианов в плодах сортов

*Hiliston*, *Holistar Red* и *Stankovich* на 6–12 % превышало таковое у сорта *Stevens*, тогда как у сортов *WSU 108* и *Bain Favorit*, напротив, уступало ему на 7 и 26 % (табл. 4). Из-за доминирующего положения лейкоантоцианов в составе Р-витаминного комплекса плодов клюквы аналогичные тенденции прослеживались в характере различий тестируемых объектов с сортом *Stevens* и в общем содержании антоциановых пигментов, а также в содержании катехинов, близких к лейкоантоцианам по химической природе. Так, лишь в плодах сортов *Holistar Red* и *Stankovich* содержание катехинов превышало таковое у районированного сорта на 16 и 20 %, тогда как у сортов *WSU 108* и *Bain Favorit*, напротив, уступало ему на 18 и 33 % на фоне отсутствия достоверных различий с ним у сорта *Hiliston*. Что касается флавонолов, то их содержание в плодах всех тестируемых объектов, кроме сорта *Hiliston*, оказалось ниже, чем у сорта *Stevens*, на 10–29 %. При этом содержание дубильных веществ в плодах новых сортов клюквы в большинстве случаев уступало таковому у районированного сорта на 4–16 % и лишь у сорта *Stankovich* оно было выше на 8 %.

В результате биохимического скрининга плодов исследуемых сортов *Oxycoccus macrocarpus* выявлены таксоны с наибольшим и, соответственно, с наименьшим содержанием действующих веществ разной химической природы. Так, лидирующее положение по содержанию в плодах сухих веществ принадлежало сорту *Hiliston*, свободных органических кислот – сортам *Stankovich* и *WSU 108*, аскорбиновой кислоты – сорту *Stankovich*, гидроксикоричных кислот – сорту *Holistar Red*, растворимых сахаров – сорту *Stankovich* (при наиболее высоком значении сахарокислотного индекса у сорта *Hiliston*), пектиновых веществ – сорту *Stevens*, биофлавоноидов (в том числе собственно антоцианов и лейкоантоцианов) – сорту *Holistar Red*, катехинов и дубильных веществ – сорту *Stankovich*, флавонолов – сортам *Stevens* и *Hiliston*.

Следует отметить, что при столь разноплановой картине преимуществ того или иного сорта *Oxycoccus macrocarpus* в содержании в плодах соединений разной химической природы достаточно трудно выявить таксоны с наиболее высоким интегральным уровнем их питательной и витаминной ценности. С этой целью нами использован собственный запатентованный [23] методический прием, основанный на сопоставлении у тестируемых объектов относительных размеров, амплитуд и соотношений статистически достоверных положительных и отрицательных отклонений от эталонных значений исследуемых характеристик биохимического состава плодов. По величине суммарной амплитуды выявленных отклонений, независимо от их знака, можно судить о выраженности различий каждого тестируемого объекта с районированным сортом *Stevens* по совокупности анализируемых признаков, что позволяет провести их ранжирование в порядке снижения степени данных различий. Соотношение же относительных размеров совокупностей положительных и отрицательных различий с эталонными значениями содержания в плодах действующих веществ являлось оценочным критерием интегрального уровня их питательной и витаминной ценности у каждого тестируемого сорта клюквы, если исходить из посыла, что все анализируемые признаки одинаково важны для оценки качества плодов.

В представленных в табл. 5 данных, полученных на основании табл. 4 и характеризующих направленность и степень выраженности сдвигов в биохимическом составе плодов новых тестируемых сортов *Oxycoccus macrocarpus* относительно эталонного сорта *Stevens*, наблюдается наличие генотипических различий в направленности и величине вышеуказанных сдвигов. При амплитуде данных различий в сортовом ряду от 139,6 до 237,7 % наименее значительными они были у сорта *Hiliston*, тогда как наиболее контрастными – у сортов *Bain Favorit* и *Stankovich*. При этом у двух сортов клюквы – *Bain Favorit* и *WSU 108* – относительные размеры отрицательных различий с сортом *Stevens* по совокупности анализируемых признаков существенно превосходили таковые положительных различий, тогда как в остальных случаях наблюдалась противоположная картина.

Наиболее же объективное представление об интегральном уровне питательной и витаминной ценности плодов каждого нового интродуцированного сорта *Oxycoccus macrocarpus* может дать кратный размер соотношения относительных величин сумм положительных и отрицательных отклонений от эталонных значений всех анализируемых признаков. Оказалось, что только у трех сортов клюквы он превышал 1,0, что свидетельствовало о более высоком, чем у районированного сорта *Stevens*, интегральном уровне питательной и витаминной ценности их плодов. При этом

нижеприведенная последовательность тестируемых объектов представлена в порядке снижения степени их преимуществ относительно эталонного сорта по данному признаку:

*Holistar Red* > *Stankovich* > *Hiliston* > ***Stevens*** > *WSU 108* > *Bain Favorit*.

Таким образом, лидирующее положение в приведенном ряду, при значительном отрыве от остальных сортов клюквы крупноплодной, принадлежало сорту *Holistar Red*, тогда как наименее ценными по биохимическому составу плодов были замыкавшие этот ряд сорта *WSU 108* и особенно *Bain Favorit*.

Таблица 5. Относительные размеры, амплитуда и соотношение разноориентированных различий в биохимическом составе плодов новых интродуцированных сортов *Oxycoccus macrocarpus* с районированным сортом *Stevens*, %

Table 5. Relative dimensions and the amplitude ratio variously differences in biochemical composition new fruit varieties introduced *Oxycoccus macrocarpus* with recognized varieties *Stevens*, %

Сорт	Относительные различия, %			
	Положит.	Отриц.	Амплитуда	Положит/отриц.
<i>Bain Favorit</i>	36,9	194,9	231,8	0,2
<i>Hiliston</i>	72,4	67,2	139,6	1,1
<i>Holistar Red</i>	123,6	56,3	179,9	2,2
<i>Stankovich</i>	130,5	107,2	237,7	1,2
<i>WSU 108</i>	40,0	112,5	152,5	0,4

На основании сопоставления величины рассматриваемого соотношения дана количественная оценка степени снижения интегрального уровня питательной и витаминной ценности плодов остальных таксонов клюквы относительно лидирующего в таксономическом ряду сорта *Holistar Red*. Как и следовало ожидать, наибольшей она была у сорта *Bain Favorit*, уступавшего лидирующему сорту по данному признаку в 11 раз. В остальных случаях подобные различия оказались значительно меньшими, уступая лидирующему сорту в 1,8–5,5 раза.

**Заключение.** Сравнительное исследование показателя сахарокислотного индекса, содержания свободных органических, аскорбиновой и гидроксикоричных кислот, сухих, дубильных и пектиновых веществ, растворимых сахаров и основных групп биофлавоноидов в плодах 6 новых интродуцированных в Беларуси сортов *Oxycoccus macrocarpus* (*Stevens(st)*, *Bain Favorit*, *Hiliston*, *Holistar Red*, *Stankovich*, *WSU 108*) показало, что по совокупности анализируемых признаков наиболее высокий интегральный уровень питательной и витаминной ценности, превосходящий таковой у остальных сортов в 1,8–11 раз, у плодов сорта *Holistar Red*, тогда как наименьший – у сорта *WSU 108* и особенно у *Bain Favorit*.

#### Список использованных источников

1. Буткус, В. Обогащение ресурсов клюквы / В. Буткус, Р. Рузгене // Вопросы структурной и функциональной реабилитации. – Вильнюс, 1980. – С. 27–29.
2. Химический состав *Oxycoccus Hill*. Сообщ. 2. *Oxycoccus microcarpus* Turcz. ex Rupr. и *O. macrocarpus* (Ait.) Pers. / В. Ф. Буткус [и др.] // Раст. ресурсы. – 1983. – Т. 19, вып. 1. – С. 125–129.
3. Cranberry quality: selection procedures for breeding programs / G. M. Sapers [et al.] // J. Amer. Soc. Hort. Sci. – 1983. – Vol. 108, N 2. – P. 241–246.
4. Fellers, C. R. Cranberries and cranberry products / C. R. Fellers, W. Esselen // Mass. Agric. Exp. Sta. Bull. – 1955. – N 481. – P. 62.
5. Howell, A. B. Update on health benefits of cranberry and blueberry / A. B. Howell // Acta Hort. – 2009. – Vol. 810. – P. 779–784.
6. Kereselidze, J. The results of biochemical investigation of 12 species of american large-fruited cranberry (*Oxycoccus macrocarpus* Pers.) / J. Kereselidze // Сообщ. Акад. Грузии. – 1997. – Vol. 155, N 3. – P. 447–449.
7. Liebster, J. Cranberry – du Kulturpreiselbure / J. Liebster. – München, 1972. – 217 s.
8. Клюква крупноплодная в Беларуси / Е. А. Сидорович [и др.]. – Минск: Наука и техника, 1987. – 238 с.
9. Развитие и метаболизм клюквы крупноплодной в Белорусском Полесье / Ж. А. Рупасова [и др.]. – Минск: Наука и техника, 1989. – 205 с.
10. Рупасова, Ж. А. Клюква крупноплодная в Беларуси (биохимический состав, хранение, переработка) / Ж. А. Рупасова, Т. И. Василевская. – Минск: Беларус. навука, 1999. – 167 с.

11. Рупасова, Ж. А. Вересковые в условиях Беларуси. Ассортимент ягодных растений семейства Ericaceae для возделывания на торфяных субстратах / Ж. А. Рупасова, А. П. Яковлев, И. И. Лиштван. – LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG Saarbruecken, Germany, 2012. – 67 с.
12. Фиторекультивация выбывших из промышленной эксплуатации торфяных месторождений севера Беларуси на основе культивирования ягодных растений сем. Ericaceae / Ж. А. Рупасова, А. П. Яковлев; под ред. акад. В. Н. Решетникова. – Минск: Беларус. навука, 2011. – 287 с.
13. Формирование биохимического состава плодов видов семейства Ericaceae (Вересковые) при интродукции в условиях Беларуси / Ж. А. Рупасова [и др.]; под ред. акад. В. И. Парфенова. – Минск: Беларус. навука, 2011. – 307 с.
14. Яковлев, А. П. Культивирование клюквы крупноплодной и голубики топяной на выработанных торфяниках севера Беларуси (оптимизация режима минерального питания) / А. П. Яковлев, Ж. А. Рупасова, В. Е. Волчков. – Минск: Тонпик, 2002. – 188 с.
15. Методы определения сухих веществ: ГОСТ 8756.2-82. – Введ. 01.01.1983. – М.: Изд-во стандартов, 1982. – 5 с.
16. Методы биохимического исследования растений / под ред. А. И. Ермакова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Ленинград: Агропроиздат, Ленинград. отд-ние, 1987. – 430 с.
17. Марсов, Н. Г. Фитохимическое изучение и биологическая активность брусники, клюквы и черники: дис. ... канд. фармацевт. наук: 15.00.02 –фармацевтическая химия, фармакогнозия. – Пермь, 2006. – 200 с.
18. Плешков, Б. П. Практикум по биохимии растений / Б. П. Плешков. – 3-е изд., доп. и перераб. – М.: Колос, 1985. – С. 110–112.
19. Swain, T. The phenolic constituents of *Prunus Domestica*. 1. The quantitative analysis of phenolic constituents / T. Swain, W. Hillis // J. Sci. Food Agric. – 1959. – Vol. 10, N 1. – P. 63–68.
20. Скорикова, Ю. Г. Методика определения антоцианов в плодах и ягодах / Ю. Г. Скорикова, Э. А. Шафтан // Тр. 3-го Всесоюз. семинара по биологически активным (лечебным) веществам плодов и ягод, 27–30 сент. 1966 г. – Свердловск, 1968. – С. 451–461.
21. Методика определения антоцианов в плодах аронии черноплодной / В. Ю. Андреев [и др.] // Фармация. – 2013. – № 3. – С. 19–21.
22. Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье // Государственная фармакопея СССР / редкол.: Ю. Г. Бобков и др. – М.: Медицина, 1987. – Вып. 1: Общие методы анализа. – С. 286–287.
23. Способ ранжирования таксонов растения: пат. № 17648 Респ. Беларусь: МПК А01Н 1/04, А01G 1/00 / А. П. Яковлев, Ж. А. Рупасова, В. Н. Решетникова; дата публ.: 30.10.2013.
24. Cesonienė, L. Evaluation of the biochemical components and chromatic properties of the juice of *Vaccinium macrocarpon* Aiton and *Vaccinium oxycoccos* L. / L. Cesonienė, R. Daubaras, I. Jasutienė, J. Vencloviene, I. Miliuskiene // Plant Foods Hum. Nutr. – 2011. – Vol. 66. – P. 238–244.
25. Голубика высокорослая. Оценка адаптационного потенциала при интродукции в условиях Беларуси / Ж. А. Рупасова [и др.]; под общ. ред. В. И. Парфенова; Нац. акад. наук Беларуси, Центр. ботан. сад. – Минск: Беларус. навука, 2007. – 442 с.

## References

1. Butkus, B. and Ruzgė, R. (1980), “Enrichment resources cranberry”, *Voprosy strukturnoi i funktsional'noi reabilitatsii* [Questions of structural and functional rehabilitation], Vilnius, LT, pp. 27–29.
2. Butkus, V. F., Gorbunov, A. B. and Cherkasov, A. F. (1983), “Chemical composition *Oxycoccus* Hill. Messaging. 2. *Oxycoccus microcarpus* Turcz. ex Rupr. and *O. macrocarpus* (Ait.) Pers”, *Rastitel'nye resursy* [Plant resources], vol. 19, no. 1, pp. 125–129.
3. Sapers, G. M., Phillips, J. G., Rudolf, H. M. and DiVito, A. M. (1983), “Cranberry quality: selection procedures for breeding programs”, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 108, no. 2, pp. 241–246.
4. Fellers, C. R. and Esselen, W. (1955), “Cranberries and cranberry products”, *Massachusetts Agricultural Experiment Station Bulletin*, no. 481, p. 62.
5. Howell, A. B. (2009), “Update on health benefits of cranberry and blueberry”, *Acta Horticulturae*, vol. 810, pp. 779–784.
6. Kereselidze, J. (1997), “The results of biochemical investigation of 12 species of american large-fruited cranberry (*Oxycoccus macrocarpus* Pers.)”, *Messaging. Georgian Academy of Sciences*, vol. 155, no. 3, pp. 447–449.
7. Liebster, J. (1972), *Cranberry – du Kulturpreiselbure*, München, DE.
8. Sidorovich, E. A., Rupasova, Zh. A., Kudinov, M. A., Gorlenko, S. V., Shapiro, D. K. and Ruban, N. N. (1987), *Klyukva krupnoplodnaya v Belarusi* [*Vaccinium macrocarpon* in Belarus], Science and technology, Minsk, BY.
9. Rupasova, Zh. A., Ignatenko, V. A., Rusalenko, V. G. and Rudakovskaya, R. N. (1989), *Razvitie i metabolizm klyukvy krupnoplodnoi v Belorusskom Poles'e* [The development of large-fruited cranberry and metabolism in Belarussian Polesie], Science and technology, Minsk, BY.
10. Rupasova, Zh. A. and Vasilevskaya, T. I. (1999), *Klyukva krupnoplodnaya v Belarusi (biokhimičeskii sostav, khranenie, pererabotka)* [*Vaccinium macrocarpon* in Belarus (biochemical composition, storage, processing)], Belarussian Navuka, Minsk, BY.
11. Rupasova, Zh. A., Yakovlev, A. P. and Lishtvan, I. I. (2012), *Vereskovye v usloviyakh Belarusi. Assortiment yagodnykh rastenii semeistva Ericaceae dlya vozdelevaniya na torfyanykh substratakh* [Ericaceae in the conditions of Belarus. Assortment of berries Ericaceae family plants for cultivation on peat substrates], LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG Saarbruecken, DE.

12. Rupasova, Zh. A. and Yakovlev, A. P. (2011), *Fitorekul'tivatsiya vybyvshikh iz promyshlennoi ekspluatatsii torfyanykh mestorozhdenii severa Belarusi na osnove kul'tivirovaniya yagodnykh rastenii semeistva Ericaceae* [Fitorekul'tivatsii retired from the industrial exploitation of peat deposits of the north of Belarus on the basis of seed cultivation of berry plants Ericaceae], in V. N. Reshetnikov (ed.), *Belarusian Navuka*, Minsk, BY.
13. Rupasova, Zh. A., Reshetnikov, V. N., Vasilevskaya, T. I., Yakovlev, A. P. and Pavlovskii, N. B. (2011), *Formirovanie biokhimicheskogo sostava plodov vidov semeistva Ericaceae (Vereskovyie) pri introduktsii v usloviyakh Belarusi* [Formation of the biochemical composition of the fruit species of the family Ericaceae for introduction in conditions of Belarus], in V. I. Parfenov (ed.), *Belarusian Navuka*, Minsk, BY.
14. Yakovlev, A. P., Rupasova, Zh. A. and Volchkov, V. E. (2002), *Kul'tivirovanie klyukvy krupnoplodnoi i golubiki topyanoi na vyrabotannykh torfyanikakh severa Belarusi (optimizatsiya rezhima mineral'nogo pitaniya)* [Cultivating large-fruited cranberry and blueberry swamp on depleted peat bogs of northern Belarus (mineral nutrition optimization mode)], Tonpik, Minsk, BY.
15. (1982), *GOST 8756.2-82: Metody opredeleniya sukhikh veshchestv* [GOST 8756.2-82: Methods for determination of solids], Izdatel'stvo standartov, Moscow, RU.
16. Ermakov, A. I. (ed.) (1987), *Metody biokhimicheskogo issledovaniya rastenii* [Methods of biochemical research of plants], 3rd ed., Agropromizdat, Leningradskoe otdelenie, Leningrad, RU.
17. Marsov, N. G. (2006), "Phytochemical studies and biological activity of lingonberry, cranberry and blueberry", Ph. D. Thesis, Pharmaceutical chemistry, pharmacognosy, Perm, RU.
18. Pleshkov, B. P. (1985), *Praktikum po biokhimii rastenii* [Workshop on Biochemistry of Plants], 3rd ed., Kolos, Moscow, RU.
19. Swain, T. and Hillis, W. (1959), "The phenolic constituents of *Prunus Domestica*. 1. The quantitative analysis of phenolic constituents", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 10, no. 1, pp. 63–68.
20. Skorikova, Y. G. and Shaftan, E. A. (1968), "Methods of determination of anthocyanins in the fruits and berries", *Trudy 3-go Vsesojuznogo seminaro po biologicheski aktivnym (lechebnym) veshhestvam plodov i jagod* [Proceedings of the 3rd All-Union Workshop on biologically active (therapeutic) substances of fruits and berries], Sverdlovsk, RU, 27–30 September 1966, pp. 451–461.
21. Andreev, V. Y., Kalinkina, G. I., Kolomiets, N. and Isaikina, N. V. (2013), "Method of determination of anthocyanins in the fruits of chokeberry *Aronia*", *Farmatsiya* [Pharmacy], no. 3, pp. 19–21.
22. Bobkov, Ju. G., Babajan, Je. A., Mashkovskij, M. D., Obojmakova, A. N., Bulaev, V. M., Gus'kova, L. S., Lepahin, V. K., Ljubimov, B. I., Natradze, A. G., Sokolov, S. D. and Tencova, A. I. (ed.) (1987) "Determination of tannins in herbal drugs", *Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR* [State Pharmacopoeia of the USSR], Medicine, Moscow, RU, vol. 1: *Obshchie metody analiza* [General methods of analysis], pp. 286–287.
23. Yakovlev, A. P., Rupasova, Y. A. and Reshetnikov, V. N. (2013), *Sposob ranzhirovaniya taksonov rasteniya* [The method of ranking the plant taxa], IPC A01H 1/04, A01G 1/00, BY, Pat. № 17648.
24. Cesonienė, L., Daubaras, R., Jasutienė, I., Vencloviienė, J. and Miliauskiene, I. (2011), "Evaluation of the biochemical components and chromatic properties of the juice of *Vaccinium macrocarpon* Aiton and *Vaccinium oxycoccos* L.", *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 66, pp. 238–244.
25. Rupasova, Y. A., Reshetnikov, V. N., Ruban, N. N., Ignatenko, V. A., Yakovlev, A. P. and Pyatnitsa, F. S. (2007), *Golubika vysokoroslaya. Otsenka adaptatsionnogo potentsiala pri introduktsii v usloviyakh Belarusi* [Highbush blueberry. Evaluation of adaptive capacity at introduction in conditions of Belarus], in V. I. Parfenov (ed.), *Belarusian Navuka*, Minsk, BY.

### Информация об авторах

*Рупасова Жанна Александровна* – чл.-кор., д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2В, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: J.Rupasova@cbg.org.by

*Павловский Николай Болеславович* – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2В, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: pavlovskiy@tut.by

*Василевская Тамара Ивановна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2В, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: T.Vasileuskaya@cbg.org.by

*Креницкая Наталья Болеславовна* – науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2В, 220012, Минск, Республика Беларусь)

### Information about the authors

*Rupasova Zhanna Aleksandrovna* – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the laboratory. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2V, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: J.Rupasova@cbg.org.by

*Pavlovski Nikolay Boleslavovoch* – Ph. D. (Biol.), Head of the laboratory. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2V, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pavlovskiy@tut.by

*Vasilevskaya Tamara Ivanovna* – Ph. D. (Biol.), Senior scientific researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus of Belarus (2V, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus)

*Krinitckaya Natalia Boleslavovna* – Scientific researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2V, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus)

*Тишковская Елизавета Владимировна* – мл. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2В, 220012, Минск, Республика Беларусь)

*Павловская Алла Генриховна* – науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2В, 220012, Минск, Республика Беларусь)

*Решетников Владимир Николаевич* – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий отделом. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2В, 220012, Минск, Республика Беларусь)

*Пинчукова Юлия Михайловна* – канд. техн. наук, доцент. Белорусский государственный экономический университет (ул. Свердлова 7, г. Минск, Беларусь). E-mail: pinchukova@gmail.com

*Лishtvan Иван Иванович* – академик, д-р техн. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт природопользования НАН Беларуси (ул. Скорины, 10, 220114, Минск, Республика Беларусь). E-mail: gntpecology@mail.ru

#### Для цитирования

Сравнительная оценка биохимического состава плодов новых интродуцированных сортов клюквы крупноплодной (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers.) в условиях Беларуси / Ж. А. Рупасова [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 1. – С. 16–24.

*Tishkovskaya Elizaveta Vladimirovna* – Junior researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2V, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus)

*Pavlovskaya Alla Genrihovna* – Scientific researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2V, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus)

*Reshetnikov Vladimir Nikolaevich* – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of Department. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2V, Surganov Str., Minsk, Republic of Belarus)

*Pinchukova Yulia Mihailovna* – Ph. D. (Engineering), Associate Professor. Department Commodity food products of the Belarusian State Economic University (7, Sverdlov Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pinchukova@gmail.com

*Lishtvan Ivan Ivanovich* – Academician, D. Sc. (Engineering), Professor, Main scientific researcher. Institute for Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus (10, Scorina Str., 220014, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gntpecology@mail.ru

#### For citation

Rupasova, Zh. A., Pavlovskii, N. B., Vasileuskaya, T. I., Krinitskaya, N. B., Tishkovskaya, E. V., Pavlovskaya, A. G., Reshetnikov, V. N., Pinchukova, Y. M. and Lishtvan, I. I. (2017), “Comparative estimation of biochemical composition of new introduced fruits of *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers. cultivars under conditions of Belarus”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, no. 1, pp. 16–24.

**А. С. Шляхтёнок**

*Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь*

**ДОРОЖНАЯ ОСА *AMBLYELLUS HASDRUBAL* (KOHLE, 1894)  
(HYMENOPTERA, POMPILIDAE) В БЕЛАРУСИ**

Приводится описание самцов редкого в Европе вида *Amblyellus hasdrubal* (Kohl), а также изображение имаго, проподоума, гениталий и прегенитальных стернумов.

*Ключевые слова:* Hymenoptera, Pompilidae, *Amblyellus hasdrubal*, Беларусь.

**A. S. Shlyakhtenok**

*Scientific and Practical Center for Bioresources of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Republic of Belarus*

**THE SPECIES *AMBLYELLUS HASDRUBAL* (KOHLE, 1894)  
(HYMENOPTERA, POMPILIDAE) IN BELARUS**

The description of the *Amblyellus hasdrubal* (Kohl) male, rare in Europe is adduced. The description is illustrated by images of imago, of propodeum, of genital and pregenital sterna.

*Keywords:* Hymenoptera, Pompilidae, *Amblyellus hasdrubal*, Belarus.

**Введение.** При обработке материала, полученного в 1989–2002 гг. с территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника (Беларусь), выявлено 2 экз. самцов *Amblyellus hasdrubal* (Kohl, 1894) [1]. Этот вид является очень редким в Европе и распространен преимущественно в Средиземноморском регионе [2]. В 2015 г. вышло две работы [3, 4], где указаны эти новые для фауны Беларуси род и вид.

Цель работы – дополнить литературные данные подробным описанием морфологии имаго *Amblyellus hasdrubal*, прежде всего самцов.

**Материалы и методы исследования.** На территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника отлов ос проводили с помощью ловушек Малеза в модификации Townes [5]. Подробно технология отлова насекомых ловушками Малеза описана нами ранее [6]. Наибольшая численность помпилид зафиксирована на побережье р. Припять, где одной ловушкой Малеза за сезон отлавливалось более 300 экз. В данном типе биотопов в окр. д. Красноселье отловлено 2 экз. *Amblyellus hasdrubal* (рис. 1).

Определение самцов семейства Pompilidae проводится, как правило, на основании изучения полового аппарата. Рисунки гениталий самцов *Amblyellus hasdrubal* выполнены с помощью цифрового фотоаппарата Canon A610 через окуляр бинокулярного микроскопа МБС-10 и обработаны в графическом редакторе Photoshop.

**Результаты и их обсуждение.** До 1981 г. род *Amblyellus* являлся подродом *Aporinellus* [7–9]. В 1981 г. на основе современных представлений о надвидовых таксонах М. Дэй [10] выделил его в самостоятельный род.

**Род *Amblyellus* Day, 1981**

*Amblyellus* [7]: 29; [8]: 85; [9]: 122 (как подрод *Aporinellus* Banks, 1911).

*Amblyellus* [10]: 400; [11]: 12, 23; [12]: 130; [13]: 727; [14]: 40; [15]: 36; [2]: 98; [16]: 24; [17]: 34; [18]: 224; [3]; [4].

Типовой вид: *Pompilus hasdrubal* (Kohl, 1894).

Род характеризуется черным телом с серым налетом. Проподоум сверху уплощенный, позади нормально закруглен, без заостренно выступающих заднебоковых углов, как у *Aporinellus*. Сильно



Рис. 1. Карта Беларуси с указанием места сбора (квадрат) *Amblyellus hasdrubal*

Fig. 1. Map of Belarus with an indication of the points of collections (square) *Amblyellus hasdrubal*

суженная спереди, иногда до стебелька, 3-я радиомедиальная ячейка значительно короче 2-й. Птеростигма небольшая. Передние лапки самок с 3–4 шипами тарзального гребня.

По-видимому, как и у *Aporinellus*, самки охотятся на пауков из семейств Охуoridae, Philodromidae, Salticidae и Thomisidae.

В Европе род представлен единственным видом – *Amblyellus hasdrubal* [2].

*Amblyellus hasdrubal* (Kohl, 1894) (рис. 2, 1–5)

*Pompilus hasdrubal* Kohl, 1894: 314. Голотип (♀): Испания, Барселона (Музей естественной истории, Вена) [1].

*Pompiloides obtusus* Gussakovskij, 1935: 147–148. Синтипы (♀♂): юг России (Волгоград, Сарепта) (ЗИН РАН, Ленинград) [19].

*Pompiloides insidiosus* Nouvel, Ribaut, 1958: 514–518. Голотип (♀): Франция, Бакарес (Национальный музей естественной истории, Лейден) [20].

*Aporinellus obtusus* (Gussakovskij, 1935); [8]: 85; [9]: 122.

*Amblyellus obtusus* (Gussakovskij, 1935); [12]: 130.

*Amblyellus hanibal* Kohl, 1935: [8]: 85; [9]: 123 (ошибка в написании *Amblyellus hasdrubal*).

*Amblyellus hasdrubal* (Kohl, 1894); [12]: 130; [13]: 727; [14]: 40; [15]: 36; [2]: 98; [16]: 24; [17]: 34; [18]: 224; [3]; [4].

**Подробное описание морфологических признаков изученного вида *Amblyellus hasdrubal*.**

**Самец (рис. 2, 1).**

**Жгутик.** Усики относительно короткие; 1-й флагелломер в 1,4, 2-й – в 1,6, 11-й – в 1,9 раза длиннее его ширины.

**Голова** в 1,2 раза шире ее высоты. Глаза заметно сближены книзу (расстояние между внутренними орбитами глаз вверху в 1,5 раза больше, чем внизу). Наличник матовый, в 2,4 раза шире его высоты; передний край прямой. Верхняя губа по нижнему краю закругленная. Лоб голый, выше усиковых ямок – короткая срединная продольная бороздка. Половина ширины лба посередине в 2,4 раза шире глаза. Темя голое, обрывистое. Отношение  $POD:OOD$  равно 1,1, отношение длины щеки к поперечному диаметру глаза (см. сбоку) – 0,4. Мандибулы в середине желтовато-коричневые.

**Грудь.** Длина пронотума составляет 0,52 его наибольшей ширины; задний край пронотума слабо вырезан. Метапостнотум в виде узкой щели, едва виден. Проподеум сбоку слабовыпуклый, пологий, по переднему краю в середине черное, блестящее, в очень мелких морщинах вдавление в виде полуэллипса (рис. 2, 3). По мнению Х. Вольфа [13], это вдавление принадлежит метапостнотуму. Длина проподеума 1,1 его максимальной ширины.

**Ноги** стройные. Длина задней голени составляет 1,4 1-го членика задней лапки; 1-й членик задней лапки длиннее ширины в 8,7 раза, 2-й – в 5,9, 3-й – в 4,6, 4-й – в 2,9. Коготки с зубчиком. Длинная шпора задних голеней равна длине 1-го членика задней лапки.

**Крылья.** Передние крылья слегка затемнены по заднему краю; длина переднего крыла составляет 1,24 длины метасомы. Передние крылья с 3 радиомедиальными ячейками, 3-я ячейка заметно короче 2-й; 2rs-m (2-я радиомедиальная) жилка прямая. Птеростигма небольшая, ее длина составляет 2,6 ширины. Длина 1-го отрезка радиальной жилки равна 0,8 длины птеростигмы. Нервулюс интерстициальный либо слабоантефуркальный (рис. 2, 2).

**Брюшко** сверху удлиненное, веретеновидное; его длина в 3,5 раза превышает ширину; 6-й стернум с глубокой вырезкой.

**Гениталии** (рис. 2, 4). Гипопигий сбоку кровлеvidный, с высоким продольным килем без отстоящих щетинок, вентрально с небольшими жесткими щетинками по бокам и заднему краю (рис. 2, 5).

**Опушение и окраска.** Тело черное, в коричневатом и сером опушении; на 1–3-м тергумах по заднему краю перевязи из прижатых светлых волосков. Длинные щетинки только на мандибулах и верхней губе.

Длина тела – 6,0 мм.

**М а т е р и а л.** Беларусь: Гомельская обл., Полесский государственный радиационно-экологический заповедник, окр. д. Красноселье, берег р. Припять, (51°31'N–29°52'E): 19.06-07.1990 – 2 ♂♂, л. Малеза (А. Шляхтёнок).

**Самка.** В наших сборах самки *Amblyellus hasdrubal* отсутствуют. Согласно литературным данным [8, 13], самки полностью черные. У самки

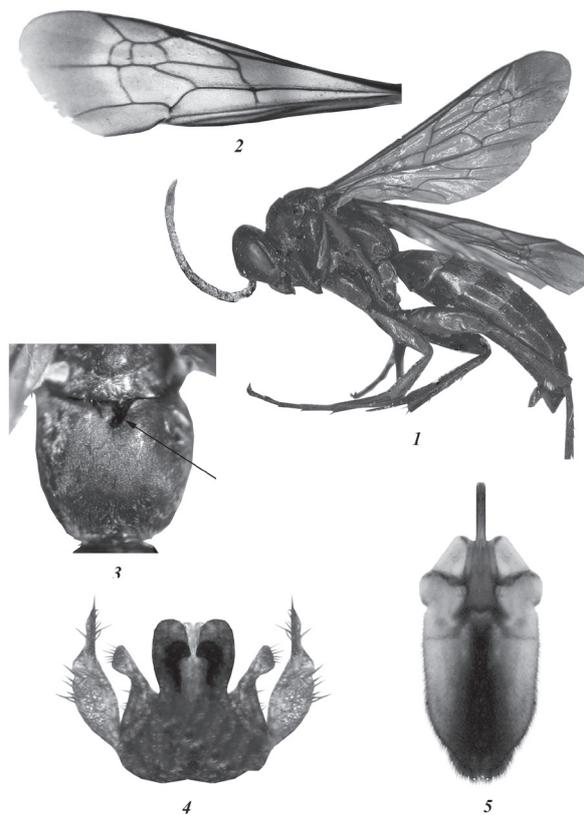


Рис. 2. *Amblyellus hasdrubal*, ♂. 1 – имаго, 2 – переднее крыло, 3 – проподеум, 4 – гениталии, 5 – гипопигий

Fig. 2. *Amblyellus hasdrubal*, ♂. 1 – imago, 2 – front wing, 3 – propodeum, 4 – genitalia, 5 – hypopygium

1-й членок передняй лапки с 3 игловидными шипами тарзального гребня, где последний шип не достигает 2-го членка лапки; 2-й членок лапки в 2 раза длиннее ширины, а 3-й – немного длиннее ширины (приводится как *obtusus*). Либо у самки 1-й членок передняй лапки с 4 расширенными шипами тарзального гребня, где последний шип превосходит 2-й членок лапки; 2-й членок лапки в 3 раза длиннее ширины, а 3-й – в 2 раза длиннее ширины (приводится как *hasdrubal*).

Распространение. Босния и Герцоговина, Чехия, Франция, Германия, Греция, Италия, Португалия, Испания, Кыргызстан, Россия (Волгоград, Сарепта), Турция, Иран.

### Благодарность

Автор выражает глубокую благодарность R. Wahis (Université de Liège, Gembloux, Belgique), А. С. Лелею и В. М. Локтионову (Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток, Россия) за помощь в определении вида. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (№ Б15-049).

### Acknowledgment

The author is deeply grateful to R. Wahis (Université de Liège, Gembloux, Belgique), A. S. Lelej and V. M. Loktionov (Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch of RAS, Vladivostok) for help in identification of the species. The work was supported by the Belarusian Foundation for Fundamental Research (N B15-049).

### Список использованных источников

1. Kohl, F. F. Zur Hymenopterenfauna Afrikas / F. F. Kohl // Annin. naturh. Mus. Wien. – 1894. – Vol. 9. – P. 279–350.
2. Wahis, R. Sur Amblyellus hasdrubal Kohl (Hymenoptera: Pompilidae, Pompilinae) / R. Wahis // Zoologische Mededelingen. – 1983. – Vol. 57. – P. 97–100.
3. Сравнительно-фаунистический анализ перепончатокрылых насекомых (Hymenoptera) лесных зон Беларуси и юга Дальнего Востока России / А. С. Лелей [и др.] // Чтения памяти Алексея Ивановича Куренцова. – Владивосток, 2015. – Вып. 26. – С. 19–43.
4. Шляхтёнок, А. С. Оценка современного состояния фауны дорожных ос (Hymenoptera, Pompilidae) Беларуси / А. С. Шляхтёнок // Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов: материалы III междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 110-летию со дня рожд. акад. Н. В. Смольского (7–9 окт. 2015 г., Минск, Беларусь): в 2 ч. / редкол.: В. В. Титок (отв. ред.) и др. – Минск, 2015. – Ч. 2. – С. 322–327.
5. Townes, A. A light-weight Malaise trap / A. Townes // Ent. News. – 1972. – Vol. 83. – P. 239–247.
6. Терёшкин, А. М. Опыт использования ловушки Малеза для изучения насекомых / А. М. Терёшкин, А. С. Шляхтёнок // Зоол. журн. – 1989. – Т. 67, вып. 2. – С. 151–154.
7. Wolf, H. Systematisches Verzeichnis der Wegwespen (Hymenoptera, Pompiloidea) Mittel- und Nordeuropas / H. Wolf // Nachr. Naturw. Mus. Aschaffenh. – 1965. – Bd. 72. – S. 1–38.
8. Priesner, H. Studien zur Taxonomie und Faunistik der Pompiliden Österreichs. Teil 4 / H. Priesner // Naturk. Jb. Stadt Linz. – 1969. – S. 77–132.
9. Тобиас, В. И. // Определитель насекомых европейской части СССР / В. И. Тобиас. – Л.: Наука, 1978. – Т. 3: Перепончатокрылые, ч. 1. – С. 83–147.
10. Wolf, H. Wegwespen aus dem Museo Civico di Storia Naturale in Mailand / H. Wolf // Atti Soc. Ital. Sci. Nat. – 1970. – Vol. 110. – P. 391–417.
11. Wolf, H. Wegwespen (Hym., Pompil.) aus dem Zoologischen Museum der Universität Coimbra / H. Wolf, Diniz M. de A. // Mem. Mus. Zool. Coimbra. – 1970. – Vol. 311. – P. 4–26.
12. Wolf, H. Insecta Helvetica Fauna 5. Hymenoptera Pompilidae / H. Wolf. – Zurich: SEG edition, 1972. – 176 s.
13. Wahis, R. Nouvelle contribution à la connaissance de Hyménoptères Pompilides de la Yougoslavie (Hymenoptera: Pompilidae) / R. Wahis // Bull. Rech. Agron. Gembloux. – 1970. – Vol. 5, N 3/4. – P. 709–744.
14. Wolf, H. Über einige Wegwespen (Hymenoptera, Pompilidae) aus dem Rijksmuseum van Natuurlijke Historie zu Leiden / H. Wolf // Zool. Meded. Leiden. – 1975. – Bd. 49. – S. 27–55.
15. Day, M. C. A revision of *Pompilus* Fabricius (Hymenoptera: Pompilidae), with further nomenclatural and biological considerations // Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Ent.). – 1981. – Vol. 42, N 1. – P. 1–42.
16. Wahis, R. Catalogue systématique et codage des Hyménoptères Pompilides de la région ouest-européenne / R. Wahis // Notes fauniques de Gembloux. – 1986. – N 12. – P. 1–91.
17. Wahis, R. Mise à jour du Catalogue systématique des Hyménoptères Pompilides de la région ouest-européenne. Additions et Corrections / R. Wahis // Notes fauniques de Gembloux. – 2006. – N 59. – P. 31–36.
18. Ghahari, H. An Annotated catalogue of the Iranian Pompilidae (Hymenoptera: Vespoidea) / H. Ghahari, N. Gadallah, R. Wahis // Faunistic Entomology. – 2014. – Vol. 67. – P. 221–241.
19. Gussakovskij, V. Paläarktische Pompiloides-Arten (Hymenoptera, Psammocharidae) / V. Gussakovskij // Konowia. – 1935. – Bd. 14. – S. 135–150.
20. Nouvel, H. Trois Pompilides nouveaux de la France méridionale (Hymenoptera: Pompilidae) / H. Nouvel, H. Ribaut // Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse. – 1958. – Vol. 93. – P. 511–518.

## References

1. Kohl, F. F. (1894), “Zur Hymenopterenfauna Afrikas”, *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, vol. 9, pp. 279–350.
2. Wahis, R. (1983), “Sur *Amblyellus hasdrubal* Kohl (Hymenoptera: Pompilidae, Pompilinae)”, *Zoologische Mededelingen*, vol. 57, pp. 97–100.
3. Lelei, A. S., Proshchalykin, M. Yu., Tereshkin, A. M., Shlyakhtenok, A. S., Loktionov, A. V. and Shabalina, S. A. (2015), “Comparative analysis of the faunistic of Hymenoptera (Hymenoptera) of Belarus and the south of the Russian Far East forest areas”, *Chteniya pamyati Aleksey Ivanovicha Kurentsova* [Reading the memory of Alexei Ivanovich Kurentsova], Dal'nauka, Vladivostok, RU, vol. 26, pp. 19–43.
4. Shlyakhtenok, A. S. (2015), “Evaluation of the current state of road fauna wasps (Hymenoptera, Pompilidae) Belarus”, *Problemy sokhraneniya biologicheskogo raznoobraziya i ispol'zovaniya biologicheskikh resursov: materialy III mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferencii, posvjashchennoj 110-letiju so dnja rozhdenija akademika N. V. Smol'skogo* [Problems of biodiversity conservation and use of biological resources: proceedings of the III international scientific and practical conference dedicated to the 110th anniversary of academician N. V. Smolski], Minsk, BY, 7–9 October 2015, ch. 2, pp. 322–327.
5. Townes, A. (1972), “A light-weight Malaise trap”, *Entertainment News*, vol. 83, pp. 239–247.
6. Tereshkin, A. M. and Shlyakhtenok, A. S. (1989), “Experience using Malaise traps for the study of insects”, *Zoologicheskii zhurnal* [Zoological journal], vol. 67, no 2, pp. 151–154.
7. Wolf, H. (1965), “Systematisches Verzeichnis der Wegwespen (Hymenoptera, Pompiloidea) Mittel- und Nordeuropas”, *Nachrichten des Naturwissenschaftlichen Museum der Stadt Aschaffenburg*, bd. 72, pp. 1–38.
8. Priesner, H. (1969), “Studien zur Taxonomie und Faunistik der Pompiliden Österreichs. Teil 4”, *Naturkundliches Jahrbuch der Stadt Linz*, pp. 77–132.
9. Tobias, V. I. (1978), “POMPILIDAE family-spider wasp”, *Opredelitel' nasekomykh evropeiskoi chasti SSSR* [Key to the insects of the European part of the USSR], Nauka, Leningrad, RU, vol. 3: *Pereponchatokrylye* [Hymenoptera], ch. 1, pp. 83–147.
10. Wolf, H. (1970), “Wegwespen aus dem Museo Civico di Storia Naturale in Mailand”, *Atti della Società Italiana Scienze Naturali, Museo Civico di Storia Naturale Milano*, vol. 110, pp. 391–417.
11. Wolf, H. and Dinz, M. (1970), “Wegwespen (Hym., Pompil.) aus dem Zoologischen Museum der Universität Coimbra”, *Memórias e Estudos do Museu Zoológico da Universidade de Coimbra*, 1970, vol. 311, pp. 4–26.
12. Wolf, H. (1972), *Insecta Helvetica Fauna. 5. Hymenoptera Pompilidae*, SEG ed., Zurich, DE.
13. Wahis, R. (1970), “Nouvelle contribution à la connaissance de Hyménoptères Pompilides de la Yougoslavie (Hymenoptera: Pompilidae)”, *Bulletin des Recherches agronomiques de Gembloux*, 1970, vol. 5, no. 3–4, pp. 709–744.
14. Wolf, H. (1975), “Über einige Wegwespen (Hymenoptera, Pompilidae) aus dem Rijksmuseum van Natuurlijke Historie zu Leiden”, *Zoologische Mededelingen. Leiden*, bd. 49, pp. 27–55.
15. Day, M. C. (1981), “A revision of *Pompilus* Fabricius (Hymenoptera: Pompilidae), with further nomenclatural and biological considerations”, *Bulletin of The British Museum (Natural History) Entomology*, vol. 42, no. 1, pp. 1–42.
16. Wahis, R. (1986), “Catalogue systématique et codage des Hyménoptères Pompilides de la région ouest-européenne”, *Notes fauniques de Gembloux*, no. 12, pp. 1–91.
17. Wahis, R. (2006), “Mise à jour du Catalogue systématique des Hyménoptères Pompilides de la région ouest-européenne. Additions et Corrections”, *Notes fauniques de Gembloux*, no. 59, pp. 31–36.
18. Ghahari, H., Gadallah, N. S. and Wahis, R. (2014), “An Annotated catalogue of the Iranian Pompilidae (Hymenoptera: Vespoidea)”, *Faunistic Entomology*, vol. 67, pp. 221–241.
19. Gussakovskij, V. (1935), “Paläarktische Pompiloides-Arten (Hymenoptera, Psammocharidae)”, *Konowia*, bd. 14, pp. 135–150.
20. Nouvel, H. and Ribaut, H. (1958), “Trois Pompilides nouveaux de la France méridionale (Hymenoptera: Pompilidae)”, *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulou*, vol. 93, pp. 511–518.

## Информация об авторах

Шляхтёнок Александр Сергеевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shlyakhtenok@mail.ru

## Information about the authors

Shlyakhtenok Alexander Sergeevich – Ph. D. (Biol.), Senior scientific researcher. Scientific and Practical Center for Bioresources of the National academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus)

## Для цитирования

Шляхтёнок, А. С., Дорожная оса *Amblyellus hasdrubal* (Kohl, 1894) (Hymenoptera, Pompilidae) в Беларуси / А. С. Шляхтёнок // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 1. – С. 25–29.

## For citation

Shlyakhtenok, A. S. (2017), “The species *Amblyellus hasdrubal* (Kohl, 1894) (Hymenoptera, Pompilidae) in Belarus”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, no. 1, pp. 25–29.

**Е. В. Болотник, А. А. Черешнев, М. А. Титок, Э. И. Коломиец**

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

### **ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТОВ *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM* S1, УСТОЙЧИВЫХ К БУТАНОЛУ**

Оптимизированы условия химического мутагенеза бактерий *C. acetobutylicum* S1. Показано, что обработка бактериальной культуры, выращенной в течение 8 ч в стандартной синтетической среде MSS, N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином в концентрации 50 мкг/мл в цитратном буфере (рН = 5,5) в течение 60 мин при 25 °С позволяет отбирать варианты мутантов, стабильно наследующих признак устойчивости к бутанолу в концентрации 2,5 %. Анализ состава жирных кислот цитоплазматической мембраны выявил наличие 2-гексилциклопропаноктановой кислоты у мутанта, характеризующегося повышенной продукцией бутанола.

*Ключевые слова:* биобутанол, *Clostridium acetobutylicum*, мутагенез, цитоплазматическая мембрана.

**E. V. Bolotnik, A. A. Chereshev, M. A. Titok, E. I. Kolomiets**

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

### **SELECTION OF BUTANOL-RESISTANT MUTANTS OF *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM* S1**

Conditions were optimized for chemical mutagenesis of bacteria *C. acetobutylicum* S1. It was shown that treatment of bacterial culture pre-grown for 8 hours in standard synthetic MSS medium, with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine at concentration 50 µg/ml in citrate buffer (pH = 5.5) during 60 min at 25 °C allowed to select mutant variants stably inheriting the trait of resistance to 2.5 % butanol. Analysis of fatty acid composition of cytoplasmic membrane has revealed presence of 2-hexylcyclopropane octanoic acid in mutant distinguished by elevated butanol production.

*Keywords:* biobutanol, *Clostridium acetobutylicum*, mutagenesis, cytoplasmic membrane.

**Введение.** Биобутанол по ряду характеристик имеет ряд преимуществ перед другими видами биотоплива. В частности, он не гигроскопичен, не летуч, имеет низкую коррозионную активность, близкое к бензину октановое число, в его выхлопах не содержится вредных веществ [1]. Однако процесс ацетонобутиловой ферментации, традиционно осуществляемой бактериями рода *Clostridium*, не рентабелен в связи с низкой продуктивностью используемых штаммов. Ключевым фактором, лимитирующим накопление бутанола в процессе ацетонобутилового брожения, является ингибирование сольвентогенных бактерий продуктами собственного метаболизма и прежде всего бутанолом. Накапливающийся в процессе ферментации бутанол влияет на свойства клеточной цитоплазматической мембраны. Воздействуя на «ионные каналы», он нарушает протонный ( $\Delta pH$ ) и электрохимический ( $\Delta \psi$ ) градиенты, ингибирует мембранные АТФазы, приводит к снижению концентрации АТФ в клетке и препятствует поступлению в нее глюкозы [2]. Помимо нарушения поверхностных структур клетки бутанол денатурирует и изменяет конформацию целого ряда функционально важных молекул, в том числе белков, ДНК, РНК и липидов [3]. Все вышеперечисленные эффекты приводят к тому, что уже в концентрации 9–10 г/л бутанол нарушает жизнедеятельность бактерий *C. Acetobutylicum*, а в концентрации 13 г/л вызывает их гибель [4]. В связи с этим при создании штаммов-продуцентов н-бутанола абсолютно необходимым этапом является получение таких вариантов штаммов, которые устойчивы к воздействию продуктов метаболизма и в первую очередь бутанола.

Цель настоящей работы – получение устойчивых к бутанолу мутантов *C. acetobutylicum* S1 с помощью химического мутагенеза.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали бактерии *C. acetobutylicum* S1, отобранные в результате адаптивной селекции и характеризующиеся повышенной резистентностью к бутанолу (17 г/л). Для культивирования *C. acetobutylicum* использовали среды следующего

состава (г/л): среду Рз (мука ржаная обдирная (крахмалистость 60 %) – 100,0; вода водопроводная – до 1 л; pH  $6,5 \pm 0,5$ ), среду MSS (глюкоза – 30,0;  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  – 3,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,8;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,0;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,05; дрожжевой экстракт – 5,0; цистеина гидрохлорид – 0,5; вода дистиллированная – до 1 л, pH  $6,8 \pm 0,2$ ), среду MSA (глюкоза – 20,0;  $\text{NH}_4\text{COOH}$  – 3,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,7;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,7;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  – 0,02;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,015; NaCl – 0,01; дрожжевой экстракт – 5,0; цистеина хлорид – 0,5; бактотриптон – 1,0; вода дистиллированная – до 1 л; pH  $6,8 \pm 0,2$ ).

В лабораторных условиях бактерии хранили в глубинной культуре при +4 °С и поддерживали путем периодических пересевов в жидкой среде MSS.

Для создания анаэробных условий использовали герметичную камеру для чашек Петри AnaeroJar Assembly (AG25) объемом 2,5 л и газогенерирующие пакеты BD GasPak, обеспечивающие снижение концентрации кислорода ( $\leq 1$  об. %) и обогащение атмосферы углекислым газом ( $\geq 13$  об. %).

Мутагенез осуществляли с помощью N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина производства Fluka Chemie GmbH, применяя мутаген в концентрации 100 мкг/мл в фосфатном (615 мл/л 1 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 385 мл/л 1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , вода дистиллированная – до 1 л, pH 7,0) или цитратном (137 мл/л 0,1 М лимонной кислоты, 363 мл/л 0,1 М цитрата натрия, вода дистиллированная – до 1 л, pH 5,5) буфере.

Титр жизнеспособных клеток бактерий (КОЕ/мл) в культуральной жидкости (КЖ) определяли методом предельных разведений с последующим высевом на агаризованную среду MSS. Учет колоний осуществляли через 48–72 ч культивирования в анаэробной атмосфере при 37 °С.

Выход биомассы определяли весовым методом после высушивания клеток до постоянной массы при 105 °С. Оптическую плотность бактериальной суспензии измеряли с помощью фотокориметра КФК-2-УХЛ4.2 (РФ) при длине волны  $590 \pm 10$  нм.

Процент жизнеспособных бактерий (*A*) после воздействия мутагеном определяли по формуле  $A = 100a/c$ , где *a* – титр жизнеспособных бактерий после обработки мутагеном, *c* – титр жизнеспособных бактерий до обработки мутагеном. Процент погибших бактерий (*B*) рассчитывали по формуле  $B = 100\% - A$ .

Активную кислотность (pH) определяли потенциометрически, используя pH-метр HI-221 (HANNA Instruments, Польша).

Липиды из клеточной биомассы экстрагировали методом Фолча в модификации Блайя и Дайэра смесью хлороформа и метанола в соотношении 1:2 по объему [5]. Экстракт липидов высушивали на ротационном испарителе, а затем подвергали метанолизу для получения метиловых эфиров жирных кислот. Качественный и количественный состав последних изучали методом хромато-масс-спектрометрии с помощью газового хроматографа Agilent 6890N с масс-селективным детектором Agilent 5975 Inert в режиме регистрации полного ионного тока (Scan). Интервал масс  $m/z = 40$ –750 Да. Колонка – HP-5MS (Agilent 19091S-433 30 м×0,25 мм×0,25 мкм), газ-носитель – гелий. Скорость потока – 0,8 л/мин. Температура испарителя – 250 °С. Для анализа хроматограмм и масс-спектров использовали программное обеспечение Agilent MassHunter Workstation Software version B.01.03 (Agilent Technologies Inc., США).

Продуцирующую способность клостридий определяли путем измерения концентрации растворителей (ацетон, бутанол, этанол) в КЖ бактерий методом газо-адсорбционной хроматографии. Перед проведением анализа пробы КЖ центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 15 мин. К 1,8 мл осветленной КЖ добавляли 0,2 мл 5 %-ного пропанола. В газохроматографическую колонку вводили 5 мкл полученной смеси. Использовали прибор «Хром-5» (Чехия) с пламенно-ионизационным детектором, стальной колонкой (длина 270 см, внутренний диаметр 4 мм), заполненной пористым полимером Porapak Q 80–100 меш. Температура термостата колонки (изотермический режим) составляла 190 °С в течение 6 мин. Расход газа-носителя (гелия) – 35 мл/мин, температура инжектора и детектора – 250 °С. Идентификацию веществ определяли по относительному времени удерживания с использованием пропанола в качестве внутреннего стандарта. Площади пиков измеряли с помощью цифрового интегратора CI-100A (Чехия). Для количественного определения продуктов брожения предварительно рассчитывали относительный фактор чувствительности для каждого из компонентов смеси:

$$F = A_x[S]/[X]A_s,$$

где  $F$  – относительный фактор чувствительности;  $A_x, A_s$  – площади пиков определяемого вещества и внутреннего стандарта соответственно;  $[X], [S]$  – концентрации определяемого вещества и внутреннего стандарта соответственно.

Концентрацию продуктов рассчитывали по формуле  $[X] = A_x[S]/FA_s$ .

**Результаты и их обсуждение.** Для отбора толерантных к бутанолу бактерий *C. acetobutylicum* применяют разные методические подходы. В частности, методы адаптивной селекции, индуцированного мутагенеза, генно-инженерного конструирования позволяют получать штаммы, характеризующиеся повышенной устойчивостью к сольвентам и способностью более эффективно продуцировать бутанол [6]. Ранее в результате адаптивной селекции был отобран штамм *C. acetobutylicum* S1, устойчивый к бутанолу в концентрации 1,7 % [7]. В настоящей работе для увеличения его толерантности к сольвентам использовали метод химического мутагенеза. Следует отметить, что данный методический подход является классическим и знание оптимальных условий для отбора мутантного потомства позволяет эффективно изменить генетические свойства исследуемых бактерий и разработать систему их генетического анализа.

В качестве мутагена использовали N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин, обладающий по сравнению с аналогами высокой мутагенной активностью при низких концентрациях, что не оказывает значительного влияния на жизнеспособность обрабатываемых бактерий [8].

На первом этапе с целью стандартизации условий проведения экспериментов подбирали синтетическую среду для культивирования *C. acetobutylicum* S1. Испытанные среды MSS и MSA отличались концентрациями солей, источника углерода и энергии, а кроме того, среда MSA содержала бактотриптон. Среды засеивали посевным материалом в объеме 2 %, после чего ставили на брожение в течение 24 ч при температуре 37 °С. Для установления динамики роста бактерий каждый час измеряли показатели оптической плотности культуры и производили высеив на агаризованные среды для определения титра жизнеспособных клеток. На основании полученных данных определяли кинетические параметры роста бактерий (рис. 1).

Как видно из данных, приведенных на рис. 1, для штамма *C. acetobutylicum* S1 удельная скорость роста на среде MSS была в 2,17 раза выше ( $\mu_{\max} = 0,52 \text{ ч}^{-1}$ , время генерации  $g = 1,34 \text{ ч}$ ), чем

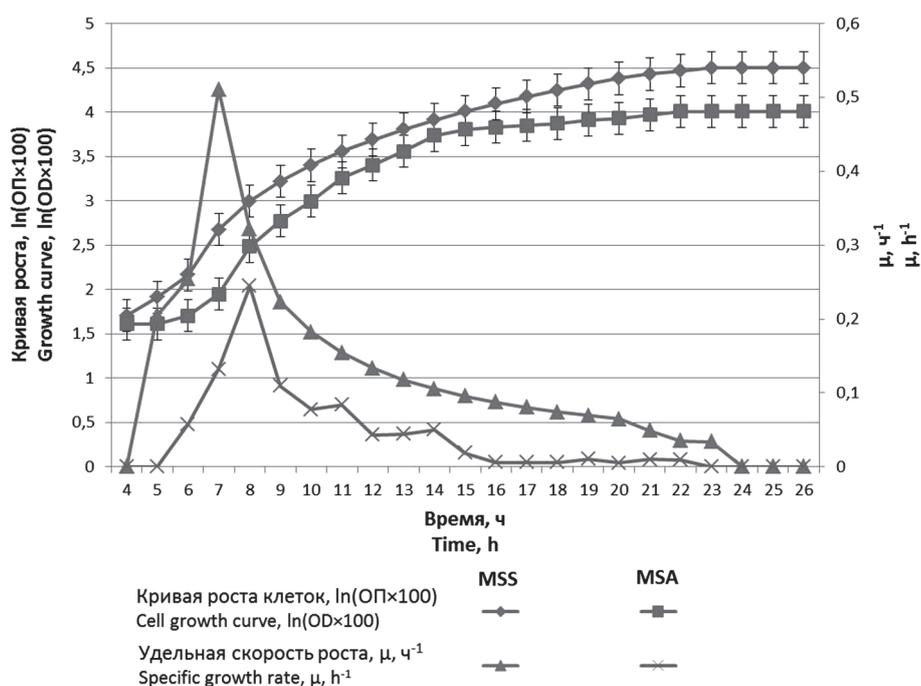


Рис. 1. Показатели роста бактерий *C. acetobutylicum* S1 на селективных средах MSS и MSA

Fig. 1. Growth parameters of bacteria *C. acetobutylicum* S1 on selective media MSS and MSA

на среде MSA ( $\mu_{\max} = 0,24 \text{ ч}^{-1}$ , время генерации  $g = 2,83 \text{ ч}$ ). Интенсивность накопления биомассы от момента засева бактерий на среды MSS и MSA достигала максимума через 7 и 8 ч соответственно. После этого скорость роста начинала снижаться, а интенсивный прирост биомассы продолжался следующие 8–10 ч. Следует отметить, что плотность популяции бактерий *C. acetobutylicum* S1 в течение логарифмической фазы роста (6–8 ч) была несколько выше на среде MSS. Исходя из полученных данных, для дальнейших исследований использовали синтетическую среду MSS.

Известно, что мутагенная активность N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина зависит от pH-среды, в которой осуществляется мутагенез. Поэтому на следующем этапе работы клетки *C. acetobutylicum* S1 обрабатывали разными концентрациями мутагена в различных буферных системах. Мутагенез осуществляли при следующих условиях: концентрация N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина – 10, 15, 25 и 50 мкг/мл; буферная система – цитратный буфер с pH 5,5, фосфатный буфер с pH 7,0; время обработки бактерий *C. acetobutylicum* S1 – 60 мин [9].

Для оценки эффективности мутагенеза определяли выживаемость бактерий (титр, КОЕ/мл) после мутагенного воздействия. При этом учитывали, что для модельных систем (например, бактерий *E. coli*) самая высокая частота мутирования генетического материала регистрируется при выживаемости бактериальной популяции 0,01 % [10]. Кроме того, показателем эффективности мутагенеза являлось количество клонов, образующихся на плотной агаризованной среде MSS, содержащей 2 % бутанола (количество мутантов, толерантных к бутанолу), а также количество жизнеспособных бактерий через 24 ч культивирования в жидкой среде MSS, содержащей 2 % бутанола. Предполагали, что скорость накопления биомассы в селективной среде напрямую коррелирует с количеством устойчивых к бутанолу жизнеспособных клеток после обработки бактериальной популяции мутагеном.

В результате проведенных экспериментов установлено, что снижение выживаемости клеток при обработке бактериальной культуры мутагеном происходит как в фосфатном (pH 7), так и в цитратном буфере (pH 5,5). Однако только в вариантах с цитратным буфером наблюдалась корреляция между титром жизнеспособных бактерий и концентрацией мутагена (рис. 2). Кроме того, использование при мутагенезе цитратного буфера, в отличие от фосфатного, позволило отобрать на плотной среде MSS, содержащей 2; 2,5 и 3 % бутанола, устойчивые к бутанолу мутанты, а также достигнуть наибольшего накопления биомассы обработанных клеток (концентрация мутагена – 50 мкг/мл, время обработки – 60 мин) при их культивировании в жидкой среде MSS с 2 % бутанола (37 °С, 24 ч), несмотря на наибольшее падение показателя

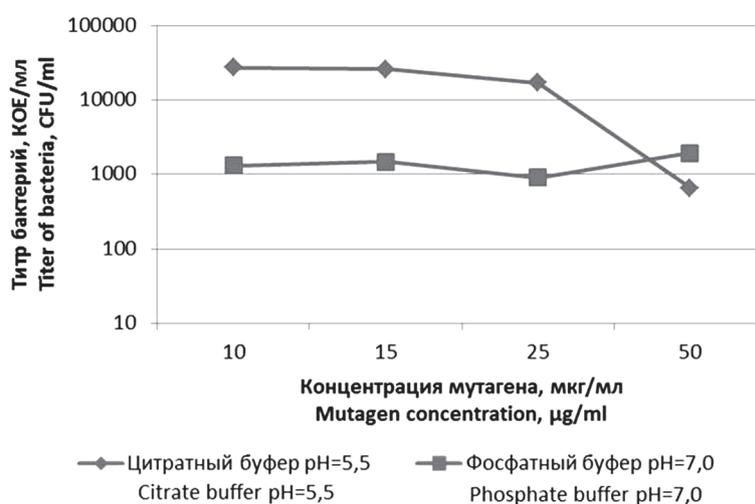


Рис. 2. Титр жизнеспособных клеток бактерий *C. acetobutylicum* после обработки мутагеном в зависимости от его концентрации в цитратном и фосфатном буферах

Fig. 2. Viable cell titer of bacteria *C. acetobutylicum* upon mutagen treatment as a function of its concentration in phosphate and citrate buffers

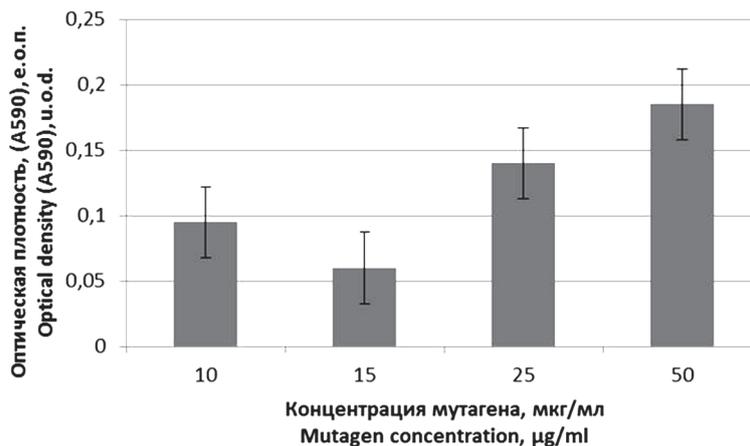


Рис. 3. Влияние концентрации мутагена на накопление биомассы *C. acetobutylicum* через 24 ч культивирования в среде MSS с бутанолом

Fig. 3. Effect of mutagen concentration of accumulation of *C. acetobutylicum* biomass after 24 h fermentation in MSS medium with butanol

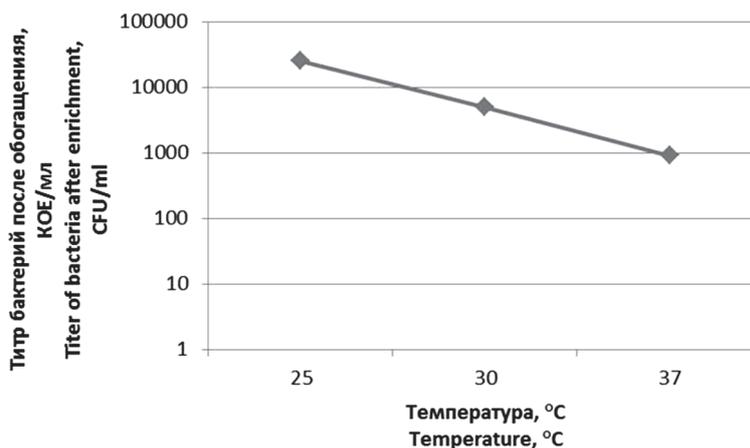


Рис. 4. Влияние температурного фактора на выход мутантов *C. acetobutylicum*, устойчивых к бутанолу

Fig. 4. Effect of temperature on yield of *C. acetobutylicum* mutants resistant to butanol

выживаемости (рис. 3). Таким образом, использованный в эксперименте метод обогащения позволил не только выбрать оптимальную буферную систему и концентрацию мутагена (цитратный буфер, pH 5,5, концентрация мутагена 50 мкг/мл), но и увеличить выход мутантного потомства, устойчивого к бутанолу.

На следующем этапе анализировали влияние температурного фактора на эффективность мутагенеза. Для этого бактериальную суспензию обрабатывали N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином в концентрации 50 мкг/мл в цитратном буфере при температуре 25; 30 и 37 °C и высевали на агаризованную среду MSS, содержащую бутанол в концентрации 2,5 и 3,0 %. Как видно из данных, приведенных на рис. 4, наибольший выход мутантов *C. acetobutylicum* S1, устойчивых к бутанолу, наблюдали при температуре 25 °C. При других испытанных температурных режимах выход мутантных бактерий снижался в 10–15 раз.

Таким образом, показано, что наибольший выход мутантов *C. acetobutylicum* S1 наблюдается при их обработке N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином в концентрации 50 мкг/мл в цитратном буфере в течение 60 мин при 25 °C.

Отбор мутантов *C. acetobutylicum* S1, устойчивых к бутанолу, осуществляли в среде MSS, содержащей 2 % бутанола или 500 ммоль/л NaCl. При этом предполагали, что присутствие в среде культивирования высокой концентрации NaCl обеспечит отбор устойчивых к осмотическому

шоку мутантов, которые, согласно литературным данным, характеризуются значительными изменениями состава их мембраны, повышенной толерантностью к бутанолу и способностью продуцировать больше сольвентов [11]. Следует отметить, что любые химические соединения, нарушающие физиологические параметры роста бактерий, являются стрессовыми и могут быть использованы в качестве селективных для отбора мутантов. Поскольку бактерии *C. acetobutylicum* синтезируют целый спектр биологически активных химических соединений (например, уксусную и масляную кислоты, бутанол, этанол, ацетон) и способны противостоять их действию, можно предположить наличие в их геноме систем, обеспечивающих выживание клеток при воздействии на них стрессовых факторов. Такой запас прочности в целом характерен для живых организмов, а для синтезирующих их бактерий он жизненно необходим.

Поскольку в задачу настоящего этапа работы входил отбор бактерий *C. acetobutylicum*, устойчивых к бутанолу, все полученные с использованием метода реплик мутанты были проанализированы на их способность к росту на средах, содержащих различные концентрации бутанола (2; 2,5 и 3 %). Установлено, что из 200 испытанных клонов 26 росли на среде с 3 % бутанола, при этом 22 из них по продукции бутанола не уступали или незначительно превосходили исходный штамм *C. acetobutylicum* S1 и только 4 клон (l, m, n, 3E) характеризовались более низкой продуцирующей способностью (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. **Продуцирующая способность мутантных вариантов *C. acetobutylicum***

Table 1. **Productive capacity of *C. acetobutylicum* mutant variants**

Мутант	Среда для обогащения мутантов	Продукты ацетобутилового брожения, г/л				
		Этанол	Ацетон	Бутанол	Общее к-во растворителей	Масляная кислота
Б4–1	MSS + бутанол (2 %)	1,23	4,76	14,42	20,41	–
7		0,86	3,74	12,20	16,80	–
1G		1,70	5,63	13,57	20,90	–
2G		0,44	4,14	11,32	15,90	–
9G		0,76	5,06	11,94	17,76	–
14G		0,75	5,91	11,25	17,91	–
15G		1,33	5,41	14,31	21,05	–
21G		1,95	5,73	14,13	21,81	–
24G		1,46	6,14	14,73	22,33	–
1H		2,38	5,70	14,19	22,27	–
2H		0,64	3,16	10,80	14,60	0,57
5H		1,53	5,26	15,08	21,87	–
6H		0,86	4,30	10,05	15,21	0,46
7H		1,60	4,91	13,58	20,09	–
8H		1,40	6,06	11,84	19,30	–
9H		1,63	6,21	13,30	21,14	–
a		1,22	6,17	13,50	20,89	–
c		1,06	5,25	13,85	20,16	0,23
e		0,77	3,07	12,07	15,91	–
k		0,76	6,22	14,76	21,74	–
l	0,08	0,81	1,36	2,25	3,18	
m	MSS + NaCl (500 ммоль/л)	–	1,04	0,25	1,29	10,60
n		–	0,71	0,18	0,89	6,99
1E		1,22	5,79	13,74	20,75	–
2E		1,43	6,23	13,61	21,27	–
3E		0,08	0,87	1,49	2,44	5,77
<i>C. acetobutylicum</i> S1 (контроль)		1,75	3,84	12,56	18,15	–

Отобранные бутанолрезистентные клоны с высокой продуцирующей способностью были проверены на стабильность наследования мутантного фенотипа путем их последовательного пересева на селективные среды, содержащие 2, 2,5 и 3 % бутанола (три пассажа). В результате установлено стабильное наследование признака устойчивости к бутанолу в концентрации 2,5 % для 6 высокоактивных мутантных вариантов (1E, 2E, 15G, 24G, 5H, k). Отмечаемая у большинства исследованных мутантов утрата способности наследовать признак устойчивости к бутанолу может быть обусловлена присутствием в бактериальных популяциях различных морфотипов, отличающихся скоростью роста.

Известно, что увеличение количества насыщенных жирных кислот обеспечивает стабилизацию мембранных структур и уменьшает их проницаемость для бутанола [12]. В этой связи представлялось важным определить состав жирных кислот у отобранных мутантов *C. acetobutylicum* S1, способных расти в присутствии 2,5 % бутанола.

Результаты изучения методом хромато-масс-спектрометрии качественного и количественного состава жирных кислот показали, что мутанты отличаются от исходного штамма *C. acetobutylicum* S1 по жирнокислотному составу цитоплазматической мембраны. В частности, для варианта *C. acetobutylicum* 5H выявлено наличие 2-гексилциклопропаноктановой насыщенной жирной кислоты, которая не обнаруживалась у штамма *C. acetobutylicum* S1. Согласно литературным данным, увеличение устойчивости бактерий к растворителям может быть обусловлено изменениями в генах, детерминирующих синтез соединений, входящих в состав клеточных мембран. Так, показано, что введение гена *cfal*, детерминирующего образование циклопропановой кислоты, повышает устойчивость генетически модифицированных бактерий *C. acetobutylicum* к бутанолу [13]. Некоторые различия были характерны и для остальных компонентов клеточной мембраны, что, однако, не приводило к изменению соотношения насыщенных кислот к ненасыщенным (S/U-коэффициента). Напротив, зарегистрированное у мутанта *C. acetobutylicum* 24G увеличение в мембране ненасыщенных жирных кислот вызывало достоверное уменьшение коэффициента S/U (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Жирнокислотный состав липидов клеточных мембран исходного штамма и мутантных вариантов *C. acetobutylicum*, %

Table 2. Lipid fatty acid composition of cell membranes of parent strain and mutant variants of *C. acetobutylicum*, %

Жирная кислота	<i>C. acetobutylicum</i> 24G	<i>C. acetobutylicum</i> 5H	<i>C. acetobutylicum</i> 1E	<i>C. acetobutylicum</i> S1
Насыщенные жирные кислоты				
Миристиновая C <sub>14:0</sub>	2,79	4,56	4,89	5,13
Пальмитиновая C <sub>16:0</sub>	47,5	73,22	73,19	75,85
Стеариновая C <sub>18:0</sub>	3,43	5,84	9,12	4,55
Насыщенные жирные кислоты, содержащие циклопропановое кольцо				
Метил-9,10-метилен-октадекановая C <sub>19:0</sub>	3,73	6,60	7,29	6,28
2-Гексил- циклопропил-октановая C <sub>17:0</sub>	0,98	1,71	–	–
Ненасыщенные жирные кислоты				
Пальмитолеиновая C <sub>16:1</sub>	0,98	1,89	2,28	2,73
Линолевая C <sub>18:2</sub>	35,5	2,17	2,04	1,98
Олеиновая C <sub>18:1</sub>	5,07	3,99	3,7	3,48
S/U	1,4	11,4	11,78	11,21

Пр и м е ч а н и е. S/U – соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот.

**Заключение.** С помощью оптимизированного метода химического мутагенеза (обработка N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином в концентрации 50 мкг/мл в цитратном буфере (pH 5,5) в течение 60 мин при 25 °C) отобраны мутанты бактерий *C. acetobutylicum* S1, стабильно наследующие признак устойчивости к бутанолу в концентрации 2,5 %. Установлены различия в составе жирных кислот в цитоплазматической мембране между мутантами и исходным штаммом *C. acetobutylicum* S1. В частности, бутанолрезистентность варианта *C. acetobutylicum* 5H может быть обусловлена наличием в составе мембраны 2-гексилциклопропаноктановой насыщенной жирной кислоты, которая не обнаруживалась в мембране исходных бактерий *C. acetobutylicum* S1.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Szulczyk, K. R. Which is a better transportation fuel – butanol or ethanol / K. R. Szulczyk // *Intern. J. of Energy Environment*. – 2010. – Vol. 1, N 1. – P. 501–512.
2. Bowles, L. K. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum* / L. K. Bowles, W. L. Ellefson // *Appl. and Environmental Microbiol.* – 1985. – Vol. 50, N 5. – P. 1165–1170.
3. Nicolaou, S. A. A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: from biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation / S. A. Nicolaou, S. M. Gaida, E. T. Papoutsakis // *Metabolic Engineering*. – 2010. – Vol. 12. – P. 307–331.
4. Moreira, A. R. Butanol toxicity in the butylic fermentation / A. R. Moreira, D. C. Ulmer, J. C. Linden // *Biotechnol. Bioeng. Symp.* – 1981. – Vol. 11. – P. 567–579.
5. Мэдди, Э. Биохимические исследования мембран / Э. Мэдди. – М.: Мир, 1979. – 300 с.
6. Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms / T. Ezeji [et al.] // *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* – 2010. – Vol. 85, N 6. – P. 1697–1712.
7. Investigation of factors determining stress resistance of solventogenic bacteria strain *Clostridium acetobutylicum* derived by adaptive selection method / A. V. Balotnik [et al.] // 6th Congress of European Microbiologists (FEMS Congress), Maastricht, 2015. – P. 2302.
8. Mandell, J. D. Genetic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Neurospora crassa* / J. D. Mandell, J. A. Greenberg // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1960. – Vol. 3. – P. 575–577.
9. Bowring, S. N. Mutagenesis of *Clostridium acetobutylicum* / S. N. Bowring, J. G. Morris // *J. Appl. Bacteriol.* – 1985. – Vol. 58. – P. 577–584.
10. Adelberg, E. A. Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12 / E. A. Adelberg, M. Mandel, G. C. C. Chen // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1965. – Vol. 18. – P. 788–795.
11. Salt selection of microbial mutants to increase bioproduct tolerance, titer, or osmotic shock tolerance: pat. US8372598, USA: IPC C12P1/04, C12Q1/02, C12N1/20, C12P21/06 / Jeanette M. Mucha; publ. date: 12.02.2013.
12. Vollherbst-Schneck, K. Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 / K. Vollherbst-Schneck, J. A. Sands, B. S. Montenecourt // *Appl. Environmental and Microbiol.* – 1984. – Vol. 47, N 1. – P. 193–194.
13. Grogan, D. W. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria / D. W. Grogan, J. E. Jr. Cronan // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1997. – Vol. 61, N 4. – P. 429–441.

### References

1. Szulczyk, K. R. (2010), “Which is a better transportation fuel – butanol or ethanol”, *International Journal of Energy Environment*, vol. 1, no. 1, pp. 501–512.
2. Bowles, L. K. and Ellefson, W. L. (1985), “Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*”, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 50, no. 5, pp. 1165–1170.
3. Nicolaou, S. A., Gaida, S. M. and Papoutsakis, E. T. (2010), “A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: from biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation”, *Metabolic Engineering*, vol. 12, pp. 307–331.
4. Moreira, A. R., Ulmer D. C. and Linden, J. C. (1981), “Butanol toxicity in the butylic fermentation”, *Biotechnology Bioengineering Symposium*, vol. 11, pp. 567–579.
5. Maddy, A. (1979), “Biochemical analysis of membranes”, Mir, Moscow, RU.
6. Ezeji, T., Milne, C., Price, N. D. and Blaschek, H. P. (2010), “Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 85, no. 6, pp. 1697–1712.
7. Balotnik, A., Litvinovich N. E., Kirpicheva T. E., Kolomiets E. I. and Titok, M. A. (2015), “Investigation of factors determining stress resistance of solventogenic bacteria strain *Clostridium acetobutylicum* derived by adaptive selection method”, *6th Congress of European Microbiologists (FEMS Congress)*, Maastricht, AN, 7–11 June 2015, p. 2302.
8. Mandell, J. D. and Greenberg, J. A. (1960), “Genetic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Neurospora*”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 3, pp. 575–577.
9. Bowring, S. N. and Morris, J. G. (1985), “Mutagenesis of *Clostridium acetobutylicum*”, *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 58, pp. 577–584.
10. Adelberg, E. A., Mandel, M. and Chen, G. C. C. (1965), “Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12”, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, vol. 18, pp. 788–795.
11. Mucha, Jeanette M. (2013), *Salt selection of microbial mutants to increase bioproduct tolerance, titer, or osmotic shock tolerance*, USA: IPC C12P1/04, C12Q1/02, C12N1/20, C12P21/06, Pat. US8372598 B2.
12. Vollherbst-Schneck, K., Sands, J. A. and Montenecourt, B. S. (1984), “Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824”, *Applied Environmental and Microbiology*, vol. 47, no. 1, pp. 193–194.
13. Grogan, D. W. and Cronan, J. E. Jr. (1997), “Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 61, no. 4, pp. 429–441.

### Информация об авторах

*Болотник Елена Валерьевна* – канд. биол. наук, заместитель директора. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: bolotnik\_allena@mbio.bas-net.by

*Черешнев Алексей Александрович* – магистрант. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: chereshnev.biochem@gmail.com

*Титок Марина Алексеевна* – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: litvinovich@mbio.bas-net.by

*Коломиец Эмилия Ивановна* – чл.-кор., 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

### Для цитирования

Получение мутантов *Clostridium acetobutylicum* S1, устойчивых к бутанолу / Е. В. Болотник [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 1. – С. 30–38.

### Information about the authors

*Bolotnik Elena Valer'evna* – Ph. D. (Biol.), Deputy Director. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bolotnik\_allena@mbio.bas-net.by

*Chereshnev Alexei Alexandrovich* – Graduate student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: chereshnev.biochem@gmail.com

*Titok Marina Alexeevna* – D. Sc. (Biol.), Professor, Chief researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: litvinovich@mbio.bas-net.by

*Kolomiets Emiliya Ivanovna* – Corresponding Member, 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 (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by

### For citation

Bolotnik, E. V., Chereshnev, A. A., Titok, M. A. and Kolomiets, E. I. (2017), “Selection of butanol-resistant mutants of *Clostridium acetobutylicum* S1”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, no. 1, pp. 30–38.

Е. А. Клементьева<sup>1</sup>, С. В. Овсянникова<sup>2</sup>, А. Н. Никитин<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Республика Беларусь<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь**ДИНАМИКА ИЗОТОПОВ <sup>210</sup>Pb И <sup>210</sup>Po В ЕСТЕСТВЕННЫХ  
ЛУГОВЫХ ЭКОСИСТЕМАХ И АГРОФИТОЦЕНОЗАХ  
С РЕГУЛЯРНЫМ ВНЕСЕНИЕМ ФОСФОРНЫХ УДОБРЕНИЙ**

Изучено распределение радионуклидов <sup>210</sup>Pb и <sup>210</sup>Po в почвах естественных луговых экосистем и в пахотных горизонтах почв агроэкосистем юго-восточного региона Республики Беларусь. Выявлено отличие между содержанием радионуклидов в верхнем 0–5-сантиметровом слое органогенного горизонта и в нижележащих слоях почв естественных луговых экосистем. Характер распределения <sup>210</sup>Pb и <sup>210</sup>Po по вертикальным профилям луговых почв позволяет предположить, что поступление радионуклидов в почвенный покров в основном обусловлено аэрозольными выпадениями из атмосферы и их биогенным накоплением в верхней части органогенного горизонта. Показано, что в пахотном горизонте сельскохозяйственных почв, в которые регулярно вносятся минеральные удобрения, содержание <sup>210</sup>Pb и <sup>210</sup>Po линейно зависит от концентрации подвижного фосфора. Уменьшение кислотности почвенной среды способствует снижению биологической доступности радионуклидов <sup>210</sup>Pb и <sup>210</sup>Po и их накоплению в растительной продукции. Определены коэффициенты перехода <sup>210</sup>Pb и <sup>210</sup>Po в овощные культуры, широко распространенные на территории Беларуси. Установлено, что коэффициенты перехода <sup>210</sup>Pb и <sup>210</sup>Po возрастают в ряду овощных культур морковь – капуста и для <sup>210</sup>Po они вдвое выше, чем для <sup>210</sup>Pb.

*Ключевые слова:* радионуклиды <sup>210</sup>Pb и <sup>210</sup>Po, почва, овощные культуры.

E. A. Klementjeva<sup>1</sup>, S. V. Ovsiannikova<sup>2</sup>, A. N. Nikitin<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus<sup>2</sup>Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus**DYNAMICS OF ISOTOPES <sup>210</sup>Pb AND <sup>210</sup>Po IN NATURAL MEADOW ECOSYSTEMS  
AND AGROPHYTOCENOSES WITH THE REGULAR APPLICATION OF PHOSPHORUS FERTILIZERS**

Distribution of <sup>210</sup>Pb and <sup>210</sup>Po radionuclides in the soils of natural meadow ecosystems and in the arable soil horizons of agroecosystems of the south-eastern region of the Republic of Belarus has been investigated. The difference between the radionuclides content in the upper 0–5-cm layers of organic horizons and in the underlying layers of soils of natural meadow ecosystems has been revealed. The distribution of <sup>210</sup>Pb and <sup>210</sup>Po along the vertical profiles of meadow soils allows assuming that the intake of radionuclides in to soil cover is mainly due to aerosol deposition from atmosphere and their biogenic accumulation in the upper part of the organic horizons. It was shown that in arable horizon of agricultural soils, which are regularly fertilized, content of <sup>210</sup>Pb and <sup>210</sup>Po depends linearly on concentration of mobile phosphorus. Reducing the acidity of soil medium promotes to the reduction of <sup>210</sup>Pb and <sup>210</sup>Po bioavailability and their accumulation in vegetative production. The transfer factors of <sup>210</sup>Pb and <sup>210</sup>Po for vegetables, which are widespread on the territory of Belarus, were determined. It was established that the transfer factors of <sup>210</sup>Pb and <sup>210</sup>Po are increased in the next order: carrot – potato – cabbage and those for <sup>210</sup>Po were twice as for <sup>210</sup>Pb.

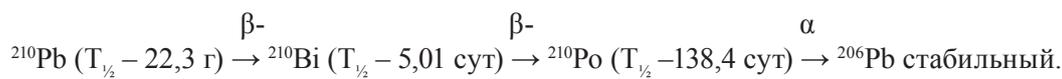
*Keywords:* <sup>210</sup>Pb and <sup>210</sup>Po radionuclides, soil, vegetables.

**Введение.** Радионуклиды <sup>210</sup>Pb и <sup>210</sup>Po, являющиеся промежуточными членами радиоактивного ряда <sup>238</sup>U, широко представлены в наземных экосистемах. Они поступают в почву с аэрозольными частицами в результате радиоактивного распада повсеместно выделяющегося в атмосферу газообразного <sup>222</sup>Rn и могут концентрироваться на участках с повышенной интенсивностью радоновых потоков. Помимо природных источников эти радионуклиды поступают в наземные экосистемы из техногенных источников: при сжигании ископаемого топлива, промышленной переработке урановых, фосфатных и свинцовых руд, использовании тетраэтилсвинца для автомобильных двигателей [1].

Интерес к радионуклидам  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  в 40–50-е годы XIX в. был связан с развитием ядерной физики и осознанием возможной угрозы мировой ядерной катастрофы. Практически во всех крупных ядерных центрах СССР, США и Европы начали действовать исследовательские и клинические подразделения, где специалисты различных дисциплин изучали воздействие ионизирующего излучения на биологические объекты. В этот же период были развернуты исследования по изучению радионуклидов и процессов их переноса в биосфере, обусловленные в первую очередь масштабными испытаниями ядерного оружия [2]. Особый интерес к  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  связан с их высокой радиотоксичностью, способностью накапливаться в некоторых пищевых продуктах, таких как морепродукты, мясо северных оленей и карibu, и существенным их вкладом (до 35 %) в общую дозу внутреннего облучения человека, обусловленную поступлением в организм естественных радионуклидов. Высокая радиотоксичность и заметный вклад  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  в дозу облучения человека стимулировали исследования по биокинетике и биологическим эффектам радионуклидов [1, 3, 4].

В последние годы в научной литературе все большее внимание уделяется изучению состояния и миграции радионуклидов  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  в почве как основном элементе наземных экосистем, от которого существенно зависит перераспределение радионуклидов между компонентами окружающей среды. Развитие промышленного производства и химизация земледелия неизбежно ведут к увеличению концентрации радионуклидов в почвенном покрове. Это происходит в результате выноса и распространения радионуклидов, содержащихся в промышленных отходах и минеральных удобрениях, в том числе производимых из фосфатов [1]. Присутствующие в окружающей среде радионуклиды свинца и полония представлены относительно долгоживущими  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$ , а так же короткоживущими  $^{211,212,214}\text{Pb}$  и  $^{212,214,215,216,218}\text{Po}$  [5].

Радионуклиды  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  связаны цепочкой последовательных ядерных превращений:



В результате распада  $^{210}\text{Pb}$ , сопровождающегося испусканием мягкого бета-излучения с максимальной энергией ( $E_{\beta_{\max}} = 0,635 \text{ МэВ}$ ) и низкоэнергетических гамма-квантов ( $E_{\gamma} = 0,0465 \text{ МэВ}$ ), образуется бета-излучающий  $^{210}\text{Bi}$  ( $E_{\beta_{\max}} = 1,16 \text{ МэВ}$ ), который при последующем бета-распаде превращается в альфа-излучающий  $^{210}\text{Po}$  ( $E_{\alpha} = 5,720 \text{ МэВ}$ ). Лишь незначительная часть ядер  $^{210}\text{Po}$  ( $1,7 \cdot 10^{-6}$ ) распадается с испусканием гамма-квантов с энергией  $0,803 \text{ МэВ}$  [5].

Среди естественных радионуклидов  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  представляют наибольшую биологическую опасность.  $^{210}\text{Pb}$  является одним из радиоактивных изотопов свинца – остеотропного химического элемента, который активно участвует в обменных процессах и концентрируется в костных тканях. В результате распада  $^{210}\text{Pb}$  в местах его локализации происходит накопление бета-излучающего  $^{210}\text{Bi}$  и альфа-излучающего  $^{210}\text{Po}$ .

Биологический период полувыведения  $^{210}\text{Pb}$  из скелета составляет около 27 лет. Повышенное содержание этого радионуклида в организме человека может приводить к повреждению костного мозга, печени, почек, злокачественным новообразованиям.

Радиоактивный полоний способен проникать в организм человека через кожные покровы, особенно поврежденные. При ингаляционном поступлении  $^{210}\text{Po}$  надолго задерживается в легочных тканях. В результате примерно 20 % радионуклида задерживается в легких и 75 % поступает в желудочно-кишечный тракт. При пероральном поступлении наибольшее содержание  $^{210}\text{Po}$  отмечалось в почках, крови и лимфоузлах. Биологический период полувыведения  $^{210}\text{Po}$  из организма человека составляет в среднем 80 сут. Накопление  $^{210}\text{Po}$  в организме может приводить к циррозам печени, нефросклерозам, гиперплазии, катарактам, опухолям органов желудочно-кишечного тракта, легких, почек, щитовидной железы [6].

Высокая биологическая токсичность радионуклидов  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  является причиной введения для них жестких санитарно-гигиенических нормативов (например, для воды –  $0,20$  и  $0,12 \text{ Бк/кг}$  соответственно) [7].

Исследования, проводившиеся в Республике Беларусь, в основном касались лишь материнского радионуклида  $^{238}\text{U}$  [8–10]. Дочерним продуктам распада, таким как  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$ , не уделялось

должного внимания. Однако из-за их повышенной миграционной способности, биологической аккумуляции, более высокой радиотоксичности эти продукты распада  $^{238}\text{U}$  представляют большую опасность, чем материнский радионуклид.

Цель настоящего исследования – изучение распределения радионуклидов  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  в почвенном покрове юго-восточного региона Беларуси, анализ факторов, влияющих на их накопление в почвах, и определение коэффициентов перехода радионуклидов из сельскохозяйственных почв в продукцию растениеводства.

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования служили образцы почв естественных луговых экосистем, а также сопряженные образцы растений и почв агроэкосистем. Отбор образцов осуществляли в 2011–2013 гг. на территории Гомельской области. Закладывали реперные площадки на участках, подвергавшихся агрохимической обработке, и отбирали на них хозяйственно полезные части овощных культур (морковь, картофель, капуста) и образцы почв, на которых они были выращены, в соответствии с методикой радиологического и агрохимического исследования [11]. Образцы почв естественных луговых экосистем отбирали послойно с шагом 5 см на глубину до 20 см от дневной поверхности почвы, образцы пахотных горизонтов почв отбирали буром Малькова на глубину 20 см (5 уколов на площадку).

Отобранные образцы почв тщательно перемешивали, просеивали через сито с диаметром отверстий 2 мм и высушивали на воздухе при температуре  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$  до постоянного веса, после чего по стандартным методикам оценивали их агрохимические характеристики [12, 13].

Растительные образцы перед кулинарной обработкой и употреблением в пищу очищали, снимали кожуру при необходимости (с капусты удаляли внешние загрязненные листья) и тщательно промывали. После этого их высушивали на воздухе до постоянного веса. Для анализа использовали только съедобные части.

Методики определения содержания радионуклидов  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  в образцах почв и растений основаны на выделении радионуклидов из анализируемых проб и регистрации их ионизирующих излучений. Активность  $^{210}\text{Po}$  в образцах устанавливали по альфа-излучению радионуклида после его предварительной радиохимической очистки от мешающих альфа-излучателей и макрокомпонентов. Воздушно-сухие образцы почв и растительности кипятили со смесью концентрированных растворов азотной кислоты и пероксида водорода, выпаривая растворы досуха. Обработку повторяли несколько раз. Полученные нитраты переводили в хлориды, приливая небольшими порциями концентрированную соляную кислоту и выпаривая раствор. Процесс повторяли 3–4 раза. Твердый остаток растворяли в 1 моль/дм<sup>3</sup> HCl, а полученный раствор фильтровали через бумажный фильтр «синяя лента». К фильтрату добавляли аскорбиновую кислоту до обесцвечивания раствора. При этом формировались прочные комплексы ионов железа (III) с аскорбиновой кислотой. Затем в раствор помещали полированный медный диск, на котором осаждался полоний. Излучение  $^{210}\text{Po}$  регистрировали альфа-спектрометром AlphaAnalyst фирмы Canberra, оснащенным полупроводниковыми детекторами А 450-20 АМ AlphaPips. Эффективность регистрации альфа-излучения радионуклидов составляла 30 %, минимальная детектируемая активность (МДА) – 0,001 Бк на пробу. Результаты измерений обрабатывали с помощью пакета прикладных программ Apex–Alpha V 1.2 фирмы Canberra.

Содержание  $^{210}\text{Pb}$  в анализируемых пробах оценивали по активности дочернего  $^{210}\text{Bi}$  после отделения висмута от свинца. Радиоактивный свинец выделяли из раствора путем совместного осаждения с нитратом стабильного свинца  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , который вводили в исходную пробу и использовали в качестве носителя радионуклида и для определения химического выхода элемента в ходе анализа. Не менее чем через 20–25 сут в полученном препарате с помощью радиометра LB-770PC (Berthold, Германия) измеряли активность накопленного  $^{210}\text{Bi}$ , по которой оценивали активность  $^{210}\text{Pb}$ . МДА  $^{210}\text{Bi}$  составляла 0,033 Бк на пробу.

Методики определения содержания радионуклидов в образцах почв и растительности контролировали по результатам анализа стандартных проб МАГАТЭ с известным содержанием радионуклидов (IAEA-327, IAEA-437, IAEA-446, IAEA-447, IAEA-434, IAEA-444, IAEA-385).

**Результаты и их обсуждение.** В юго-восточном регионе Беларуси распространены преимущественно дерново-подзолистые супесчаные, песчаные и торфяно-болотные почвы. Местоположение участков и характеристики образцов 0–20-сантиметровых слоев почв приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Местоположение участков и характеристики почв

T a b l e 1. Location of sites and characteristics of soil

Участок	Географические координаты	Почва	pH <sub>KCl</sub>	ОК <sub>п</sub> , %	P <sub>2</sub> O <sub>5подв</sub> , мг/кг
<i>Естественные луговые экосистемы</i>					
Бардино Гомельского района	592920,8" с. ш. 30°	Дерново-подзолистая песчаная	6,0	2,46 ± 0,21	918 ± 68
Тартак Лельчицкого района	51°41'47,7" с. ш. 28°04'35,3" в. д.	Аллювиальная дерново-глеевая супесчаная	5,2	2,86 ± 0,24	1 766 ± 96
Боровое Лельчицкого района	51°42'51,3" с. ш. 28°04'48" в. д.	Аллювиальная торфянисто-глеевая	5,5	4,43 ± 0,27	1 352 ± 82
Стодоличи Лельчицкого района	51°44'25,6" с. ш. 28°29'51,5" в. д.	Заболоченная дерново-подзолистая песчаная	5,3	1,18 ± 0,14	1 218 ± 76
Чемерно Лельчицкого района	51°45'24,7" с. ш. 28°18'29,1" в. д.	Аллювиальная дерново-глеевая супесчаная	5,5	3,13 ± 0,25	933 ± 57
<i>Агрэкосистемы (пашня)</i>					
Урицкое Гомельского района	52°28'07,1" с. ш. 30°48'08,9" в. д.	Дерново-подзолистая супесчаная	5,6	2,74 ± 0,22	1 622 ± 97
Красное Гомельского района	52°27'51,1" с. ш. 30°54'53,1" в. д.	Дерново-подзолистая супесчаная	5,8	2,64 ± 0,23	829 ± 54
Пролетарий Гомельского района	52°28'42,3" с. ш. 30°56'33,8" в. д.	Дерново-подзолистая супесчаная	5,5	2,59 ± 0,24	769,3 ± 47
Стреличево Хойникского района	51°48'29,0" с. ш. 29°55'18,1" в. д.	Дерново-подзолистая супесчаная	6,2	2,67 ± 0,23	498 ± 37
Судково Хойникского района	51°52'12,6" с. ш. 29°53'11,3" в. д.	Дерново-подзолистая супесчаная	6,4	2,91 ± 0,24	891 ± 56
Новоселки Хойникского района	51°49'13,3" с. ш. 29°52'01,3" в. д.	Дерново-подзолистая супесчаная	6,4	3,92 ± 0,30	688 ± 44
Дворище Хойникского района	51°51'00,7" с. ш. 29°55'00,1" в. д.	Дерново-подзолистая супесчаная	6,6	2,52 ± 0,22	532 ± 36

П р и м е ч а н и е. ОК<sub>п</sub> – общее содержание органических компонентов в образцах почвы, % от массы абсолютно сухого вещества; pH<sub>KCl</sub> – pH почвенной суспензии в растворе 1 моль/дм<sup>3</sup> KCl; P<sub>2</sub>O<sub>5подв</sub> – содержание подвижного фосфора в почвенных образцах в расчете на абсолютно сухое вещество.

Результаты определения удельных активностей по <sup>210</sup>Pb и <sup>210</sup>Po образцов почв, отобранных с разной глубины почвенных профилей естественных луговых экосистем, приведены на рис. 1.

Как видно из полученных данных, максимальные удельные активности были свойственны верхним 0–5-сантиметровым слоям органогенных горизонтов почв, а в нижележащих почвенных слоях они резко снижались. Установленное соотношение активностей радионуклидов (<sup>210</sup>Po/<sup>210</sup>Pb) в образцах 0–5-сантиметровых слоев почв составляло 0,24–0,31, что хорошо согласовалось с данными работы [14], где приведены аналогичные соотношения радионуклидов в атмосферных выпадениях (в среднем – 0,3). В зависимости от глубины соотношение радионуклидов изменялось до практически равновесных значений (в пределах аналитической неопределенности).

Полученные данные по относительному вертикальному распределению радионуклидов в почвах (рис. 2) показали, что в верхнем 0–5-сантиметровом слое содержится 77–83 % <sup>210</sup>Pb и 52–68 % <sup>210</sup>Po от общего запаса соответствующего радионуклида в 0–20-сантиметровом почвенном слое. Существенное сокращение содержания радионуклидов при переходе от верхнего к более глубоко залегающим почвенным слоям могло быть вызвано их поступлением в почву в составе аэрозольных выпадений и в результате биогенного накопления в верхней части органогенного горизонта. Содержащиеся в почве радионуклиды <sup>210</sup>Pb и <sup>210</sup>Po могут быть природного происхождения, являясь дочерними продуктами распада <sup>238</sup>U, а также поступать из антропогенных источников. Повышенное содержание <sup>210</sup>Pb и <sup>210</sup>Po в верхней части почвенного профиля свидетельствует о том, что органогенный горизонт почвы обладает свойствами сорбционного барьера, препятствующего продвижению радионуклидов вглубь почвы.

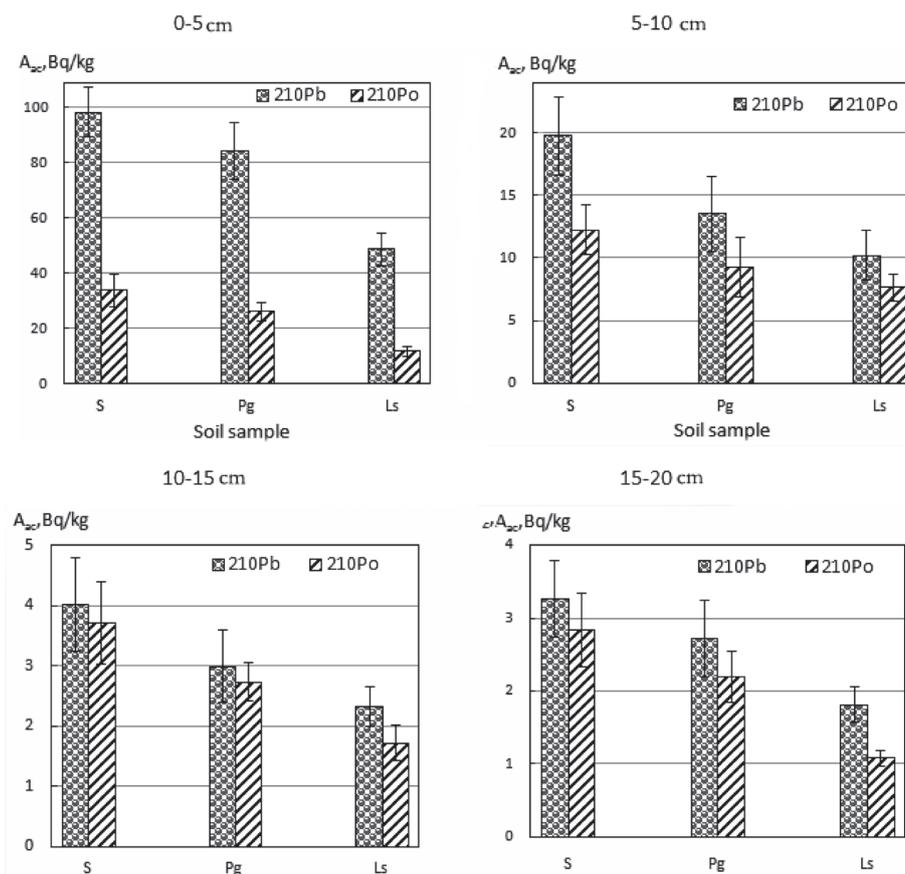


Рис. 1. Удельные активности по  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  ( $A_{уд}$ , Бк/кг абсолютно сухой почвы) различных слоев почв естественных луговых экосистем: дерново-подзолистой песчаной (S), торфянисто-глеевой (Pg), аллювиальной дерново-глеевой супесчаной (Ls)

Fig. 1. Activity concentrations of  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  ( $A_{уд}$ , Bq/kg of absolute dry soil) in different layers of soils of natural meadow ecosystems: sod podsolic sandy (S), peaty-gley (Pg), alluvial sod-gley loamy-sand (Ls)

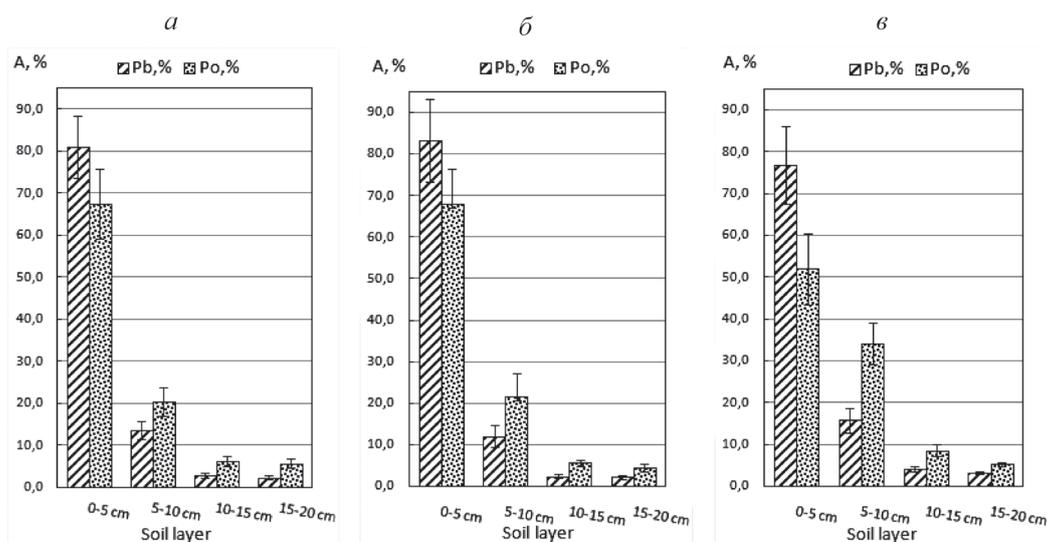


Рис. 2. Изменение относительного содержания  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  (A, %) по вертикальным профилям почв естественных луговых экосистем: дерново-подзолистой песчаной (a), торфянисто-глеевой (b), аллювиальной дерново-глеевой супесчаной (c)

Fig. 2. The change in the relative content of  $^{210}\text{Pb}$  and  $^{210}\text{Po}$  (A, %) along the vertical soil profiles of the natural meadow ecosystems: sod podsolic sandy (a), peaty-gley (b), alluvial sod-gley loamy-sand (c)

На исследованных участках пахотных почв широко использовались фосфорные удобрения. Содержащиеся в них естественные радионуклиды могут мигрировать по цепи «удобрение – почва – растение – рацион человека» и служить дополнительным источником внутреннего облучения. Природные фосфориты, используемые для производства фосфорных удобрений, как правило, отличаются повышенной концентрацией радионуклидов урановых рядов. Концентрация радионуклидов урановых рядов в фосфорсодержащих удобрениях различных стран мира варьируется в пределах 70–2400 Бк/кг [15].

Длительное использование фосфорных удобрений повышает концентрацию радионуклидов в почвах. В зависимости от вида фосфорного удобрения, т. е. от технологии переработки фосфорсодержащего сырья, радионуклиды могут поступать в почву в различных химических формах и существенно отличаться по способности поступать в почвенные растворы и усваиваться растениями. Так, в фосфоритной муке относительное количество содержащихся в удобрении естественных радионуклидов в подвижной (условно биологически доступной) форме близко к соответствующим показателям в неудобренных почвах. В аммофосе, напротив, относительное количество естественных радионуклидов в подвижной форме выше, чем в неудобренных почвах. При этом максимальной подвижностью в почве отличаются изотопы урана, а минимальной – изотопы тория. Внесение удобрений в почву может изменять физико-химические формы нахождения радионуклидов, существенно увеличивая содержание биологически доступных растениям радионуклидов  $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Pb}$ ,  $^{210}\text{Po}$  [15].

Среднее содержание  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  в изученных образцах пахотных горизонтов дерново-подзолистых супесчаных почв приведено в табл. 2. Удельная активность  $^{210}\text{Pb}$  в пахотных горизонтах изученных дерново-подзолистых супесчаных почв составляет в среднем  $(50,6 \pm 10,8)$  Бк/кг, а  $^{210}\text{Po}$  –  $(15,3 \pm 3,2)$  Бк/кг абсолютно сухого вещества при доверительной вероятности 95 % и условии подчинения полученных значений распределению Стьюдента.

Т а б л и ц а 2. Содержание  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  в пахотных горизонтах дерново-подзолистых супесчаных почв

Table 2. Content of  $^{210}\text{Pb}$  and  $^{210}\text{Po}$  in the sod-podsolic loamy-sand soils

Радионуклид	Удельная активность почвы, Бк/кг		
	Среднее значение	Стандартное отклонение	Диапазон изменения
$^{210}\text{Pb}$	50,6	11,7	31,8 – 68,1
$^{210}\text{Po}$	15,3	3,4	11,4 – 21,5

Выявлены тесные связи между удельными активностями пахотных горизонтов почв по рассматриваемым радионуклидам, концентрацией в почве подвижного фосфора и кислотностью ( $\text{pH}_{\text{КСЛ}}$ ) почвенной среды (рис. 3). Из полученных данных следует, что содержание  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  в пахотном горизонте почв линейно возрастает с увеличением концентрации в почве подвижного фосфора и сокращается при увеличении  $\text{pH}$  почвенной среды. Тесная связь между удельными активностями пахотных горизонтов почв по  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  и концентрацией в почве подвижного фосфора указывает на то, что внесенное в почву фосфорное удобрение является важным источником этих радионуклидов.

Почва является одним из основных источников поступления  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  в растения, а соответственно, и в рацион животных и человека. По результатам радиохимического анализа растительных образцов и почв, на которых они выращены, определены коэффициенты перехода радионуклидов  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  из почвы в овощную продукцию в условиях сельскохозяйственного производства. Проведен анализ съедобных частей основных видов сельскохозяйственных культур, таких как картофель, капуста и морковь.

Установлено, что активность  $^{210}\text{Pb}$  в пахотном горизонте изученных сельскохозяйственных почв в расчете на единичную площадь варьировала в интервале от 4,3 до 9,2 кБк/м<sup>2</sup>, а  $^{210}\text{Po}$  – от 1,3 до 2,7 кБк/м<sup>2</sup>. Удельная активность по  $^{210}\text{Pb}$  моркови в сыром виде составила 14,4–23,9 (среднее – 17,8) мБк/кг, картофеля – 10,4–41,2 (среднее – 26,7), капусты – 34,0–48,6 (среднее – 38,8) мБк/кг. Удельная активность по  $^{210}\text{Po}$  составила соответственно 10,2–18,9 (среднее – 13,3) мБк/кг, 11,2–35,7

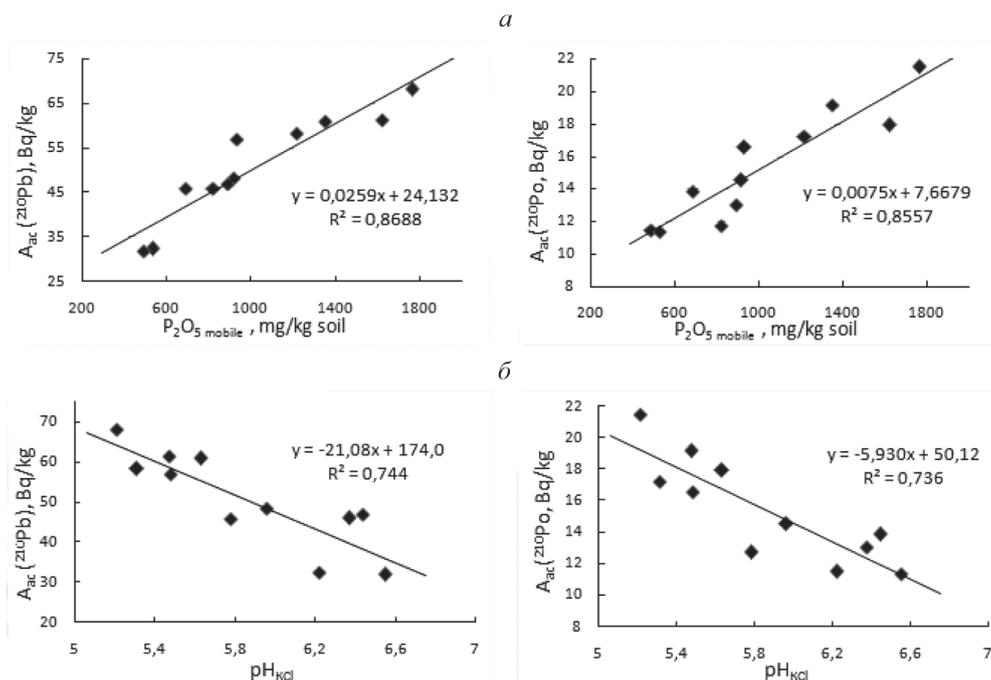


Рис. 3. Изменение удельных активностей по  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  пахотных горизонтов сельскохозяйственных почв в зависимости от концентрации подвижного фосфора (а) и  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  (б)

Fig. 3. The change in the activity concentrations of  $^{210}\text{Pb}$  and  $^{210}\text{Po}$  in the arable soil horizons depending on the concentration of mobile phosphorus (a) and  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  (b)

(среднее – 23,8) и 16,6–28,6 (среднее – 21,3) мБк/кг. Рассчитанные по установленным данным коэффициенты перехода радионуклидов из почвы в растительную продукцию приведены в табл. 3.

Из полученных результатов видно, что по биологической доступности  $^{210}\text{Po}$  примерно вдвое превосходит  $^{210}\text{Pb}$ , о чем свидетельствуют более высокие коэффициенты перехода  $^{210}\text{Po}$  из почвы в растительные образцы. При этом уменьшение кислотности (увеличение pH) почвенной среды способствовало сокращению поступления радионуклидов  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  в сельскохозяйственные культуры. Коэффициенты перехода радионуклидов в одни и те же виды растительной продукции уменьшались на 3–5 % при увеличении pH почвенной среды от 5,5 до 6,6.

Т а б л и ц а 3. Коэффициенты перехода  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  из дерново-подзолистой супесчаной почвы в сельскохозяйственные культуры

Table 3. The transfer factors of  $^{210}\text{Pb}$  and  $^{210}\text{Po}$  from sod-podsolic loamy-sand soil to the agricultural cultures

Культура (хозяйственно полезная часть растений)	Коэффициент перехода, $\times 10^6 \text{ м}^2/\text{кг}$			
	$^{210}\text{Pb}$		$^{210}\text{Po}$	
	Среднее значение	Диапазон значений	Среднее значение	Диапазон значений
Морковь (корнеплоды)	1,32	0,83–2,26	3,09	1,90–5,33
Картофель (клубни)	2,01	0,45–4,54	4,41	1,56–6,81
Капуста (кочаны)	2,99	1,56–5,33	5,14	2,63–7,45

В соответствии с величиной коэффициентов перехода радионуклидов из почвы в растительную продукцию биологическая доступность  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  сельскохозяйственным культурам возрастала в ряду морковь – картофель – капуста. Относительно более высокое накопление радионуклидов в съедобных частях капусты по сравнению с картофелем и морковью могло быть связано с более значительным вкладом внекорневого усвоения радионуклидов надземной частью растений в вегетационный период (за счет атмосферных выпадений, оседания частиц почвы после ветрового подъема), а также с интенсивной транслокацией радионуклидов в листостебельную часть растений (кочаны) при корневом поглощении радионуклидов из почвы.

**Заклучение.** В ходе исследований впервые установлено содержание радионуклидов  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  в почвах естественных луговых экосистем и пахотных горизонтах почв агроэкосистем юго-восточного региона Беларуси. Выявлено существенное отличие между содержанием радионуклидов в верхнем 0–5-сантиметровом слое органогенного горизонта и нижележащими слоями почв естественных луговых экосистем. Характер распределения  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  по вертикальным профилям луговых почв позволяет предположить, что поступление радионуклидов в почвенный покров в основном обусловлено аэрозольными выпадениями из атмосферы и их биогенным накоплением в верхней части органогенного горизонта. Показано, что в пахотном горизонте сельскохозяйственных почв, в которые регулярно вносятся минеральные удобрения, содержание  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  линейно зависит от концентрации подвижного фосфора. Уменьшение кислотности почвенной среды способствует снижению биологической доступности радионуклидов  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  и их накоплению в растительной продукции. Коэффициенты перехода радионуклидов в одни и те же виды растительной продукции меньше для почв с более высокими показателями pH. В соответствии с установленными коэффициентами перехода радионуклидов в хозяйственно полезные части сельскохозяйственных растений биологическая доступность  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  увеличивается в ряду морковь – картофель – капуста. При этом по биологической доступности  $^{210}\text{Po}$  превосходит  $^{210}\text{Pb}$ , о чем свидетельствуют более высокие коэффициенты перехода  $^{210}\text{Po}$  в соответствующие сельскохозяйственные культуры.

### Список использованных источников

1. The fractionation and determination procedures for the speciation of  $^{210}\text{Pb}$  and  $^{210}\text{Po}$  in soil samples / G. Jia [et al.] // *Analitica Chimica Acta*. – 2006. – Vol. 562. – P. 51–58.
2. Баранов, В. И. Содержание радиоактивных элементов в некоторых почвах СССР / В. И. Баранов, С. Г. Цейтлин // Докл. АН СССР. – 1941. – Т. 30, № 4. – С. 328–331.
3. Власов, В. К. Пример ситуационного радиологического анализа (инцидент с полонием-210) / В. К. Власов, Т. Б. Петрова, А. М. Афиногенов // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2008. – Т. 49, № 4. – С. 274–281.
4. Полониевая версия смерти Ясира Арафата: результаты российских исследований / В. В. Уйба [и др.] // Мед. радиол. и радиац. безопасность. – 2015. – Т. 60, № 3. – С. 50–57.
5. Кулаков, В. М. Ядерные свойства радионуклидов / В. М. Кулаков, А. П. Бабичев, Н. А. Бабушкина // Физические величины: справочник / под ред. И. С. Григорьева, Е. З. Мейлихова. – М.: Энергоатомиздат, 1991. – С. 993–1054.
6. Военная токсикология, радиобиология и медицинская защита: учебник для мед. вузов / С. А. Куценко [и др.]; под ред. С. А. Куценко. – СПб.: Фолиант, 2004. – 526 с.
7. Санитарные нормы и правила «Требования к обеспечению радиационной безопасности персонала и населения при осуществлении деятельности по использованию атомной энергии и источников ионизирующего излучения»: утв. Министерством здравоохранения Республики Беларусь 31.12.2013.
8. Поведение радионуклидов урана и радия в природно-растительных комплексах Беларуси вне зоны чернобыльского загрязнения / Г. А. Соколик [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2011. – № 2. – С. 98–104.
9. Поведение радионуклидов урана и радия в почвенно-растительном комплексе агроценозов вне зоны чернобыльского загрязнения Беларуси / Г. А. Соколик [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2013. – № 1. – С. 102–110.
10. Анисова, Ж. М. Природные изотопы урана в почвах и растениях сосновых лесов Минской возвышенности / Ж. М. Анисова, Б. И. Якушев. – Минск: Беларус. навука, 2008. – 162 с.
11. Крупномасштабное агрохимическое и радиологическое обследование почв сельскохозяйственных земель Республики Беларусь: метод. указания / И. М. Богдевич [и др.]; ред. И. М. Богдевич. – Минск: Ин-т почвоведения и агрохимии Нац. акад. наук Беларусі, 2012. – 46 с.
12. Почвы. Приготовление солевой вытяжки и определение pH по методу ЦИНАО: ГОСТ 26483-85. – Введ. 01.07.86 до 01.07.96. – Минск, 1985. – 4 с.
13. Почвы. Определение подвижных соединений фосфора и калия по методу Кирсанова в модификации ЦИНАО: ГОСТ 26207-91. – Взамен ГОСТ 26207-84; введ. 01.07.93. – М.: Изд-во стандартов, 1992. – 936 с.
14. Искра, А. А. Естественные радионуклиды в биосфере / А. А. Искра, В. Г. Бахуров. – М.: Энергоиздат, 1981. – 124 с.
15. Сельское хозяйство, ионизирующие излучения и охрана окружающей среды (к 30-летию Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии – ВНИИСХРАЭ) / под ред. Р. М. Алексахина. – Обнинск: ВНИИСХРАЭ, 2002. – 295 с.

### References

1. Jia, G., Belli, M., Liu, S., Sansone, U., Xu, Ch., Rosamilia, S., Xiao, X., Gaudino, S., Chen, L., Yang, H. (2006), “The fractionation and determination procedures for the speciation of  $^{210}\text{Pb}$  and  $^{210}\text{Po}$  in soil samples”, *Analitica Chimica Acta*, vol. 562, pp. 51–58.
2. Baranov, V. I. and Zeitlin, S. G. (1941), “The content of radioactive elements in some soils of the USSR”, *Doklady USSR Academy of Sciences*, vol. 30, no. 4, pp. 328–331.

3. Vlasov, V. K., Petrov, T. B. and Afinogenov, A. M. (2008), “An example of situational radiological analysis (incident with polonium-210)”, *Bulletin of Moscow University. Series. 2. Chemistry*, vol. 49, no. 4, pp. 274–281.
4. Uiba, V. V., Kotenko, K. V., Ilyin, L. A., Kvacheva, Yu. E., Abramov, Yu. V., Galstyan, I. A., Guskova, A. K., Kukhta, B. A., Nadezhina, N. M., Stebelkov, V. A., Tsovyanov, A. G., Shinkarev, S. M. and Iatsenko, V. N. (2015), “Version of polonium death of Yasser Arafat: the results of Russian studies”, *Meditinskaya radiologicheskaya i radiatsionnaya bezopasnost' [Nuclear Medicine and Radiation Safety]*, vol. 60, no. 3, pp. 50–57.
5. Kulakov, V. M., Babich, A. P. and Grandma, N. A. (1991), “The nuclear properties of radionuclides”, in Grigoryev, I., Meilikhov E. Z. (ed.), *Fizicheskie velichiny [Physical quantities]*, Energoatomisdat, Moscow, RU, pp. 993–1054.
6. Kutsenko, S. A., Butomo, N. V., Grebenyuk, N., Ivnitiskii, Y. Y., Melnychuk, V. P., Preobrazhenskaya, T. N., Rybalko, V. M. and Savateev, N. V. (2004), “Military toxicology, radiobiology and medical protection”, in Kutsenko, S. A. (ed.), *Folio*, St. Petersburg, RU.
7. Sanitary norms and rules: requirements for ensuring radiation safety of personnel and the public in carrying out activities on the use of nuclear energy and ionizing radiation sources, approved Ministry of Health of the Republic of Belarus 31.12.2013.
8. Sokolik, G. A., Ovsyannikov, S. V., Voinikov, E. V., Ivanova, T. G. and Popenya, M. V. (2011), “The behavior of radionuclides of uranium and radium in natural plant complexes of Belarus is Chernobyl contamination zone”. *Vesti Natsyonalnoi akademii navuk Belarusi. Seriya himichnyh navuk*, no. 2, pp. 98–104.
9. Sokolik, G. A., Ovsyannikov, S. V., Popenya, M. V. and Ivanova, T. G. (2013), “The behavior of radionuclides of uranium and radium in the soil-plant complex is agrotocenozov Chernobyl contamination zone of Belarus”. *Vesti Natsyonalnoi akademii navuk Belarusi. Seriya himichnyh navuk*, no. 1, pp. 102–110.
10. Anisova, J. M. and Yakushev, B. I. (2008), *Prirodnye izotopy urana v pochvakh i rasteniyakh sosnovykh lesov Minskoi vozvysheynosti [Natural isotopes of uranium in soils and plants of upland pine forests]*, Belarusian science, Minsk, BY.
11. Bogdevich, I. M., Lapa, W. B., Shmigelsky, I. D., Kasyanchik, S. A., Pirogovskaya, G. B., Sandpiper, A. F., Putyatin, Y. V., Tarasyuk, S. V., Petrikevich, O. M., Ageets, V. Y., Averin, V. S., Podoliak, A. G., Kislushko, P. M., Shkut, E. N., Mountain, A. V., Kvetkovskaya, A. V., Antonenko, A. E., Basalaeva, Z. P. and Vasheprudov, V. F. (2012), *Krupnomasshtabnoe agrokhimicheskoe i radiologicheskoe obsledovanie pochv sel'skokhozyaistvennykh zemel' Respubliki Belarus': metod. ukazaniya [Large-scale agrochemical and radiological examination of soils of agricultural lands of the Republic of Belarus: method. instructions]*, in Bogdevich, I. M. (ed.), Institute of Soil Science and Agricultural Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, BY.
12. (1985), *GOST 26483-85: Pochvy. Prigotovlenie solevoy vytjazhki i opredelenie rN po metodu CINA0 [GOST 26483-85: Soils. Preparation of salt extraction and determination of pH by the method CINA0]*, Minsk, BY.
13. (1993), *GOST 26207-91: Pochvy. Opredelenie podvizhnykh soedinenij fosfora i kalija po metodu Kirsanova v modifikacii CINA0 [GOST 26207-91: Soils. Determination of mobile compounds of phosphorus and potassium for Kirsanova method modification CINA0]*, Izdatel'stvo standartov, Moscow, RU.
14. Iskra, A. A. and Bakhur, V. G. (1981), *Estestvennye radionuklidy v biosfere [Natural radionuclides in the biosphere]*, Energoizdat, Moscow, RU.
15. Alexhin, R. M. (ed.) (2002), *Sel'skoe hozjajstvo, ionizirujushhie izlucheniya i ohrana okruzhajushhej sredy (k 30-letiju Vserossijskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta sel'skhozjajstvennoj radiologii i agrojekologii – VNIISHRAJe) [Agriculture, ionizing radiation and environmental protection (to the 30th anniversary of the All-Russian Research Institute of Agricultural Radiology and Agroecology–RIARAE)]*, RIARAE, Obninsk, RU.

### Информация об авторах

Клементьева Екатерина Алексеевна – науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: katya-klem@outlook.com

Овсянникова Светлана Васильевна – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: svetlanaosv@mail.ru

Никитин Александр Николаевич – канд. с.-х. наук, заведующий лабораторией. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: nikitinale@gmail.com

### Для цитирования

Клементьева, Е. А. Динамика изотопов  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{210}\text{Po}$  в естественных луговых экосистемах и агрофитоценозах с регулярным внесением фосфорных удобрений / Е. А. Клементьева, С. В. Овсянникова, А. Н. Никитин // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 1. – С. 39–47.

### Information about the authors

Klementjeva Ekaterina Aleksievna – Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninskogo Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: katya-klem@outlook.com

Ovsiannikova Svetlana Vasilievna – Ph. D. (Chem.), Leading researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: svetlanaosv@mail.ru

Nikitin Aleksandr Nikolayevich – Ph. D. (Agricult.), Head of the laboratory. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninskogo Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: nikitinale@gmail.com

### For citation

Klementjeva, E. A., Ovsiannikova, S. V. and Nikitin, N. A. (2017), “Dynamics of isotopes  $^{210}\text{Pb}$  and  $^{210}\text{Po}$  in natural ecosystems and agrophytocenoses with the regular application of phosphorus fertilizers”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, no. 1, pp. 39–47.

**К. В. Острикова, С. Г. Голенченко, М. И. Потапович, В. А. Прокулевич**

*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

### **СОЗДАНИЕ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ВИДОСПЕЦИФИЧНОГО ИНТЕРФЕРОНА-АЛЬФА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ АНТИВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ОВЕЦ**

Серьезную проблему для овцеводства представляют инфекционные заболевания, приводящие к значительным экономическим потерям. Цель данной работы – рассмотреть возможность применения имеющихся на рынке рекомбинантных интерферонов- $\alpha$  (ИФН- $\alpha$ ) для создания на их основе противовирусных препаратов для овец.

В результате сравнительного анализа аминокислотных последовательностей ИФН предполагается, что ни один из существующих на рынке ветеринарных препаратов ИФН не подходит для терапии вирусных заболеваний овец. В ходе работы также синтезирована и клонирована кодирующая последовательность гена овечьего ИФН- $\alpha 1$  в клетках *E. coli*. Показано, что белок, накапливающийся в бактериальных клетках в ходе индуцируемой экспрессии клонированной последовательности, по размеру соответствует овечьему ИФН- $\alpha 1$ .

*Ключевые слова:* *Escherichia coli*, интерферон, рецептор, ветеринарные препараты, рекомбинантный белок, множественное выравнивание.

**K. V. Vostrykava, S. G. Golenchenko, M. I. Patapovich, U. A. Prakulevich**

*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

### **CREATION OF STRAIN PRODUCING SPECIES-SPECIFIC INTERFERON-ALPHA FOR DEVELOPMENT OF ANTIVIRAL PREPARATIONS FOR SHEEPS**

Infectious diseases became a serious problem for sheep breeding, leading to significant economic losses. The aim of this study: to examine the feasibility of using recombinant interferons as a basis for development of antiviral preparations for sheeps.

With reference to comparative analysis of IFN amino acid sequences we can suppose, that neither of the existing IFN-based veterinary preparations is suitable for therapy of ovine viral diseases. Also during this work, synthesized sequence of ovine interferon- $\alpha 1$  gene was cloned in *Escherichia coli* cells.

*Keywords:* *Escherichia coli*, interferon, receptor, veterinary preparations, recombinant protein, multiple alignment.

**Введение.** Инфекционные заболевания, приводящие к значительным экономическим потерям, представляют собой серьезную проблему животноводческой отрасли в целом и овцеводства в частности [1]. Для лечения заболеваний бактериальной этиологии используют большое количество антибиотиков, в то время как против многочисленных вирусных заболеваний овец лечебные ветеринарные препараты практически отсутствуют. По состоянию на май 2016 г. Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и медицинских препаратов (FDA – Food and Drug Administration, США) и Европейским агентством по контролю за медицинскими препаратами (European Medicines Agency, ЕС) не зарегистрировано ни одного подобного препарата [2, 3].

Интерфероны (ИФН) представляют собой группу цитокинов, продуцируемых и секретируемых ядерными клетками позвоночных в ответ на присутствие патогенов или их компонентов. ИФН выполняют роль сигнальных молекул в организме животных, а также обладают антивирусной, иммунорегуляторной и противоопухолевой активностью [4, 5].

Семейство ИФН включает в себя три типа белковых молекул. К I типу относят большую группу белков, куда входят ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\beta$ , ИФН- $\omega$ , ИФН- $\epsilon$ , ИФН- $\tau$ , ИФН- $\delta$  и ИФН- $\kappa$ . Ко II типу относят ИФН- $\gamma$ . III тип ИФН включает ИФН- $\lambda 1$ , ИФН- $\lambda 2$  и ИФН- $\lambda 3$  или ИЛ-29, ИЛ-28А и ИЛ-28В соответственно [4].

Интерфероны I типа являются главными регуляторами противовирусного клеточного ответа у позвоночных. В настоящее время принято считать, что большинство ядерных клеток способны продуцировать данные ИФН, однако существуют и специализированные ИФН-продуцирующие клетки, такие как плазматоидные дендритные клетки, синтезирующие в тысячи раз большее количество ИФН, чем остальные клетки. Синтез и секреция данных цитокинов индуцируется

в результате активации внутриклеточных Toll-подобных рецепторов (TLR3 или TLR9) вирусными нуклеиновыми кислотами либо в результате активации поверхностных интерфероновых рецепторов (аутоиндукция) внеклеточными ИНФ. Последнее приводит к индукции противовирусного ответа в еще не зараженных клетках, что позволяет им хорошо подготовиться к внедрению вируса. Способность ИНФ I типа активировать противовирусный ответ обусловила их использование в качестве неспецифических противовирусных агентов [4–6].

Все ИНФ I типа взаимодействуют с одними и теми же рецепторами, которые отличаются от рецепторов ИНФ II и III типов. Рецептор ИНФ I типа состоит из двух субъединиц:  $\alpha$  и  $\beta$ , которые обозначаются как IFNR1 и IFNR2 соответственно. IFNR1 и IFNR2 состоят из трех доменов: поверхностного, трансмембранного и внутриклеточного. При связывании ИНФ с поверхностным доменом рецептора формируется активационный мембранный сигнал путем димеризации рецептора и фосфорилирования тирозиновых остатков рецепторных белков. Передача сигнала с поверхности клетки в ядро происходит через каскад JAK-STAT, в который вовлечены янус-киназы (JAK), сигнальный белок-трансдуктор и активатор транскрипции (STAT). Передача сигнала ИНФ может происходить также через активацию MAP-киназного (серин/треонин-специфичные протеинкиназы) и фосфатидил-инозитол3-киназного путей [7, 8].

Несмотря на то что все ИНФ I типа взаимодействуют с одними и теми же рецепторами, их эффекты могут существенно различаться. Например, ИНФ- $\alpha$  индуцируют в большей мере противовирусный ответ, ИНФ- $\beta$  – противовирусный и противоопухолевый [4], а ИНФ- $\tau$  участвует в регуляции репродуктивной функции [9]. Поскольку аналогичные ИНФ различных животных, как правило, не являются эквивалентными (хотя в ряде случаев могут проявлять межвидовую активность), в качестве лечебных и профилактических средств предпочтительным является использование аутологичных ИНФ. В ветеринарии до недавнего времени применяли антивирусные препараты на основе рекомбинантного человеческого ИНФ- $\alpha$  («Миксоферон», «Кинорон», «Мультиферон», «Виферон»), проявляющие относительно низкую эффективность у животных, что обуславливает введение высоких терапевтических концентраций, которые, как известно, приводят к развитию ряда нежелательных побочных реакций, включая иммунный ответ на чужеродный белок в организме животных [10].

Цель данной работы – рассмотреть возможность применения имеющихся на рынке рекомбинантных ИНФ- $\alpha$  для создания на их основе противовирусных препаратов для овец.

**Материалы и методы исследования.** *Бактериальные штаммы и плазмиды.* Бактерии штамма *E. coli* XL-1 Blue ( $F':: Tn 10 proA^+B^+ lacI^{\Delta}(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17(r_k^- m_k^+) glnV44 relA1 lac$ ) использовали для клонирования рекомбинантных плазмид.

В клетках бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL ( $F' ompT hsdS (r_B m_B) dcm^+Tet^r gal \lambda$  (DE3)  $endA Hte [argU proL Cam^r] [argU ileY leuW Strep/Spec^r]$ ) осуществляли индуцибельную экспрессию клонированного гена.

*Генно-инженерные методики и ферменты.*  $Ca^{2+}$ -зависимую трансформацию, электрофорез ДНК, электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ), подготовку проб, фиксацию и окрашивание ПААГ осуществляли в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами [11].

*Индукция и детекция экспрессии рекомбинантного белка.* Ночную культуру бактерий *E. coli* BL21(DE3) разводили в 20 раз и культивировали в колбах с 10 мл LB-бульона, 30 мкг/мл канамицина при 37 °С с перемешиванием и аэрацией при 180 об/мин до оптической плотности 1,0 ( $\lambda = 600$  нм). Затем в среду добавляли синтетический аналог лактозы – изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 ммоль/л.

Анализ синтезированных в клетках белков осуществляли с помощью электрофореза в 16 %-ном ПААГ в денатурирующих условиях с 0,1 % додецилсульфатом натрия по методу Laemmli [12]. Гель окрашивали в растворе Кумасси синего R-250.

*Методы обработки последовательностей.* Аминокислотные последовательности ИНФ- $\alpha$  взяты из базы данных GenBank, коды доступа для *Equus caballus* (лошадь) – NP\_001108009.1; *Bos taurus* (корова) – NP\_001017411.1; *Sus scrofa* (свинья) – AAA31053.1; *Homo sapiens* (человек) – CAA72532.1; *Canis lupus familiaris* (собака) – AAA30851.1; *Ovis aries* (овца) ИНФ- $\alpha 1$  – AAV50052.1; *O. aries* ИНФ- $\alpha 2$  – AAV50053.1; *O. aries* ИНФ- $\alpha 3$  – AAV50054.1; *O. aries* ИНФ- $\alpha 4$  – AAV50055.1.

Кодирующая последовательность гена овечьего ИФН- $\alpha$  взята из базы данных GenBank, код доступа AY802984.1.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей ИФН- $\alpha$  выполнено по алгоритму CLUSTAL W, реализованному в программе MEGA6.

**Результаты и их обсуждение.** Необходимым условием успешного применения препаратов на основе гетерологичных белков является высокая эволюционная консервативность их аминокислотных последовательностей. На сегодняшний день в Республике Беларусь выпускаются препараты на основе видоспецифических рекомбинантных свиных, бычьих, лошадиных и собачьих ИФН- $\alpha$ .

С целью выяснения возможности использования уже имеющихся препаратов для лечения заболеваний вирусной этиологии у овец проведено сравнение аминокислотной последовательности овечьего ИФН- $\alpha$  с последовательностями аминокислот рекомбинантных ИФН- $\alpha$  других животных (бычьего, свиного, лошадиного, собачьего) и человеческого (рис. 1).

Из 6 проанализированных белков 5 включают 166 аминокислот и только лошадиный ИФН- $\alpha$  состоит из 161 аминокислоты, потеряв кластер из 5 аминокислот на С-конце белка. У всех 6 белков абсолютно идентично расположение четырех остатков цистеина в положениях 1, 29, 99 и 139. Это важный элемент, во многом определяющий и стабилизирующий третичную структуру белка, закрепляемую ковалентными внутримолекулярными Cys-Cys связями (дисульфидными мостиками) [6, 13]. Следует, однако, отметить, что на этих двух параметрах заканчивается структурное сходство между анализируемыми белками ИФН- $\alpha$  разных животных.

При исследовании человеческого ИФН- $\alpha$ 2 [14] выявлены консервативные области 29–35, 78–95 и 123–140, отвечающие за узнавание и связывание ИФН с рецептором (на рис. 1 данные области выделены рамкой).

Известно, что в структуре белка ИФН- $\alpha$  существует 5  $\alpha$ -спиралей (А, В, С, D и Е). Остатки 29–35 локализируются между спиральями А и В, остатки 123–140 находятся в петле DE и в спирали D, остатки 78–95, расположенные в пределах петли АВ и спирали Е, вносят наибольший вклад в энергию связи ИФН с клеточным рецептором [6, 14].

Согласно модели взаимодействия ИФН I типа с соответствующими рецепторами, клеточный ответ, вызываемый конкретным ИФН, детерминируется главным образом его энергией взаимодействия. Даже относительно небольшое различие в энергии связывания может приводить

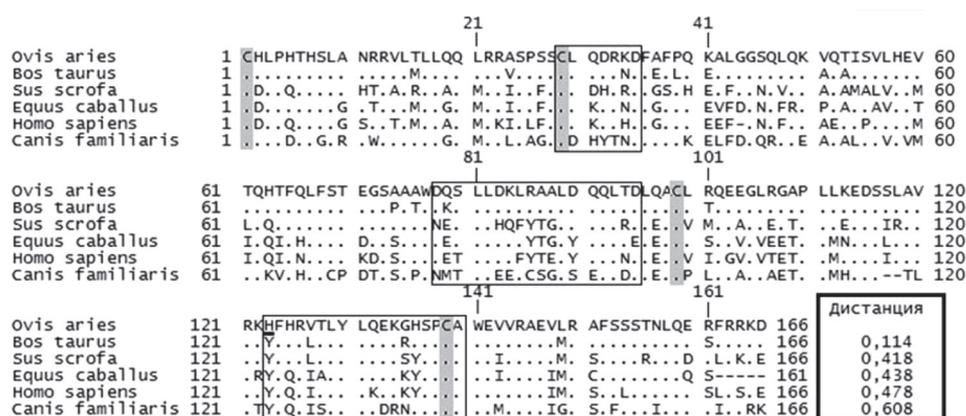


Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей овечьего и других ИФН- $\alpha$ , доступных на рынке ветеринарных препаратов (аминокислотные остатки, которые совпадают с остатками овечьего ИФН- $\alpha$ , обозначены точками, показаны только полиморфные остатки). Дисульфидные мостики, образующиеся между цистеиновыми остатками в положениях 1–99 и 29–139, выделены серым. В поле «дистанция» показаны парные эволюционные дистанции представленных последовательностей с последовательностью ИФН- $\alpha$  овцы.

Рамками обозначены последовательности, отвечающие за взаимодействие с поверхностными клеточными рецепторами для ИФН- $\alpha$

Fig. 1. Multiple amino acid sequence alignment of ovine IFN- $\alpha$  and other IFN- $\alpha$ s, available on veterinary drugs market (identical amino acid residues are indicated by dots, showing only polymorphic residues). Disulfide bridges formed between cysteine residues at positions 1–99 and 29–139 are highlighted in gray. The “distance” field shows the pairwise evolutionary distances between IFN- $\alpha$  sequences and ovine IFN- $\alpha$ . Regions, responsible for receptor binding are in frames

к совершенно разным эффектам [7, 8]. Все представленные на рынке ветеринарных препаратов ИФН- $\alpha$ , за исключением бычьего, существенно отличаются по аминокислотной последовательности от овечьего ИФН- $\alpha$  как в целом, так и в участках, которые отвечают за связывание с рецепторами (рис. 1), поэтому только препараты бычьего ИФН могут рассматриваться как потенциальные противовирусные агенты для овец. Однако, несмотря на эволюционную близость к овечьему ИФН- $\alpha$ , бычий ИФН имеет по крайней мере 5 замен в функционально-значимых для связывания с рецептором областях. Уникальной отличительной особенностью овечьего ИФН- $\alpha$  является наличие в положении 123 гистидина (H) (подчеркнут на рис. 1) или аргинина (R) вместо имеющегося у млекопитающих высококонсервативного тирозина (Y), что может свидетельствовать об иной по сравнению с ИФН других животных механике взаимодействия данного белка с соответствующим рецептором. Более того, сходство бычьего ИФН- $\alpha$  с последовательностью овечьего ИФН- $\alpha$  не превышает 90 %, а значит, высока вероятность иммуногенности бычьего ИФН- $\alpha$ . Это может приводить к нежелательным побочным эффектам и к потере активности при повторных применениях, что, в конечном счете, сильно ограничивает возможности использования препаратов на основе бычьего белка, предназначенных для терапии и профилактики инфекционных заболеваний у овец.

Таким образом, совокупность фактов, полученных в результате биоинформатического анализа, дает основание предположить, что ни один из пяти существующих на рынке ветеринарных препаратов ИФН не годится для использования в лечебно-профилактических и противовирусных целях для овец. Для них, как и для других эволюционно отдаленных животных, требуются собственные видоспецифические рекомбинантные ИФН.

На основании результатов биоинформатического анализа принято решение клонировать кодирующую последовательность гена овечьего ИФН- $\alpha$  для последующего создания штамма-продуцента рекомбинантного белка.

Кластер генов овечьего ИФН- $\alpha$  находится на 2-й хромосоме и состоит по меньшей мере из 4 генов ИФН- $\alpha$ . Для того чтобы выбрать последовательность для клонирования, проведено сравнение аминокислотных последовательностей всех овечьих ИФН- $\alpha$  между собой (рис. 2).

Поскольку сравнение не выявило значимых различий между изученными последовательностями, а имеющиеся немногочисленные замены представлены аминокислотными остатками со схожими свойствами, для клонирования использовали нуклеотидную последовательность гена овечьего ИФН- $\alpha 1$ .

Структурную часть гена овечьего ИФН- $\alpha 1$  синтезировали и клонировали в составе вектора рЕТ24b(+) по сайтам рестриктаз *Nde* I и *Eco* RI. Результаты рестрикционного анализа и секвенирования (данные не приводятся) подтвердили наличие структурной части гена овечьего ИФН- $\alpha 1$  в составе рекомбинантной плазмиды. Бактерии штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-R1PL трансформировали полученной рекомбинантной плазмидой рЕТ24b-ovineIFN- $\alpha 1$ . Клетки клонов, унаследовавших рекомбинантную плазмиду, выращивали в присутствии ИПТГ для индукции экспрессии гена овечьего ИФН- $\alpha 1$  (рис. 3).

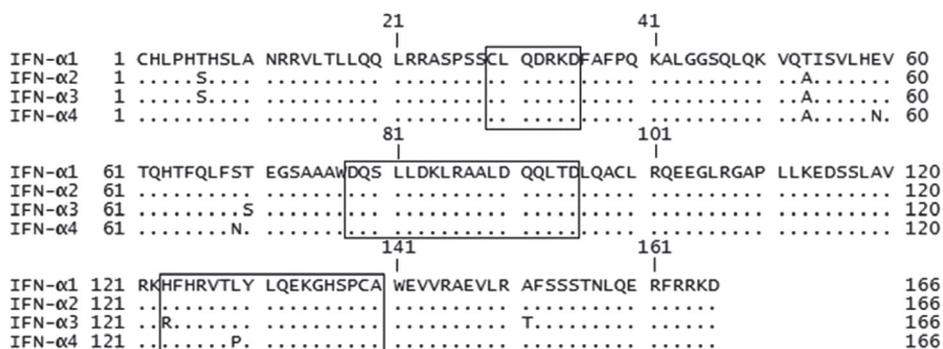


Рис. 2. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей ИФН- $\alpha$  овцы (аминокислотные остатки, которые совпадают у разных ИФН- $\alpha$ , обозначены точками, показаны только полиморфные остатки). Регионы, отвечающие за связывание с рецептором (29–35, 78–95, 123–140), выделены рамкой

Fig. 2. Multiple amino acid sequence alignment of ovine IFN- $\alpha$  (identical amino acid residues are indicated by dots, showing only polymorphic residues). Regions, responsible for receptor binding (29–35, 78–95, 123–140) are in frames

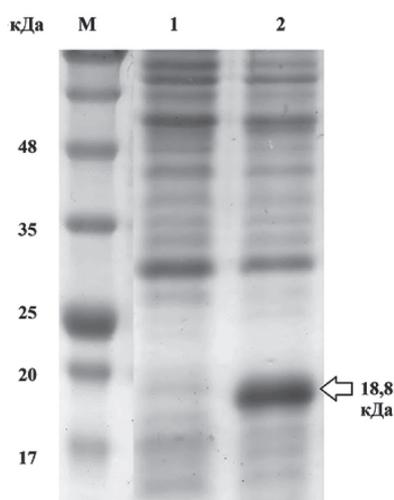


Рис. 3. ПААГ-электрофореграмма клеточных белков *E. coli* BL21-Codon Plus(DE3)-RIPL-pET24b-ovineIFN- $\alpha$ 1 (стрелкой указана молекулярная масса, соответствующая овечьему ИФН- $\alpha$ ). М – маркер молекулярной массы Blue Wide Range Prestained Protein Ladder, Cleaver Scientific Ltd. (Cat. No. CSL-BBL); 1 – образец без индукции ИПТГ; 2 – образец спустя 4 ч после индукции ИПТГ (0,5 ммоль/л)

Fig. 3. SDS-PAGE of *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL-pET24b-ovineIFN- $\alpha$ 1 cellular proteins (molecular weight of ovine IFN- $\alpha$  is indicated by arrow). М – molecular weight marker Blue Wide Range Prestained Protein Ladder, Cleaver Scientific Ltd. (Cat. No. CSL-BBL); 1 – sample without IPTG; 2 – sample after 4 h induction with IPTG (0.5 mmol/L)

Как видно из рис. 3, в индуцированной культуре клеток *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL-pET24b-ovineIFN- $\alpha$ 1 наблюдается накопление белка, соответствующего по молекулярной массе овечьему ИФН- $\alpha$  (около 18,8 кДа). В то же время в неиндуцированной культуре накопления такого продукта не отмечается.

**Заключение.** Различия в аминокислотных последовательностях ИФН- $\alpha$ , локализованные как в сайтах связывания с клеточными поверхностными рецепторами, так и вне их, не позволяют гарантировать достаточного терапевтического эффекта при использовании гетерологичных белков ИФН- $\alpha$  (человеческого, бычьего, свиного, лошадиного, собачьего) для лечения овец. В связи с этим была синтезирована и клонирована под контролем регуляторных элементов плазмиды pET24b(+) кодирующая последовательность гена овечьего ИФН- $\alpha$ 1, обеспечивающая после индукции накопление в бактериальных клетках белка, молекулярная масса которого соответствовала овечьему ИФН- $\alpha$ 1. Таким образом, впервые получен штамм *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL-pET24b-ovineIFN- $\alpha$ 1 – продуцент овечьего ИФН- $\alpha$ 1.

#### Список использованных источников

1. Острикова, К. В. Клонирование и экспрессия генов овечьего  $\alpha_2$ - и  $\gamma$ -интерферонов в клетках *E. coli* / К. В. Острикова, М. И. Потапович, В. А. Прокулевич // Биология – наука XXI века: сб. тез. 18-й Междунар. Пушин. шк. конф. молодых ученых, Пушино, 21–26 апр. 2014 г. / Пушин. науч. центр РАН, Пушин. гос. ун-т; редкол.: А. И. Мирошников [и др.]. – Пушино, 2014. – С. 72–73.
2. FDA [Electronic resource]: U. S. Food and Drug Administration / U. S. Department of Health and human Services. – Mode of access: <http://www.fda.gov>. – Date of access: 24.05.2016.
3. Science medicines health [Electronic resource] / European medicines agency. – Mode of access: <http://www.ema.europa.eu>. – Date of access: 24.05.2016.
4. Kalliolias, G. Overview of the biology of type I interferons / G. Kalliolias, L. Ivashkiv // Arthritis Research & Therapy. – 2010. – Vol. 12, suppl. 1. – S. 1–9.
5. Schultz, U. The interferon system of non-mammalian vertebrates / U. Schultz, B. Kaspers, P. Staeheli // Dev. Comp. Immunol. – 2004. – Vol. 28 (5). – P. 499–508.
6. Meager, A. The Interferons: Characterization and Application / A. Meager; A. Meager (ed.). – [S. l.]: WILEY-VCH Verlag, 2006. – 410 p.
7. Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons / C. Thomas [et al.] // Cell. – 2011. – Vol. 146. – P. 621–632.
8. The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business / K. E. Mogensen [et al.] // J. Interferon Cytokine Res. – 1999. – Vol. 19. – P. 1069–1098.
9. Roberts, R. M. Interferon-tau and pregnancy / R. M. Roberts // J. Interferon Cytokine Res. – 1996. – Vol. 16 (4). – P. 271–273.
10. Herzyk, D. J. The immunogenicity of therapeutic cytokines / D. J. Herzyk // Curr. Opin. in Mol. Ther. – 2003. – Vol. 5. – P. 167–171.
11. Current protocols in molecular biology / F. M. Ausubel [et al.]. – [S. l.]: John Wiley & Sons Inc., 2003. – 4648 p.
12. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature (Lond.). – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
13. Sen, C. Viruses and Interferons / C. Sen // Annu. Rev. Microbiol. – 2001. – Vol. 55. – P. 255–282.
14. Fish, E. N. Definition of Receptor Binding Domains in Interferon- $\alpha$  / E. N. Fish // J. of Interferon Res. – 1992. – Vol. 12. – P. 257–266.

## References

- Ostrikova, K. V., Potapovich, M. I. and Prakulevich, V. A. (2014), “Cloning and expression of genes sheep  $\alpha_2$ - and  $\gamma$ -interferon in the cells of *E. coli*.”, *Biologiya – nauka XXI vek: sbornik tezisev 18-i Mezhdunarodnoi Pushchinskoi shkoly-konferentsii molodykh uchenykh, Pushchino, 21–26 aprel’ 2014 g.* [Biology – the science of the XXI century: Sat. mes. 18th Intern. Pushchino School Conf. young scientists, Pushchino, 21–26 April 2014], *Biologiya – nauka XXI vek* [Biology – the science of the XXI century], Pushchino, RU, 21–26 April 2014, pp. 72–73.
- U. S. Department of Health and human Services (2016) *FDA: U. S. Food and Drug Administration*, Available at: <http://www.fda.gov> (Accessed 24.05.2016).
- European medicines agency (2016) *Science medicines health*, Available at: <http://www.ema.europa.eu> (Accessed 24.05.2016).
- Kallioliass, G. and Ivashkiv, L. (2010), “Overview of the biology of type I interferons”, *Arthritis Research & Therapy*, vol. 12 (Suppl. 1), pp. 1–9.
- Schultz, U., Kaspers, B. and Staeheli, P. (2004), “The interferon system of non-mammalian vertebrates”, *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 28 (5), pp. 499–508.
- Meager, A. (2006) *The Interferons: Characterization and Application*, in Meager, A. (ed.), WILEY-VCH Verlag.
- Thomas, C., Moraga, I., Levin, D., Krutzik, P. O., Podoplelova, Y., Trejo, A., Lee, C., Yarden, G., Vleck, S. E., Glenn, J. S., Nolan, G. P., Piehler, J., Schreiber, G. and Garcia, K. C. (2011), “Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons”, *Cell*, vol. 146, pp. 621–632.
- Mogensen, K. E., Lewerenz, M., Reboul, J., Lutfalla, G. and Uzé, G. (1999), “The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family”, *Journal Interferon Cytokine Research*, vol. 19, pp. 1069–1098.
- Roberts, R. M. (1996), “Interferon-tau and pregnancy”, *Journal Interferon Cytokine Research*, vol. 16 (4), pp. 271–273.
- Herzyk, D. J. (2003), “The immunogenicity of therapeutic cytokines”, *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, vol. 5, pp. 167–171.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (2003), *Current protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons Inc.
- Laemmli, U. K. (1970), “Cleavage of structural proteins during the assembly the head of bacteriophage T4”, *Nature* (Lond.), vol. 227, pp. 680–685.
- Sen, C. (2001), “Viruses and Interferons”, *Annual Review of Microbiology*, vol. 55, pp. 255–282.
- Fish, E. N. (1992), “Definition of Receptor Binding Domains in Interferon- $\alpha$ ”, *Journal of Interferon Research*, vol. 12, pp. 257–266.

## Информация об авторах

*Острикова Кристина Владимировна* – аспирант. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [kristiost@mail.ru](mailto:kristiost@mail.ru)

*Голенченко Сергей Георгиевич* – науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [golenchenko@inbox.ru](mailto:golenchenko@inbox.ru)

*Потапович Максим Иосифович* – заведующий лабораторией. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [mipatapovich@gmail.com](mailto:mipatapovich@gmail.com)

*Прокулевич Владимир Антонович* – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [prokulevich@mail.ru](mailto:prokulevich@mail.ru)

## Для цитирования

Создание штамма-продуцента видоспецифичного интерферона-альфа для разработки противовирусных препаратов для овец / К. В. Острикова [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. біял. навук. – 2017. – № 1. – С. 48–53.

## Information about the authors

*Vostrykava Kristina* – Postgraduate student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [kristiost@mail.ru](mailto:kristiost@mail.ru)

*Golenchenko Sergey* – Researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [golenchenko@inbox.ru](mailto:golenchenko@inbox.ru)

*Patapovich Maksim* – Head of Laboratory. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [mipatapovich@gmail.com](mailto:mipatapovich@gmail.com)

*Prakulevich Uladzimir* – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of Department. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [prokulevich@mail.ru](mailto:prokulevich@mail.ru)

## For citation

Vostrykava, K. V., Golenchenko, S. G., Patapovich, M. I. and Prakulevich, U. A. (2017), “Creation of strain producing species-specific interferon-alpha for development of antiviral preparations for sheeps”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, no. 1, pp. 48–53.

Д. В. Савчин<sup>1</sup>, П. В. Кузмицкая<sup>1</sup>, О. Ю. Урбанович<sup>1</sup>, И. В. Федосеева<sup>2</sup>, Г. Б. Боровский<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН, Иркутск, Российская Федерация

## СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA TABACUM* С ГЕНОМ *NDB2 ARABIDOPSIS THALIANA* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОТВЕТА НА СТРЕСС

С целью изучения влияния измененного уровня экспрессии гена *ndb2* (NAD(P)H-дегидрогеназа B2, КФ 1.6.5.2) на активность других белков митохондриальной локализации и устойчивость растений к различным стрессам созданы трансгенные растения табака, экспрессирующие данный ген. Ген *ndb2* длиной 1749 п.н. выделен из суммарной матричной РНК *Arabidopsis thaliana* с помощью ОТ-ПЦР. Данный ген клонирован в плазмиду pBI121. На основе плазмиды pBI121 создана векторная конструкция pBI121\_NDB2, содержащая ген *ndb2* под контролем 35S CaMV промотора. Показана эффективность pBI121\_NDB2 для трансформации. Экспериментально подтверждены факты интеграции гена *ndb2* в геноме.

**Ключевые слова:** *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *ndb2*, трансгенные растения, адаптация растений.

D. V. Sauchyn<sup>1</sup>, P. V. Kuzmitskaya<sup>1</sup>, O. Yu. Urbanovich<sup>1</sup>, G. B. Borovskii<sup>2</sup>, I. V. Fedoseeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation

## THE CREATION OF TRANSGENIC PLANTS *NICOTIANA TABACUM* WITH GENE *NDB2 ARABIDOPSIS THALIANA* TO STUDY RESPONSE TO STRESS

Transgenic tobacco plants that express the *ndb2* gene were obtained to study the influence of changed level of the *ndb2* gene (NAD(P)H dehydrogenase B2, EC 1.6.5.2) expression on the activity of the proteins of mitochondrial localization and stress resistance of plants. The *ndb2* gene of 1749 bp was isolated from *Arabidopsis thaliana* total messenger RNA using RT-PCR. This gene was cloned into the pBI121 plasmid. The pBI121\_NDB2 vector construction containing the *ndb2* gene under the control of the 35S CaMV promoter was created on the basis of the pBI121 plasmid. The pBI121\_NDB2 efficiency for transformation was demonstrated. The *ndb2* gene integration into the tobacco genome was confirmed experimentally. The tobacco lines expressing target *ndb2* gene were obtained.

**Keywords:** *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, gene *ndb2*, transgenic plants, plant adaptations.

**Введение.** Реакция растений на стресс имеет адаптивное значение. Она может приводить к функциональной перестройке дыхательного метаболизма клетки, увеличению роли путей альтернативного транспорта электронов, изменению работы систем несопряженного и разобщенного дыхания. Одной из главных мишеней окислительного повреждения при стрессе являются митохондрии. При энергозапасующем окислении NADH митохондриями функционирует комплекс I дыхательной цепи, который является одной из точек генерации мембранного потенциала. В клетках растений, в отличие от клеток животных, функционируют альтернативные (второго типа, или NDII) внешние и внутренние NAD(P)H дегидрогеназы, которые поставляют восстановительные эквиваленты в дыхательную цепь, минуя комплекс I. У растений арабидопсиса обнаружены три группы таких NAD(P)H-дегидрогеназ: NDA (два гена), NDB (четыре гена) и NDC (один ген) [1]. Белки NDB1-NDB4 являются внешними и обращены на внешнюю сторону внутренней митохондриальной мембраны. Белки NDA1, NDA2 и NDC1 обращены на внутреннюю сторону митохондриальной мембраны [2]. Точные физиологические функции конкретных белков семейства NDII не определены. Считается, что последние вместе с альтернативной оксидазой (АОХ) участвуют в формировании нефосфорилирующей дыхательной цепи при окислительном стрессе и метаболическом дисбалансе. Поскольку активация альтернативных NAD(P)H-дегидрогеназ на внутренней митохондриальной мембране не способствует образованию потенциала на участке до убихинона, а также снижает степень восстановления комплекса I, одного из предполагаемых источников генерации активных форм кислорода (АФК) у растений, предполагается,

что роль внешних и внутренних NAD(P)H-дегидрогеназ заключается в подавлении генерации АФК [3]. В то же время, несмотря на то что экспрессия альтернативных дегидрогеназ при действии самых различных стрессовых воздействий повышается [4–6], экспериментальных подтверждений этого положения в случае с растениями недостаточно. Поскольку альтернативные NAD(P)H-дегидрогеназы растений содержат в качестве кофактора ФАД (флавинодениндинуклеотид), многие исследователи не исключают, что последние могут быть потенциальными сайтами генерации АФК у растений [3, 7].

В результате экспериментов по снижению уровня синтеза белка NDB4 с помощью RNAi выявлено значительное увеличение синтеза белков NDB2 и AOX1a, что привело к уменьшению образования АФК клетками, увеличению солеустойчивости, а также к некоторым изменениям в скорости развития и фенотипе растений [8]. Кроме того, показано участие «внешней» NADH-дегидрогеназы и некоторых других белков в развитии морозоустойчивости проростков озимой пшеницы [9, 10].

Особый интерес представляет изучение влияния измененного уровня экспрессии гена *ndb2* («внешней» нефосфорилирующей NADH-дегидрогеназы) на устойчивость клеток и растений к различным стрессам, а также влияния уровня экспрессии *ndb2* на экспрессию и активность работы других NDII, AOX и белков митохондриальной локализации. Предполагается, что у растений с измененным уровнем экспрессии *ndb2* изменен и уровень АФК, а соответственно, защитная система клетки работает в ином режиме.

Изменить экспрессию генов белков митохондриальной локализации, в частности *ndb2*, можно с помощью методов генетической инженерии. Создание трансгенных растений с гетерологичным геном *ndb2* позволит изучить влияние данного гена и роль АФК в развитии устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессам, а также механизмы адаптации растений. Предполагается, что изменение количества АФК влияет на функционирование митохондрий, экспрессию стрессовых генов, реализацию программы стресс-сигналинга и адаптации. Изучение данного процесса позволит предложить стратегию получения новых высокоустойчивых форм растений.

Цель данного исследования – создание векторной конструкции для трансформации, несущей ген «внешней» нефосфорилирующей NADH-дегидрогеназы (*ndb2*) из *Arabidopsis thaliana*, и получение генетически модифицированных растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующих указанный ген.

**Материалы и методы исследования.** В качестве источника для клонирования нативного гена *ndb2* использованы растения *Arabidopsis thaliana* (экотип Columbia). В экспериментах по трансформации использована линия табака *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SRI*.

Выделение мРНК и синтез кДНК выполняли с помощью наборов GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit и RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, EU). Клонирование гена *ndb2* проводили с помощью ПЦР, используя *Pfu*-полимеразы и синтетические олигонуклеотиды NDB2-F и NDB2-R, представленные в таблице.

При создании векторных конструкций использовали методики ПЦР, рестрикции и лигирования фрагментов ДНК, выполненные по стандартным протоколам [14, 15] или с применением коммерческих наборов реагентов (Thermo Fisher Scientific, Qiagen).

Векторная конструкция для трансформации растений получена на основе вектора pBI121 [16], который эффективно используется для этих целей [17, 18]. Предварительно в данный вектор были введены дополнительные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Kpn*I, что позволяло клонировать целевой ген между конститутивным промотором 35S РНК CaMV и терминатором нопалин-синтазы *nos*.

Корректность сборки векторных конструкций подтверждали методом NGS секвенирования на приборе Illumina MiSeq, используя набор Nextera XT DNA. Анализ данных NGS выполняли с помощью программ FastQC, Trimmomatic, SPAdes, UGENE, Vector NTI.

Для стабильной интеграции гена *ndb2* в геном растений *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SRI* использовали агробактериальный штамм *Agrobacterium tumefaciens* AGL0. Трансформацию растений табака проводили методом сокультивации растительных эксплантов с агробактерией [19]. Для отбора первичных регенерантов использовали питательные среды CIM, SIM и T-med с селективирующим агентом канамицином в концентрации 50 мг/л.

**Последовательность и температура отжига синтетических олигонуклеотидов,  
использованных при создании векторной конструкции и анализе трансгенных растений**

**Sequence and temperature annealing of synthetic oligonucleotides  
using to create a vector design and analysis of transgenic plants**

Название олигонуклеотида	Последовательность 5'-3'	Температура отжига, °С	Источник литературы
NDB2-F	ATGAGAAATTTTCAGTGTCTTC	48	Данная статья
NDB2-R	TCAGATGCTACTGGAATCTCT	48	Данная статья
NDB2-BamHI-F	ATGAGCTCGGATCCAACAATGGTTAGAAATTTTCAGTGTCTTCGAGAGATT	48	Данная статья
NDB2-KpnI-R	GAGCTCGGTACCTTAGATGCTACTGGAATCTCTACCAAAGAT	48	Данная статья
35SEF	CATCATTGCGATAAAGGAAAGGC	53	[11]
35SER	TGCTTTGAAGACGTGGTTGGA	53	[11]
Tnos-F	CATGTAATGCATGACGTTATTTATG	53	[12]
Tnos-R	GCTATATTTTGTCTTCTATCGCGTAT	53	[12]
QtRNALeuF	CGAAATCGGTAGACGCTACG	55	[13]
QtRNALeuR	TTCCATTGAGTCTCTGCACCT	55	[13]

Выделение растительной ДНК выполняли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). Анализ регенерантов осуществляли методами ПЦР и ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией), используя синтетические олигонуклеотиды, представленные в таблице.

**Результаты и их обсуждение.** Подбор специфичных олигонуклеотидов к 5'- и 3'-концевым участкам гена *ndb2* проводили на основе нуклеотидной последовательности NM\_116741.3, размещенной в базе данных NCBI [20]. Поскольку нативный ген *ndb2* содержит интроны, для клонирования его кодирующей последовательности использовали ОТ-ПЦР суммарной матричной РНК. Источником РНК служили листья и цветы растений *Arabidopsis thaliana*. В результате амплификации кДНК, синтезированной из мРНК листьев и цветов, с олигонуклеотидами NDB2-F и NDB2-R получен фрагмент ДНК размером 1749 п. н., что соответствует ожидаемому размеру целевой последовательности нативного гена *ndb2*.

Известно, что состав нуклеотидной последовательности гена влияет на эффективность его трансляции и количество синтезируемого белка [21]. Анализ нуклеотидной последовательности нативного гена *ndb2* выявил наличие на N-концевом участке кодона AGA, кодирующего дестабилизирующую аминокислоту аргинин. Наличие данной аминокислоты на N-концевом участке приводит к быстрому разрушению транслируемого белкового продукта [22]. Определено неоптимальное окружение стартового кодона, что также отрицательно влияет на эффективность экспрессии гетерологичного гена. Для повышения эффективности экспрессии последнего важно наличие нуклеотида А в положении -3 и нуклеотида G в положении +4 [23]. В связи с обозначенными фактами проведена модификация 5'-концевого участка последовательности нативного гена *ndb2* – добавлена последовательность Козак ААСА перед стартовым кодоном и кодон GGT, кодирующий стабилизирующую аминокислоту валин, после. Стоп-кодон TGA заменен на более предпочтительный для растений TAA. С целью обеспечения возможности клонирования модифицированной последовательности гена *ndb2* в вектор, с 5'- и 3'-концов введены дополнительные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Kpn*I. Подобранные олигонуклеотиды NDB2-BamHI-F и NDB2-KpnI-R (см. таблицу) использованы для проведения ПЦР с последовательностью клонированного ранее нативного гена *ndb2* в качестве матрицы. Данный этап позволил провести модификацию 5'- и 3'-концевых участков гена *ndb2* и добавить сайты узнавания требуемых эндонуклеаз рестрикции. Полученная последовательность гена *ndb2* перенесена в модифицированный вектор pBI121 по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Kpn*I. Созданный вектор получил название pBI121\_NDB2 (рис. 1). Оценка корректности сборки векторной конструкции проведена с помощью метода секвенирования. Сравнительный анализ целевой нуклеотидной

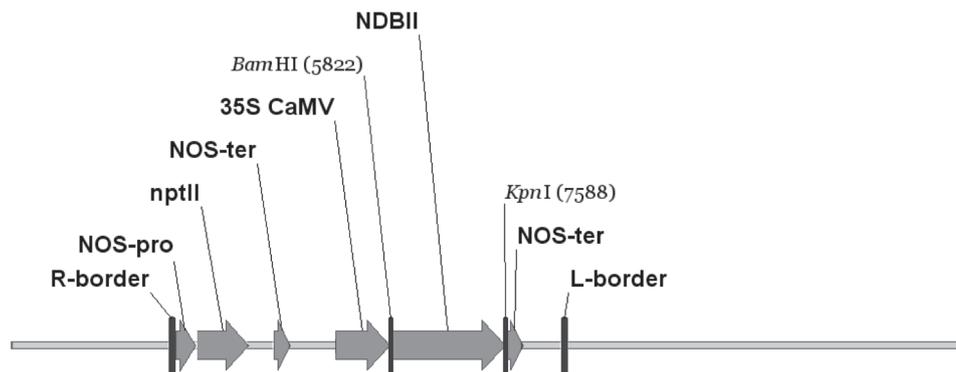


Рис. 1. Схема векторной конструкции pBI121\_NDB2: R-border, L-border – правый и левый концевые повторы области T-ДНК; NOS-pro – промотор нопалин-синтазы; *nptII* – ген неомицинофосфотрансферазы II типа; NOS-ter – терминатор нопалин-синтазы; 35S CaMV – 35S РНК CaMV промотор; *NDBII* – ген «внешней» нефосфорилирующей НАДФ-Н дегидрогеназы; *BamHI*, *KpnI* – сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции

Fig. 1. Scheme pBI121\_NDB2 vector construct: R-border, L-border – left and right terminal repeats of T-DNA region; NOS-pro – nopaline synthase promoter; *nptII* – neomycin phosphotransferase gene II type; NOS-ter – the terminator of the nopaline synthase; 35S CaMV – 35S RNA promoter of CaMV; *NDBII* – gene “external” non-phosphorylating NADP-H dehydrogenase; *BamHI*, *KpnI* – recognition sites for restriction endonucleases

последовательности векторной конструкции и референсной последовательности показал их полное соответствие и отсутствие нуклеотидных замен.

Выбор вектора pBI121 для переноса гетерологичного гена *ndb2* в растительный геном обусловлен рядом факторов. Данный вектор содержит LB и RB концевые повторы области T-ДНК, по которым происходит интеграция области T-ДНК в геном растений. Это делает его наиболее подходящим для проведения агробактериальной трансформации широкого ряда модельных и культурных растений с высокой эффективностью. Промотор 35S РНК CaMV обеспечивает конститутивную экспрессию гетерологичного гена во всех тканях растения, что должно привести к повышению общего содержания целевого фермента – «внешней» нефосфорилирующей NADH дегидрогеназы. Наличие гена *nptII* под контролем NOS-промотора обеспечивает устойчивость к антибиотику канамицину, что позволит проводить первичный отбор регенерантов на селективной питательной среде.

*Создание и отбор трансгенных растений табака с геном ndb2.* Для трансформации растений табака *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SR1* использована целевая векторная конструкция pBI121\_NDB2, несущая ген *ndb2*, и исходный вектор pBI121 в качестве контроля. Рекомбинантные штаммы с векторными конструкциями pBI121\_NDB2 и pBI121 получены на основе агробактериального штамма *A. tumefaciens* AGL0 методом трехродительского скрещивания. Отбор агробактериального клона с целевой векторной конструкцией проводили на питательной среде LB с добавлением селективирующих агентов канамицина и рифампицина. Наличие целевой векторной конструкции в агробактериальном штамме подтверждено методом ПЦР со специфичными праймерами. Полученные штаммы использованы затем в экспериментах по агробактериальной трансформации растений.

В результате эксперимента по агробактериальной трансформации растений табака вектором pBI121\_NDB2 из каллусной культуры получено 57 регенерантов. При достижении размера 2–3 см регенеранты срезали с каллуса и переносили на среды с селективирующим агентом для укоренения. В процессе культивирования 28 регенерантов (49,1 % от общего количества полученных) образовывали корни и развивались на средах с селективным агентом канамицином. Отобранные регенеранты использовали для дальнейшего молекулярно-генетического анализа.

В результате контрольной трансформации с исходным вектором pBI121 из каллусной культуры получено 32 регенеранта, 18 (56,3 %) из которых укоренились на селективной среде с канамицином. Кроме того, в качестве контрольных получены регенеранты растений исходного сорта, которые прошли все этапы трансформации, исключая сокультивирование с агробактериями.

Регенеранты нетрансформированных контрольных растений и растения исходного сорта не образовывали корни на селективной среде и погибали.

Образование у регенерантов корней на средах с канамицином может свидетельствовать об интеграции в их геном целевой гетерологичной последовательности и экспрессии гена *nptII*. Однако это не позволяет считать их истинными трансгенными растениями, поскольку устойчивость к антибиотику может развиться в результате соматической изменчивости или по иным причинам [24]. Для подтверждения интеграции гетерологичной вставки необходимо проведение молекулярно-генетического анализа.

*Молекулярно-генетический анализ трансгенных растений с геном ndb2.* Для молекулярно-генетического анализа использована ДНК отобранных первичных регенерантов. Наличие гетерологичной инсерции определяли методом ПЦР.

Первоначально для оценки качества выделенной ДНК регенерантов проводили ПЦР с олигонуклеотидами QtRNA<sub>LeuF</sub> и QtRNA<sub>LeuR</sub> (см. таблицу), специфичными к растительному гену, кодирующему лейциновую тРНК. Амплификация целевого фрагмента размером 192 п. н. свидетельствует о наличии необходимого количества и качества растительной ДНК для проведения ПЦР с олигонуклеотидами, специфичными к последовательности гетерологичной инсерции.

Для детекции последовательности промотора *35S PHK CaMV* проведена ПЦР с олигонуклеотидами 35SEF и 35SER (см. таблицу). Амплификация фрагмента размером 125 п. н. свидетельствует о присутствии данной последовательности в исследуемой ДНК.

Для определения целостности перенесенной кассеты, несущей промотор *35S PHK CaMV*, целевой ген *ndb2* и *NOS*-терминатор, проведена ПЦР с олигонуклеотидами 35SEF и Tnos-R (см. таблицу). Амплификация фрагмента размером 2234 п. н. подтверждает интеграцию гетерологичной ДНК в геном растений табака.

Таким образом, в результате проведенного молекулярно-генетического анализа установлено, что агробактериальная трансформация листовых эксплантов векторной конструкцией pBI121\_NDB2 приводит к переносу целевой последовательности, несущей ген *ndb2* под контролем промотора *35S PHK CaMV*, в геном растений табака.

Следует отметить, что наличие чужеродного гена в растительном геноме не означает, что гетерологичный ген будет функционировать или обеспечивать синтез белка в необходимом количестве. На эффективность экспрессии гена, кроме его нуклеотидного состава и регуляторных элементов, значительное влияние оказывает место интеграции Т-ДНК области в геном растений. В частности, интеграция гетерологичного гена в область гетерохроматина может привести к замолчанию трансгена. Кроме того, в процессе развития растений возможно изменение уровня экспрессии трансгена или полная инактивация гетерологичного гена [25, 26].

С целью подтверждения экспрессии гетерологичного гена в растениях проведена ОТ-ПЦР суммарной мРНК трансформантов. Полученную кДНК использовали при постановке ПЦР со специфичными олигонуклеотидами к гену *ndb2*. Присутствие целевого амплифицированного фрагмента подтверждает факт экспрессии гетерологичного гена в растительной ткани (рис. 2).



Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов (2234 п. н.), выявленных при амплификации кДНК регенерантов табака. М – маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); 1–4 и 6–9 – анализируемые линии; 5 и 10 – исходные растения табака; 11 – плазмида pBI121\_NDB2

Fig. 2. Electrophoregram PCR product (2234 bp) was identified by the amplification of cDNA of tobacco regenerants. M – molecular weight marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); 1–4 and 6–9 – line analyzed; 5 and 10 – basic tobacco plants; 11 – plasmid pBI121\_NDB2

**Заклучение.** Проведено клонирование и анализ нуклеотидной последовательности нативного гена *ndb2 Arabidopsis thaliana*, выполнена модификация его 5'- и 3'-концов с целью повышения уровня синтеза целевого белкового продукта. Создана векторная конструкция pBI121\_NDB2, несущая ген *ndb2* под контролем промотора *35S PHK CaMV*.

Показано, что перенос Т-ДНК векторных конструкций pBI121\_NDB2 и pBI121 приводит к формированию устойчивости к антибиотику канамицину и позволяет проводить селективный отбор первичных трансформантов растений. Установлено, что созданная векторная конструкция pBI121\_NDB2 осуществляет перенос гетерологичной вставки в растительный геном и приводит к экспрессии целевого гена.

Дальнейший анализ созданных трансгенных растений позволит выявить влияние экспрессии гена *ndb2* на внутриклеточное содержание АФК, а также возможные изменения активности путей электронного транспорта митохондрий, генерацию ими мембранного потенциала, активность других альтернативных ферментов дыхательной цепи и цитохромного пути электронного транспорта. Не исключено влияние измененной экспрессии *ndb2* на экспрессию стрессовых генов и реализацию программы стресс-сигналинга и адаптации, а также на возможность повышения устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам.

### Благодарность

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов БРФФИ Б16Р-050 и РФФИ № 16-54-00070.

### Acknowledgement

The work was supported by grants of Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research B16R-050 and Russian Foundation for Basic Research no. 16-54-00070.

### Список использованных источников

1. *Arabidopsis* genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light / A. M. Michalecka [et al.] // *Plant Physiol.* – 2003. – Vol. 133. – P. 642–652.
2. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants / A. H. Millar [et al.] // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2011. – Vol. 62. – P. 79–104.
3. Moller, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species / I. M. Moller // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 52. – P. 561–591.
4. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana* / R. Clifton [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 58. – P. 193–212.
5. The metabolic response of heterotrophic *Arabidopsis* cells to oxidative stress / C. J. Baxter [et al.] // *Plant Physiol.* – 2007. – Vol. 143. – P. 312–325.
6. Yoshida, K. Differential gene expression profiles of the mitochondrial respiratory components in illuminated *Arabidopsis* leaves / K. Yoshida, K. Noguchi // *Plant Cell Physiol.* – 2009. – Vol. 50. – P. 1449–1462.
7. The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress / S. Amirsadeghi [et al.] // *Physiol. Plant.* – 2007. – Vol. 129. – P. 253–266.
8. Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* modifies growth and metabolism, but not high light stimulation of mitochondrial electron transport / S. Wallström [et al.] // *Plant & Cell Physiol.* – 2014. – Vol. 55, N 5. – P. 881–896.
9. Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и «внешняя» NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозостойкости проростков озимой пшеницы / О. И. Грабельных [и др.] // *Биохимия.* – 2014. – Т. 79, № 6. – С. 645–660.
10. Alterations in the mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenase NDB4 lead to changes in mitochondrial electron transport chain composition, plant growth and response to oxidative stress / C. Smith [et al.] // *Plant Cell Phys.* – 2011. – Vol. 52. – P. 1222–1237.
11. Development and validation of a 48-target analytical method for high-throughput monitoring of genetically modified organisms / Li Xiaofei [et al.] // *Sci. reports.* – 2015. – Vol. 5. – P. 1–11.
12. Collaborative study of a T-nos Real-Time PCR method for screening of genetically modified organisms in food products / R. Reiting [et al.] // *J. Verbr. Lebensm.* – 2007. – Vol. 2. – P. 116–121.
13. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA / P. Taberlet [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 1991. – Vol. 17. – P. 1105–1109.
14. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, D. W. Russell. – New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001. – 2344 p.
15. Current protocols in molecular biology / F. M. Ausubel [et al.]. – New York: Greene Pub. Assoc. and Wiley-Interscience, 2004. – 561 p.
16. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants / P.-Y. Chen [et al.] // *Mol. Breeding.* – 2003. – Vol. 11, N 4. – P. 287–293.
17. Картель, Н. А. Генетические основы селекции растений: в 4 т. Т. 4. Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия / Н. А. Картель; науч. ред.: А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. – Минск: Беларус. наука, 2014. – 653 с.
18. Савчин, Д. В. Создание и анализ трансгенных растений картофеля и табака с геном *gox Penicillium funiculosum* / Д. В. Савчин, А. С. Панюш, Н. А. Картель // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2012. – № 4. – С. 16–19.

19. Савчин, Д. В. Генетическая трансформация растений векторными конструкциями с геном *gox Penicillium funiculosum* / Д. В. Савчин, А. С. Панюш, Н. А. Картель // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии Нац. акад. наук Беларуси. – Минск, 2011. – Т. 12. – С. 49–55.
20. *Arabidopsis thaliana* gene NDB2 [Электронный ресурс] / NCBI. – 2016. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=ara&q=NDB2>. – Дата доступа: 25.10.2015.
21. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes / F. J. Perlak [et al.] // Proc. of the Nat. Acad. of Sciences of USA. – 1991. – Vol. 88, N 8. – P. 3324–3328.
22. Graciet E. Structure and evolutionary conservation of N-end rule pathway / E. Graciet, F. Mesiti and F. Wellmer // The Plant J. – 2010. – Vol. 61. – P. 741–751.
23. Kozak, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes / M. Kozak // Cell. – 1986. – Vol. 44. – P. 283–292.
24. Маренкова, Т. В. Мозаичный характер экспрессии трансгенов у растений / Т. В. Маренкова, Д. Б. Логинова, Е. В. Дейнеко // Генетика. – 2012. – Т. 48, № 3. – С. 293–306.
25. Matzke, M. A. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates / M. A. Matzke, M. F. Mette, A. J. Matzke // Plant Mol. Biol. – 2000. – Vol. 43, N 2/3. – P. 401–415.
26. Дейнеко, Е. В. Изучение экспрессии гетерологичных и собственных генов у трансгенных растений: на примере *Nicotiana tabacum* L.: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.15 – кинетика и катализ / Е. В. Дейнеко. – Новосибирск, 2004. – 198 с.

## References

1. Michalecka, A. M., Svensson, A. S., Johansson, F. I., Agius, S. C., Johanson, U., Brennicke, A., Binder, S. and Rasmusson, A. G. (2003), “Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light”, *Plant Physiology*, vol. 133, pp. 642–652.
2. Millar, A. H., Whelan, J., Soole, K. L. and Day, D. A. (2011) “Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants”, *Annual Reviews Plant Biology*, vol. 62, pp. 79–104.
3. Moller, I. M. (2001), “Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species”, *Annual Reviews Plant Biology*, vol. 52, pp. 561–591.
4. Clifton, R., Lister, R., Parker, K. L., Sappl, P. G., Elhafez, D., Millar, A. H., Day, D. A. and Whelan, J. (2005), “Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*”, *Plant Molecular Biology*, vol. 58, pp. 193–212.
5. Baxter, C. J., Redestig, H., Schauer, N., Rebers, D., Patil, K. R., Nielsen, J., Selbig, J., Liu, J., Fernie, A. R. and Sweetlove, L. J. (2007), “The metabolic response of heterotrophic *Arabidopsis* cells to oxidative stress”, *Plant Physiology*, vol. 143, pp. 312–325.
6. Yoshida, K. and Noguchi, K. (2009), “Differential gene expression profiles of the mitochondrial respiratory components in illuminated *Arabidopsis* leaves”, *Plant and Cell Physiology*, vol. 50, pp. 1449–1462.
7. Amirsadeghi, S., Robson, C. A. and Vanlerberghe, G. C. (2007), “The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress”, *Physiologia Plantarum*, vol. 129, pp. 253–266.
8. Wallstrom, S. V., Florez-Sarasa, I., Araujo, W. L., Escobar, M. A., Geisler, D. A., Aidemark, M., Lager, I., Fernie, A. R., Ribas-Carbo, M. and Rasmusson A. G. (2014), “Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* modifies growth and metabolism, but not high light stimulation of mitochondrial electron transport”, *Plant and Cell Physiology*, vol. 55, pp. 881–896.
9. Grabelnych, O. I., Borovik, O. A., Tauson, E. L., Pobezhimova, T. P., Katyshev, A. I., Pavlovskaya, N. S., Koroleva, N. A., Lyubushkina, I. V., Borovskii, G. B., Voinikov, V. K., Bashmakov, V. Yu. and Popov, V. N. (2014), “Mitochondrial energy-dissipating systems (alternative oxidase, uncoupling proteins, and external NADH dehydrogenase) are involved in development of frost-resistance of winter wheat seedlings”, *Biokhimiya* [Biochemistry], vol. 79, pp. 645–660.
10. Smith, C., Barther, M., Melino, V., Smith, P., Day, D. and Soole, K. (2001), “Alterations in the mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenase NDB4 lead to changes in mitochondrial electron transport chain composition, plant growth and response to oxidative stress”, *Plant and Cell Physiology*, vol. 52, pp. 1222–1237.
11. Li, X., Wu, Y., Li, J., Li, Y., Long, L., Li, F. and Wu, G. (2015), “Development and validation of a 48-target analytical method for high-throughput monitoring of genetically modified organisms”, *Scientific reports*, vol. 5, pp. 1–11.
12. Reiting, R., Broll, H., Waiblinger, H.-U. and Grohmann, L. (2007), “Collaborative Study of a T-nos Real-Time PCR Method for Screening of Genetically Modified Organisms in Food Products”, *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, vol. 2, pp. 116–121.
13. Taberlet, P., Girelly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. (1991), “Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA”, *Plant Molecular Biology*, vol. 17, pp. 1105–1109.
14. Sambrook, J. (2001), *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, US.
15. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G. and Struhl, K. (2004), *Current protocols in molecular biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience John Wiley and Sons, New York, US.
16. Chen, P. Y., Wang, C. K., Soong, S. C. and To, K. Y. (2003), “Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants”, *Molecular Breeding*, vol. 11, no. 4, pp. 287–293.

17. Kartel, N. A. *Geneticheskie osnovy seleksii rastenii. Tom 4. Biotekhnologiya v seleksii rastenii. Genomika i geneticheskaya inzheneriya* [Genetic basis of plant breeding: Biotechnology in plant breeding. Vol. 4. Genomics and genetic engineering], Belaruskaya navuka, Minsk, BY.
18. Sauchyn, D. V., Panush, A. S. and Kartel, N. A. (2012), “Transgenic potato and tobacco plants with *gox* gene of *Penicillium funiculosum* development and analysis”, *Vesti Natsyyanalnai Akademii Navuk Belarusi, Ser. Biyal. Navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], no. 4, pp. 16–19.
19. Sauchyn, D. V., Panush, A. S. and Kartel, N. A. (2011), “Genetic transformation of plants using vector constructions with *Penicillium funiculosum* GOX gene”, *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika: sbornik nauchnykh trudov* [Molecular and Applied Genetics: collection of scientific works], Pravo i ekonomika, Minsk, BY, vol. 12, pp. 49–55.
20. NCBI (2016), *Arabidopsis thaliana* gene *NDB2*, Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=ara&q=NDB2> (Accessed 25.10.2015).
21. Perlak, F. J., Fuchs, R. L., Dean, D. A., McPherson, S. L. and Fischhoff, D. A. (1991), “Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 8, pp. 3324–3328.
22. Graciet, E., Mesiti, F. and Wellmer, F. (2010), “Structure and evolutionary conservation of N-end rule pathway”, *The Plant Journal*, vol. 61, pp. 741–751.
23. Kozak, M. (1986), “Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes”, *Cell*, vol. 44, pp. 283–292.
24. Marenkova, T. V., Loginova, D. B. and Deineko, E. V. (2012), “Mosaic patterns of transgene expression in plants”, *Genetika* [Genetics], vol. 48, no. 3, pp. 293–306.
25. Matzke, M. A., Mette, M. F. and Matzke, A. J. (2000), “Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates”, *Plant Molecular Biology*, vol. 43, no. 2/3, pp. 401–415.
26. Deineko, E. V. (2004) “Study of the expression of heterologous genes and their own transgenic plants: for example, *Nicotiana tabacum* L.”, Ph. D. Thesis, Kinetics and Catalysis, Institut tsitologii i genetiki Sibirskogo otdeleniya Rossiikoi akademii nauk, Novosibirsk, RU.

### Информация об авторах

Савчин Дмитрий Васильевич – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sauchyndzmitry@gmail.com

Кузмицкая Полина Викторовна – науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: 1401polina@gmail.com

Урбанович Оксана Юрьевна – д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: O.Urbanovich@igc.by

Федосеева Ирина Владимировна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН (ул. Лермонтова, 132, 664033, г. Иркутск, Российская Федерация)

Боровский Геннадий Борисович – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН (ул. Лермонтова, 132, 664033, г. Иркутск, Российская Федерация). E-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

### Для цитирования

Создание трансгенных растений *Nicotiana tabacum* с геном *ndb2 Arabidopsis thaliana* для изучения ответа на стресс / Д. В. Савчин [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. біял. навук. – 2017. – № 1. – С. 54–61.

### Information about the authors

Sauchyn Dzmitry Vasilievich – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Science of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sauchyndzmitry@gmail.com

Kuzmitskaya Polina Viktorovna – Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Science of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: 1401polina@gmail.com

Urbanovich Oksana Yurevna – D. Sc. (Biol.), the Head of the laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Science of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: O.Urbanovich@igc.by

Fedoseeva Irina Vladimirovna – Ph. D. (Biol.), Researcher. Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (132, Lermontov Str., 664033, Irkutsk, Russian Federation)

Borovskii Genadiy Borisovich – D. Sc. (Biol.), Professor, Chief researcher. Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (132, Lermontov Str., 664033, Irkutsk, Russian Federation). E-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

### For citation

Sauchyn, D. V., Kuzmitskaya, P. V., Urbanovich, O. Yu., Borovskii, G. B. and Fedoseeva, I. V. (2017), “The creation of transgenic plants *Nicotiana tabacum* with gene *ndb2 Arabidopsis thaliana* to study response to stress”, *Proceedings of the National Academy of Science of Belarus, biological series*, 2017, no. 1, pp. 54–61.

**О. А. Межнина, О. Ю. Урбанович**

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

## **ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ СОРТОВ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ (*RIBES NIGRUM*) В БЕЛАРУСИ**

Исследование генетического разнообразия выращиваемых в Беларуси сортов смородины черной (*Ribes nigrum*) с использованием 7 маркеров-локусов микросателлитных последовательностей показало, что современные сорта белорусской селекции генетически тесно связаны с сортами селекции других стран. Количество аллелей в изученных локусах составило от 3 до 11. Среднее количество уникальных генотипов на маркер среди 60 образцов – 16,3. Дискриминационная сила маркеров варьировалась от 0,5 до 0,87 и в среднем составила 0,71. Все маркеры имеют достаточно высокую диагностическую ценность и позволяют проводить идентификацию на молекулярном уровне, поэтому могут быть рекомендованы для ДНК-идентификации сортов смородины черной.

*Ключевые слова:* смородина черная, SSR-маркеры, генетическое разнообразие, ДНК-идентификация.

**O. A. Mezhnina, O. Yu. Urbanovich**

*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

## **GENETIC VARIABILITY OF BLACCURRANT VARIETIES (*RIBES NIGRUM*) IN BELARUS**

The study of genetic variability of *Ribes nigrum* varieties grown in Belarus with using of 7 microsatellite markers showed that modern Belarussian varieties have close genetic relationship with foreign varieties. The numbers of alleles in the studied loci were from 3 to 11. The average number of unique genotype among 60 samples was 16.3. The discrimination power of markers varied from 0.5 to 0.87 and the mean value was 0.71. All markers possess rather high diagnostic value and allow to identify black currant varieties at the molecular level and can be recommended for DNA-identification of those cultures.

*Keywords:* black currant, SSR-markers, genetic variability, DNA-identification.

**Введение.** Род смородина *Ribes* L. включает более 150 видов, распространенных в умеренных широтах Восточной и Северной Европы, Северной Америки, некоторые виды произрастают в Южной Америке и Северо-Восточной Африке [1]. Ранее род *Ribes* в систематической классификации относился к семейству Камнеломковые (Saxifragaceae), в настоящее время данный род относится к семейству Крыжовниковые (Grossulariaceae) [2, 3]. Коммерческий интерес представляют такие виды, как смородина черная (*Ribes nigrum* L.), смородина красная (*Ribes rubrum* L) и крыжовник (*Ribes uva-crispa* L.), некоторые виды используются в качестве декоративных растений (*Ribes aureum*, *Ribes sanguineum* Pursh.). В настоящее время селекция смородины направлена на создание высокоурожайных сортов с повышенным содержанием биологически активных компонентов в плодах (флавоноиды), устойчивых к основным болезням и вредителям [4]. При создании таких сортов полезным является знание генетического родства подбираемых для скрещивания пар, что не всегда возможно на основе систематических данных и морфологических признаков.

Для изучения генетического разнообразия смородины черной первоначально предложено несколько вариантов неспецифических молекулярных маркеров: RAPD [5–7], AFLP [8, 9], ISSR [6, 10]. Однако каждая из перечисленных систем идентификации имеет определенные проблемы с воспроизводимостью в различных лабораториях. Позднее разработаны EST-SSR- и SNP-маркеры [11, 12]. В 2002 г. учеными из Шотландского НИИ сельскохозяйственных культур предложен набор из 12 микросателлитных маркеров [13]. Результаты, полученные с помощью SSR-маркеров, легко интерпретируются и воспроизводятся. Кроме того, микросателлитные маркеры наследуются по кодоминантному принципу и поэтому получили широкое применение для картирования генома и анализа генетической структуры популяции [14]. SSR-маркеры использовали

для оценки генетического разнообразия европейских представителей рода *Ribes* L. [15–17]. Полиморфизм сортов смородины черной из коллекции Всероссийского НИИ селекции плодовых культур (ВНИИСПК) оценен по 14 микросателлитным локусам [18]. Однако к настоящему времени не существует универсальной методики ДНК-идентификации смородины черной, а на молекулярном уровне изучено лишь ограниченное количество сортов. Сорты белорусской селекции остаются неисследованными. Не установлено, каким генетическим потенциалом они обладают и какие наборы маркеров эффективны для их идентификации.

Цель исследования – изучение генетического потенциала сортов смородины черной, культивируемых в Республике Беларусь, и выявление сета маркеров для их идентификации.

**Материалы и методы исследования.** Для молекулярного анализа была сформирована коллекция сортов смородины черной (*Ribes nigrum*), представленных РУП «Институт плодоводства». Коллекция включала 60 сортов, имеющих различное генетическое происхождение, в частности сорта селекции Беларуси, России, Украины, Швеции, Литвы.

Выделение тотальной ДНК из фрагмента листа отдельного растения осуществляли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific, ЕС), согласно методике производителя.

Для анализа полиморфизма по SSR-маркерам использовали мультиплексную ПЦР с 4 и 3 парами праймеров в одной реакции. Каждая пара имела специфическую флуоресцентную метку (FAM, R6G, TAMRA, ROX). В исследовании использовали SSR-маркеры, специфичные для генома *Ribes* L. Название SSR-маркеров, длина и количество выявляемых аллелей и их локализация в геноме приведены в табл. 1. Праймеры синтезированы компанией «Праймтех» (Беларусь).

Т а б л и ц а 1. Название SSR-маркеров, длина и количество выявляемых аллелей и их локализация в геноме

Table 1. The name of the SSR markers, the length and number of detected alleles and their localization in the genome

Локус	Размер аллеля, п. н.	К-во аллелей	Хромосома
g1-E03	233, 239 241, 243, 247, 254, 262, 270	8	1
g2-G12	167, 171, 173, 177, 179, 181, 183 185, 187, 189, 191	11	7
e1-001	144, 146, 148, 150, 152, 154, 160, 166	8	6
g1-M07	200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 220, 226, 230	11	1
g1-A01	209, 211, 213	3	5
g1-K04	284, 286, 292, 294, 298, 300	6	1
e3-B02	161, 163, 166, 183	4	5

Состав реакционной смеси (конечный объем 20 мкл) был следующий: 1 × ПЦР буфер с (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ смеси dNTP, 0,2 мкМ каждого из праймеров, 20–50 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы (Thermo scientific, ЕС). Реакцию ПЦР проводили по следующей программе: 1 цикл продолжительностью 4 мин при 94 °С; 35 циклов, включающих: 30 с при 94 °С, 45 с при 50 °С, 45 с при 72 °С; заключительная элонгация – 5 мин при 72 °С.

Разделение фрагментов ПЦР выполняли на секвенаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Размер фрагментов рассчитывали с помощью компьютерной программы GeneMapper® Software v4.1 относительно стандартных образцов ДНК известной длины. В качестве стандарта молекулярного веса использовали внутренний стандарт S450 («Синтол», РФ).

Частота встречаемости аллелей рассчитывалась как отношение полиморфных фрагментов к общему количеству выявляемых фрагментов амплификации для каждого маркера. Дендрограмма генетического сходства сортов получена с помощью программы Treescan [19] методом UPGMA, основываясь на коэффициенте генетического сходства Nei и Li [20]. Дискриминационную силу маркера (PD) рассчитывали по формуле  $PD = 1 - \sum (g_i)^2$ , где  $g_i$  – частота встречаемости  $i$ -го генотипа [21].

**Результаты и их обсуждение.** Состав аллелей локусов микросателлитных последовательностей определяли для 60 сортов смородины черной. Генетическое разнообразие оценивали с помощью 7 SSR-маркеров, расположенных на разных хромосомах в геноме *Ribes* L. Наименее полиморфными

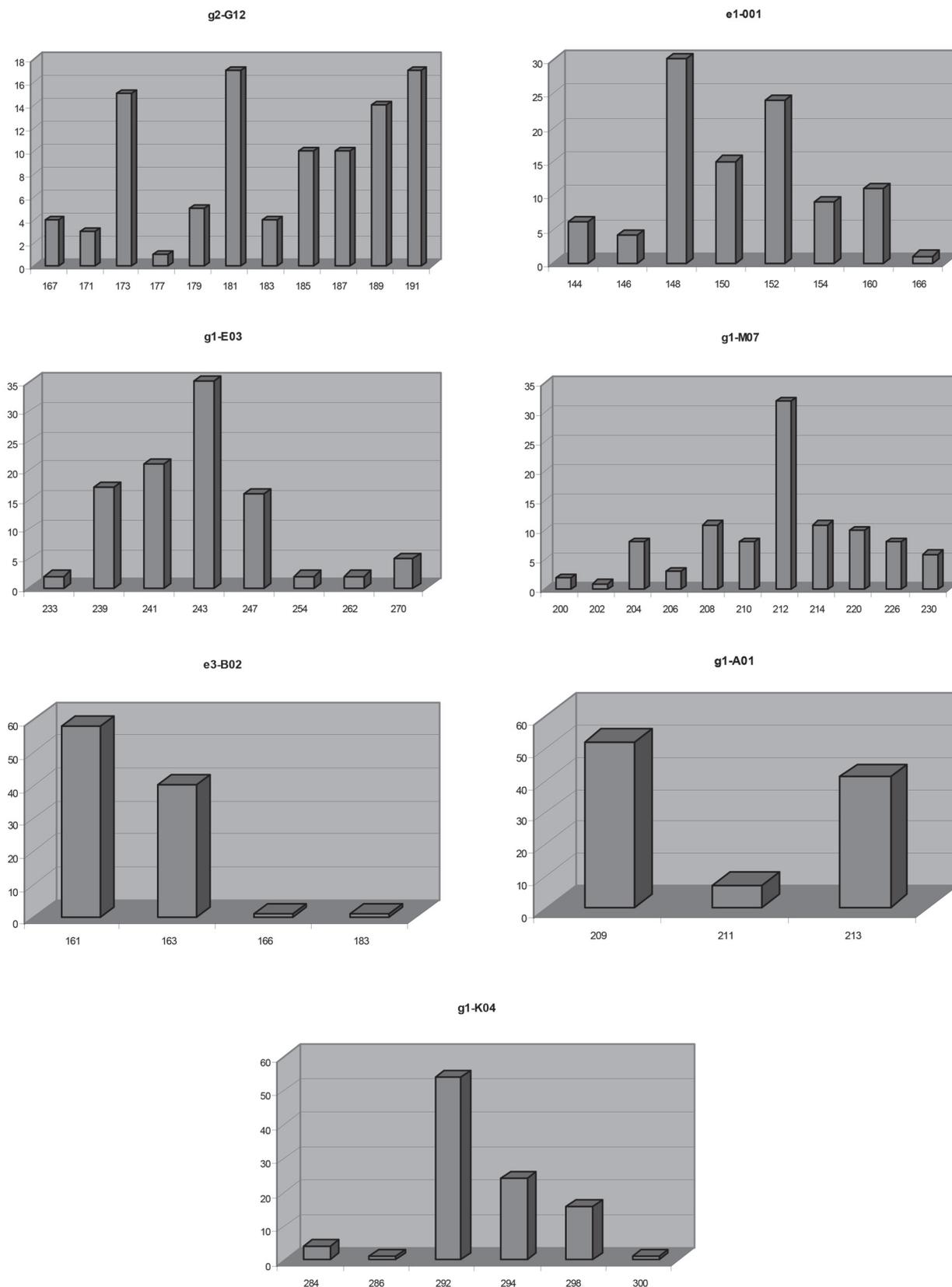


Рис. 1. Состав и частота встречаемости аллелей в локусах g2-G12, e1-001, g1-M07, e3-B02, g1-A01, g1-E03, g1-K04 среди 60 генотипов *Ribes nigrum*

Fig. 1. The composition and frequency of occurrence in the loci g2-G12, e1-001, g1-M07, e3-B02, g1-A01, g1-E03, g1-K04 among 60 genotypes of *Ribes nigrum*

оказались локусы e3-B02 и g1-A01. Количество обнаруженных в них аллелей составило 4 и 3 соответственно. В локусе g1-K04 выявлено 6 аллелей, в локусах g1-E03 и e1-001 – 8. Максимальное количество аллелей выявлено в локусах g2-G12 и g1-M07 – 11 (табл. 1). В общей сложности среди 60 сортов смородины черной с использованием 7 SSR-маркеров выявлен 51 полиморфный аллель. Среднее значение количества аллелей на локус составило 7,3. При этом сорта белорусской селекции оказались менее полиморфными (в среднем 4,7 аллеля на локус), чем сорта зарубежной селекции (в среднем 7,1 аллеля на локус). Наблюдаемые различия могут быть связаны с тем, что количество исследованных белорусских сортов было значительно меньше, чем зарубежных, – 10 и 50 соответственно. Этот же показатель среди европейских представителей рода *Ribes L.*, определенный с использованием 11 SRR-маркеров, составил 10,4 [17]. Среднее количество аллелей на локус, определенное с помощью 14 маркеров для 27 образцов смородины черной из коллекции ВНИИСПК, составило 4,9 [18]. Выявленное в нашем исследовании количество аллелей отличается от количества аллелей, полученных в предыдущих исследованиях, как в большую, так и в меньшую сторону, так как использованы выборки, различающиеся по объему и составу генотипов. Для каждого локуса определялись длина аллелей у конкретного сорта и количество полиморфных фрагментов. Частота встречаемости аллелей среди исследованных образцов представлена на рис. 1.

В общей сложности у 60 образцов выявлено 11 редких аллелей (у 2 % и менее образцов). В зависимости от маркера количество редких аллелей составило от 1 до 3. Для отдельных аллелей частота встречаемости была очень высокой. Так, в локусе e3-B02 аллель длиной 161 п. н. был представлен в геноме у 58 % исследованных образцов, в локусе g1-K04 аллель длиной 292 п. н. встречался у 52 % образцов. При этом общее количество аллелей, определенное с помощью данных маркеров, составило 4 и 3 соответственно.

Данные о количестве и доле уникальных генотипов, дискриминационной силе маркеров для 60 сортов смородины черной приведены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Количество и доля уникальных генотипов, дискриминационная сила маркера (PD), рассчитанные для 60 сортов смородины черной

Table 2. The number and proportion of unique genotypes, the discriminatory power of the marker (PD) is calculated for the 60 varieties of black currant

SSR-маркер	К-во полиморфных фрагментов	К-во уникальных генотипов	Доля уникальных генотипов, %	PD
g2-G12	11	31	52	0,87
e1-001	9	17	28	0,8
g1-M07	11	27	45	0,84
e3-B02	6	5	8	0,5
g1-A01	5	4	7	0,55
g1-E03	10	19	32	0,77
g1-K04	8	11	18	0,62
Среднее значение	8,6	16,3	27	0,71

Среди сортов смородины черной максимальное количество уникальных генотипов (31) выявлено с помощью маркера g2-G12, минимальное – при использовании маркеров e3-B02 и g1-A01 (5 и 4 соответственно). Среднее значение количества уникальных генотипов для 7 маркеров составило 16,3. Дискриминационная сила маркеров достаточно высокая – от 0,5 для маркера e3-B02 до 0,87 для маркера g2-G12, среднее значение PD для 7 маркеров – 0,71, что говорит о высокой диагностической ценности отобранных SSR-маркеров.

На основе рассчитанных генетических дистанций между сортами проведен кластерный анализ и сформировано единое консенсусное дерево, в каждом узле которого указан процент поддержки данного кластера (рис. 2).

Как видно из представленной дендрограммы, все сорта отличаются друг от друга на генетическом уровне и имеют уникальный состав аллелей в локусах микросателлитных последовательностей. Генетические расстояния между образцами колеблются в пределах от 0,15 до 0,61.

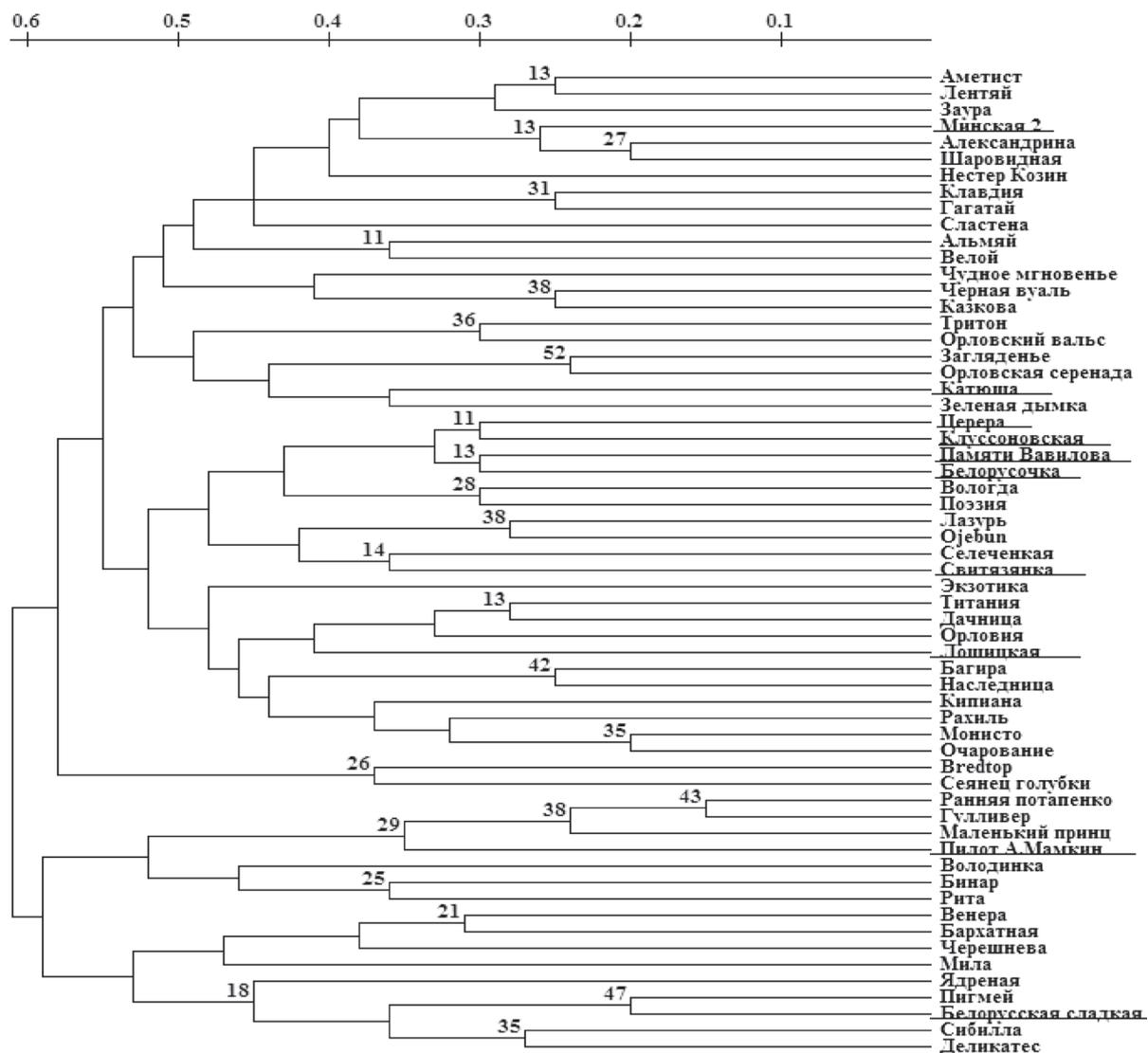


Рис. 2. Дендрограмма генетического сходства сортов смородины черной, построенная на основе результатов SSR-анализа. Подчеркиванием обозначены сорта белорусской селекции

Fig. 2. Dendrogram of genetic similarity of cultivars of black currant, built on the basis of the results of SSR-analysis. Varieties of the Belarusian selection are underlined

Культурные сорта смородины черной достаточно разнообразны и формируют отдельные кластеры, в которые входят сорта как белорусской, так и зарубежной селекции. Один из кластеров объединяет группу сортов белорусской селекции, таких как Церера, Клуссоновская, Памяти Вавилова и Белорусочка, имеющих в своей родословной сорт Паулинка. Сорта Церера, Клуссоновская и Белорусочка произошли от одной комбинации скрещивания (Паулинка × Пилот Александр Мамкин). При создании сорта Памяти Вавилова использована следующая комбинация скрещивания: Паулинка × Белорусская сладкая.

Состав аллелей в анализируемых локусах позволяет получить уникальную формулу сорта и создать его паспорт. Молекулярно-генетические паспорта 10 сортов смородины черной белорусской селекции приведены в табл. 3.

При необходимости предложенный набор маркеров может быть дополнен или изменен. В целом, современные сорта смородины черной белорусской селекции генетически связаны с сортами зарубежной селекции. Это является следствием тенденции селекционного процесса, который направлен на сочетание в новых сортах лучших качеств местных и иностранных сортов.

Таблица 3. Молекулярно-генетические паспорта сортов смородины черной белорусской селекции

Table 3. Molecular-genetic passports of Belarusian black currant varieties

Название сорта	Длина аллелей в SSR-локусах, п. н.						
	g2G12	e1001	g1M07	E3B02	g1A01	g1E03	K104
Лошицкая	167, 179	144, 148	208	161, 163	209, 213	241	292
Пилот Александр Мамкин	181, 187	154, 160	212, 226	161	213	233, 243	286, 298
Памяти Вавилова	181	148, 152	204, 212	161	209	239, 241	292
Белорусочка	181	148, 152	212, 214	163	209	241, 247	292
Свитязянка	181	148	212, 214	161	209	243, 247	292, 298
Церера	167, 181	148, 152	208, 212	161, 163	209	241, 270	292, 294
Клуссоновская	181	150, 152	212	161	209, 211	241	292, 294
Минская 2	181, 191	148, 150	208, 214	161, 163	213	239, 243	292, 294
Белорусская сладкая	187, 191	150, 160	212, 230	161	209	243, 270	292, 294
Катюша	179	148, 152	210	163	209	239, 243	292

Все сорта смородины черной, несмотря на достаточно высокое генетическое разнообразие данной культуры, позволяет различить относительно небольшой набор из 7 SSR-маркеров. При разработке метода ДНК-идентификации для других культур, характеризующихся меньшим генетическим разнообразием, использовали значительно большее количество маркеров. Так, например, для идентификации сортов ячменя применяли набор из 17 SSR-маркеров [22], для кукурузы – 51 [23], для миндаля – 16 [24].

Таким образом, сформированный набор SSR-маркеров позволил провести идентификацию генотипов представителей рода *Ribes* L. При выборе данного набора учитывали уровень информативности каждого маркера, частоту встречаемости аллелей среди сортов, а также удобство визуализации и анализа продуктов амплификации. Метод SSR-анализа с использованием указанного набора маркеров может успешно применяться для идентификации смородины черной на молекулярном уровне.

**Заключение.** На основании анализа полиморфизма SSR-аллелей сформирован набор из 7 маркеров, позволяющий проводить генетическую идентификацию сортов смородины черной. Маркеры расположены на разных хромосомах генома *Ribes* L., что дает возможность оценить полиморфизм различных областей. Показатели информативности для выбранных маркеров имеют достаточно высокие значения в сравнении с описанными в литературе. Среднее количество аллелей на locus, определенное с помощью данного набора, составило 8,6. Среднее количество уникальных генотипов в расчете на маркер среди 60 образцов – 16,3. Значение дискриминационной силы для всех маркеров высокое и в среднем составляет 0,71. Таким образом, предложенный набор SSR-маркеров может применяться для идентификации возделываемых в Республике Беларусь сортов смородины черной, охраны авторских прав селекционных учреждений, сохранения уникального коллекционного материала и др.

#### Список использованных источников

- Shultheis, L. M. Molecular phylogeny and biogeography of *Ribes* (Grossulariaceae), with an emphasis on gooseberries (subg. *Grossularia*) / L. M. Shultheis, M. J. Donoghue // Systematic Botany. – 2004. – Vol. 29. – P. 77–96.
- Cronquist, A. The Evolution and Classification of Flowering Plants / A. Cronquist; The New York Botanical Garden. – New York: [s. n.], 1988. – 555 p.
- Sinnot, Q. P. A reversion of *Ribes* L. Subg. *Grossularia* (Mill.) pers. sect. *Grossularia* (Mill.) Nutt. (Grossulariaceae) in North America / Q. P. Sinnot // Rhodora. – 1985. – Vol. 87. – P. 198–286.
- Brennan, R. M. Currants and Gooseberries / R. M. Brennan; in Hancock, J. F. (ed.) // Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics. – [S. l.], 2008. – P. 177–196.
- Korbin, M. Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR / M. Korbin, A. Kuras, E. Zurawicz // Mol. Biol. Lett. – 2002. – Vol. 7. – P. 785–794.
- Lanham, P. G. Genetic diversity within a secondary pool for *Ribes nigrum* L. revealed by RAPD and ISSR markers / P. G. Lanham, A. Korycinska, R. M. Brennan // J. Hort. Sci. Biotech. – 2000. – Vol. 75. – P. 371–375.
- Lanham, P. Fingerprinting of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars using RAAPD analyses / P. Lanham, R. M. Brennan, R. J. McNicol // Theor. Appl. Genet. – 1995. – Vol. 90. – P. 166–172.

8. Brennan, R. M. Future perspectives in black currant breeding / R. M. Brennan, S. L. Gordon // *Acta Hort.* – 2002. – Vol. 585. – P. 39–45.
9. De Mattia, F. Chloroplast and nuclear DNA markers to characterize cultivated and spontaneous *Ribes* / F. De Mattia [et al.] // *Plant Biosyst.* – 2008. – Vol. 142, N 2. – P. 204–212.
10. Lanham, P. G. Genetic characterization of gooseberry (*Ribes* subgenus *Grossularia*) germplasm using RAPD, ISSR and AFLP markers / P. G. Lanham, R. M. Brennan // *J. Hort. Sci.* – 1999. – Vol. 74. – P. 361–366.
11. The development of a genetic linkage map of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and the identification of regions associated with key fruit quality and agronomic traits / R. M. Brennan [et al.] // *Euphytica.* – 2008. – Vol. 161. – P. 19–34.
12. Identification, utilisation and mapping of novel transcriptome-based markers from blackcurrant (*Ribes nigrum*) / J. R. Russell [et al.] // *BMC Plant Biol.* – 2011. – Vol. 10. – P. 147–157.
13. Development and characterisation of SSR markers in *Ribes* species / R.M. Brennan [et al.] // *Mol. Ecol. Notes.* – 2002. – Vol. 2. – P. 327–330.
14. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants / R. K. Kalia [et al.] // *Euphytica.* – 2011. – Vol. 177, N 3. – P. 309–314.
15. Establishment of molecular markers for germplasm management in a worldwide provenance *Ribes* spp. collection / L. Palmieri [et al.] // *POJ.* – 2013. – Vol. 6, N 3. – P. 165–174.
16. Development of the Northern European *Ribes* core collection based on a microsatellite (SSR) marker diversity analysis / K. Antonius [et al.] // *Plant Genet. Res.* – 2012. – Vol. 10, N 1. – P. 70–73.
17. Microsatellite-based evaluation of *Ribes* spp. germplasm / M. Cavanna [et al.] // *Genome.* – 2009. – Vol. 52. – P. 839–848.
18. Microsatellite loci polymorphism in Russian black currant (*Ribes nigrum* L.) varieties from collection of All-Russian Research Institute of Breeding Fruit Crops / A. V. Pikunova [et al.] // *Agricult. Biol.* – 2015. – Vol. 50, N 1. – P. 46–54.
19. Van de Peer, Y. TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees / Y. Van de Peer, R. de Wachter // *Comput. Appl. Biosci.* – 1993. – Vol. 9. – P. 177–182.
20. Nei, M. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases / M. Nei, W. H. Li // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1979. – Vol. 76. – P. 5269–5273.
21. Kloosterman, A. D. PCR-amplification and detection of the human DIS 80 VNTR locus. Amplification condition, population genetics and application in forensic analysis / A. D. Kloosterman, B. Budowle, P. Daselaar // *Int. J. Leg. Med.* – 1993. – Vol. 105. – P. 257–264.
22. Sipahi, H. Genetic screening of Turkish barley genotypes using simple sequence repeat markers / H. Sipahi // *J. of Cell and Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 9, N 2. – P. 19–26.
23. Assessing temporal changes in genetic diversity of maize varieties using microsatellite markers / V. L. Clerc [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2005. – Vol. 110. – P. 294–302.
24. SSR allelic variation in almond (*Prunus dulcis* Mill.) / H. Xie [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2006. – Vol. 112. – P. 366–372.

## References

1. Shultheis, L. M. and Donoghue, M. J. (2004), “Molecular phylogeny and biogeography of *Ribes* (Grossulariaceae), with an emphasis on gooseberries (subg. *Grossularia*)”, *Systematic Botany*, vol. 29, pp. 77–96.
2. Cronquist, A. (1988), “*The Evolution and Classification of Flowering Plants*”, New York, US.
3. Sinnot, Q. P. (1985), “A reversion of *Ribes* L. Subg. *Grossularia* (Mill.) pers. sect. *Grossularia* (Mill. Nutt. (Grossulariaceae) in North America”, *Rhodora*, vol. 87, pp. 198–286.
4. Brennan, R. M. (2008), “Currants and Gooseberries”, in Hancock, J. F. (ed.), *Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics*, Springer, The Netherlands, NL, pp. 177–196.
5. Korbin, M., Kuras, A. and Zurawicz, E. (2002), “Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR”, *Molecular Biology Letters*, vol. 7, pp. 785–794.
6. Lanham, P. G., Korycinska, A. and Brennan, R. M. (2000), “Genetic diversity within a secondary pool for *Ribes nigrum* L. revealed by RAPD and ISSR markers”, *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, vol. 75, pp. 371–375.
7. Lanham, P., Brennan, R. M. and McNicol, R. J. (1995). “Fingerprinting of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars using RAPD analyses”, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 90, pp. 166–172.
8. Brennan, R. M. and Gordon, S. L. (2002), “Future perspectives in black currant breeding”, *Acta Horticulturae*, vol. 585, pp. 39–45.
9. De Mattia, F., Grassi, F., Imazio, S. and Labra, M. (2008), “Chloroplast and nuclear DNA markers to characterize cultivated and spontaneous *Ribes*”, *Plant Biosystems*, vol. 142, no. 2, pp. 204–212.
10. Lanham, P. G. and Brennan, R. M. (1999), “Genetic characterization of gooseberry (*Ribes* subgenus *Grossularia*) germplasm using RAPD, ISSR and AFLP markers”, *Journal of Horticultural Science*, vol. 74, pp. 361–366.
11. Brennan, R. M., Jorgensen, L., Hackett, C., Woodhead, M., Gordon, S. L. and Russel, J. (2008), “The development of a genetic linkage map of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and the identification of regions associated with key fruit quality and agronomic traits”, *Euphytica*, vol. 161, pp. 19–34.
12. Russell, J. R., Bayer, M., Booth, C., Cardle, L., Hackett, C. A., Hedley, P. E., Jorgensen, L., Morris, J. A. and Brennan, R. M. (2011), “Identification, utilisation and mapping of novel transcriptome-based markers from blackcurrant (*Ribes nigrum*)”, *BMC Plant Biology*, vol. 10, pp. 147–157.

13. Brennan, R. M., Jorgensen, L., Woodhead, M. and Russell, J. (2002), “Development and characterisation of SSR markers in *Ribes* species”, *Molecular Ecology Notes*, vol. 2, pp. 327–330.
14. Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R. and Ghawaa, A. K. (2011), “Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants”, *Euphytica*, vol. 177, no. 3, pp. 309–314.
15. Palmieri, L., Grando, M. S., Sordo, M., Grisenti, M., Martens, S. and Giongo, L. (2013), “Establishment of molecular markers for germplasm management in a worldwide provenance *Ribes* spp. collection”, *POJ*, vol. 6, no. 3, pp. 165–174.
16. Antonius, K., Karhu, S., Kaldmae, H., Lacis, G., Rugenius, R., Baniulis, D., Sasnauskas, A., Schulte, E., Kuras, A., Korbin, M., Gunnarsson, A., Werlemark, G., Ryliskis, D., Todam-Andersen, T., Kokk, L. and Jarve, K. (2012), “Development of the Northern European *Ribes* core collection based on a microsatellite (SSR) marker diversity analysis”, *Plant Genetic Resources*, vol. 10, no. 1, pp. 70–73.
17. Cavanna, M., Marioni, D. T., Beccaro, G. L. and Bounous, G. (2009), “Microsatellite-based evaluation of *Ribes* spp. germplasm”, *Genome*, vol. 52, pp. 839–848.
18. Pikunova, A. V., Knyazev, S. D., Bakhotskaya, A. Yu. and Kochumova, A. A. (2015), “Microsatellite loci polymorphism in Russian black currant (*Ribes nigrum* L.) varieties from collection of All-Russian Research Institute of Breeding Fruit Crops”, *Agricultural Biology*, vol. 50, no. 1, pp. 46–54.
19. Van de Peer, Y. and R. de Wachter (1993), “TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees”, *Computer Applications in the Biosciences*, vol. 9, pp. 177–182.
20. Nei, M., Li and W. H. (1979), “Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 76, pp. 5269–5273.
21. Kloosterman, A. D., Budowle, B. and Daselaar, P. (1993), “PCR-amplification and detection of the human DIS 80 VNTR locus. Amplification condition, population genetics and application in forensic analysis”, *International Journal of Legal Medicine*, vol. 105, pp. 257–264.
22. Sipahi, H. (2011), “Genetic screening of Turkish barley genotypes using simple sequence repeat markers”, *Journal of Cell and Molecular Biology*, vol. 9, no. 2, pp. 19–26.
23. Clerc, V. L., Bazante, F., Baril, C., Guiard, J. and Zhang, D. (2005), “Assessing temporal changes in genetic diversity of maize varieties using microsatellite markers”, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 110, pp. 294–302.
24. Xie, H., Sui, Y., Chang, F.Q., Xu, Y. and Ma, R. C. (2006), “SSR allelic variation in almond (*Prunus dulcis* Mill.)”, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 112, pp. 366–372.

### Информация об авторах

Межнина Ольга Анатольевна – мл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: olgamezhnina@gmail.com

Урбанович Оксана Юрьевна – д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: O.Urbanovich@igc.by

### Для цитирования

Межнина, О. А. Генетическое разнообразие сортов смородины черной (*Ribes nigrum*) в Беларуси / О. А. Межнина, О. Ю. Урбанович // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2017. – № 1. – С. 62–69.

### Information about the authors

Mezhnina Volha Anatol'evna – Junior researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olgamezhnina@gmail.com

Urbanovich Aksana Yuryevna – D. Sc. (Biol.), Head of the laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: O.Urbanovich@igc.by

### For citation

Mezhnina, O. A. and Urbanovich, O. Yu. (2017), “Genetic variability of blackcurrant varieties (*Ribes nigrum*) in Belarus”, *Proceedings of the National Academy of Science of Belarus, biological series*, no. 1, pp. 62–69.

**А. В. Бережная, Т. В. Романовская, О. В. Молчан, Э. И. Коломиец**

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

**ПОЛУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ИНОКУЛЯТА  
*BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* SUBSP. *PLANTARUM* БИМ В-439Д  
ДЛЯ ОТЪЕМНО-ДОЛИВНОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ**

Оптимизированы условия получения иммобилизованного инокулята *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д для отъемно-доливного культивирования бактерий с целью повышения конкурентоспособности биопестицида Бетапротектин. Установлено, что применение иммобилизованных бактериальных клеток в отъемно-доливной ферментации позволяет повысить скорость разбавления до 0,25 л/ч<sup>-1</sup>, обеспечивает высокое качество производимого препарата Бетапротектин и рост продуктивности процесса в среднем на 17 % по сравнению с таковыми в контрольном варианте с использованием жидкого инокулята.

*Ключевые слова:* биопестицид, иммобилизация, инокулят, отъемно-доливное культивирование, носитель.

**A. V. Berezhnaya, T. V. Romanovskaya, O. V. Molchan, E. I. Kolomiets**

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

**CREATING IMMOBILIZED INOCULUM OF *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* SUBSP. *PLANTARUM*  
BIM В-439Д FOR WEANING-TOPPING CULTIVATION**

There are optimized conditions for the creation of immobilized inoculum of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BIM IN-439D for weaning-topping cultivation of bacteria in order to increase the competitiveness of the biopesticide Betaprotektin. The use of immobilized bacterial cells in weaning-topping fermentation allows to increase the dilution speed to 0.25 l/h<sup>-1</sup>, ensures the high quality of the biopesticide Betaprotektin and the growth process productivity by an average of 17 % in comparison with the control option by using liquid inoculum.

*Keywords:* biopesticide, immobilization, inoculum, weaning-topping fermentation, media.

**Введение.** Биологические средства защиты растений приобретают все большую популярность как за рубежом, так и у нас в стране в связи с повышением спроса на экологически чистую сельскохозяйственную продукцию. В отличие от агрохимикатов, биопестициды безопасны для человека и окружающей среды, характеризуются специфичностью действия, не вызывают резистентности у возбудителей болезней [1, 2]. Однако по эффективности биопрепараты уступают химическим пестицидам, что инициирует исследования по повышению их конкурентоспособности, в том числе путем совершенствования технологий получения.

В Институте микробиологии НАН Беларуси разработан ряд биологических препаратов для сельского хозяйства на основе бактерий рода *Bacillus*, эффективно контролирующего развитие возбудителей вредоносных заболеваний сельскохозяйственных растений. В частности, широкой популярностью у растениеводческих хозяйств пользуется биопестицид Бетапротектин, созданный на основе бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д и предназначенный для борьбы с кагатной, серой и прикорневой гнилью, гнилью корнеплодов, пенициллезом и фузариозом луковичных, клубнелуковичных и цветочных культур.

Цель данной работы – усовершенствование технологии получения биопестицида Бетапротектин для повышения продуктивности ферментационного процесса и качественных показателей конечной продукции.

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследований служил штамм спорообразующих бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д – основа биопестицида Бетапротектин.

В качестве тест-культуры использовали фитопатогенный гриб *Fusarium oxysporum* БИМ F-381, типовой возбудитель кагатной гнили сахарной свеклы, выделенный сотрудниками УО «Гроднен-

ский государственный аграрный университет» и депонированный в коллекции Института микробиологии НАН Беларуси.

В работе использовали следующие среды и растворы:

полусинтетические (г/л): 1) БХА: бульон Хоттингера – 50,0; глюкоза – 10,0; пептон – 5,0; NaCl – 5,0; агар-агар – 12,0–20,0; вода водопроводная – до 1 л; 2) среда Мейнелла (модифицированная): меласса – 30,0;  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  – 7,0;  $KH_2PO_4$  – 3,0;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,1;  $(NH_4)_2SO_4$  – 1,5; Na-цитрат – 0,5; вода дистиллированная – до 1 л; 3) картофельно-глюкозный бульон (КГБ): глюкоза – 20,0; картофельный бульон – 1 л.

Глубинное культивирование бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д осуществляли в питательной среде 2 в колбах Эрленмейера на качалке (режим перемешивания 180–200 об/мин,  $T = 30 \pm 2$  °С) и в опытно-промышленных ферментерах LiFlus LP-100 и LiFlus LP-120 (Южная Корея) (100–130 об/мин,  $T = 30 \pm 2$  °С, аэрация 1 л/л в минуту). Отъемно-доливной способ культивирования проводили при скорости разбавления  $D = 0,2–0,3$  л/ч<sup>-1</sup>. Периодичность отъема-долива составляла 4 ч. В качестве потенциальных носителей для получения иммобилизованного инокулята исследован широкий спектр сорбентов. Навески сорбентов предварительно стерилизовали путем автоклавирования в закрытой стеклянной таре в течение 30 мин (избыточное давление 73,5 кПа,  $T = 120$  °С) и стерильно вносили в односуточную культуральную жидкость (КЖ) *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д в соотношении 1 г/л.

Биомассу иммобилизованных клеток и спор определяли по разнице масс образцов носителя, высушенных до абсолютно сухого веса, на анализаторе влажности Sartorius MA150 (Германия), до и после культивирования, за вычетом массы компонентов питательной среды. Смыв адсорбированных клеток и спор с носителя проводили 1 л отмывочного буфера (рН 7,5) следующего состава: Tris (1 М) – 10 мл, NaCl (0,5 М) – 40, EDTA (0,5 М) – 2, H<sub>2</sub>O дист. – 788 мл.

Культуру фитопатогенных грибов выращивали в колбах Эрленмейера на жидкой среде 3 на качалке (200 об/мин, температура 23–24 °С) в течение 32–48 ч.

Определение титра клеток и спор бактерий-антагонистов проводили методом предельных разведений [3]. Антагонистическую активность оценивали методом лунок [4], результаты учитывали после 18–24 ч инкубации по диаметру зон задержки роста тест-культуры.

Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам в программе Microsoft Office Excel.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты отбора носителей с высокой сорбирующей способностью приведены в табл. 1. Основными критериями отбора служили количество адсорбированной биомассы, а также титр колониеобразующих единиц (КОЕ) и спор бактерий, иммобилизованных на носителе при различных сроках сорбции.

Т а б л и ц а 1. Динамика биомассы бактерий

T a b l e 1. Dynamics of the biomass of bacteria

Носитель	Показатель сорбции	Сорбирующая способность по сухой биомассе и титру КОЕ/спор				Станд. ошибка средней
		1 ч	2 ч	4 ч	6 ч	
Керамзит	I	0/0	0,011/0,55	0,01/0,5	0,013/0,61	0,003
	II	$8 \cdot 10^8/1,2 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^9/8,3 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^9/8 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^9/9 \cdot 10^8$	
Полотно геотекстильное Лавсан ГЕО-100	I	0,3/16,2	0,33/16,5	0,3/15	0,28/13,3	0,01
	II	$4,1 \cdot 10^8/2 \cdot 10^8$	$5,3 \cdot 10^8/2,7 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^8/3 \cdot 10^8$	$5,3 \cdot 10^8/2,7 \cdot 10^8$	
Полотно полиэфирное Лавсан О2-1	I	0,6/32,4	0,78/39	0,77/38,5	0,75/35,7	0,04
	II	$1 \cdot 10^9/1 \cdot 10^9$	$2,6 \cdot 10^9/1,3 \cdot 10^9$	$2,2 \cdot 10^9/1 \cdot 10^9$	$2,3 \cdot 10^9/2 \cdot 10^9$	
Полиамидная нить	I	0,07/3,78	0,22/11	0,21/10,5	0,2/9,5	0,03
	II	$5 \cdot 10^8/1,0 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^8/2,0 \cdot 10^8$	$7,3 \cdot 10^8/2,0 \cdot 10^8$	$6,8 \cdot 10^8/3 \cdot 10^8$	
Марля медицинская	I	0,1/5,4	0,26/13	0,21/10,5	0,16/7,6	0,03
	II	$9 \cdot 10^8/5 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^9/5,8 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^9/9 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^9/3 \cdot 10^8$	
Капроновая ткань	I	0,23/12,4	0,57/28,5	0,54/27	0,52/24,7	0,07
	II	$8,9 \cdot 10^8/1 \cdot 10^8$	$9,5 \cdot 10^8/6,2 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^9/8 \cdot 10^8$	$9 \cdot 10^8/7,8 \cdot 10^8$	

Окончание табл. 1

Носитель	Показатель сорбции	Сорбирующая способность по сухой биомассе и титру КОЕ/спор				Станд. ошибка средней
		1 ч	2 ч	4 ч	6 ч	
Хлопчатобумажная ткань	I	0,13/7,02	0,29/14,5	0,25/12,5	0,25/11,9	0,034
	II	$1 \cdot 10^9/4 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^9/5,1 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^9/5,0 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^9/7 \cdot 10^8$	
Медная сетка	I	0/0	0,025/1,35	0,02/1	0,011/0,52	0,005
	II	$2 \cdot 10^8/8 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^8/4 \cdot 10^8$	$7 \cdot 10^8/4,3 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^8/3 \cdot 10^8$	
Кремниевая пластинка с микропористым слоем	I	0,1/5,4	0,12/6	0,1/5	0,1/4,7	0,005
	II	$7 \cdot 10^8/6 \cdot 10^8$	$6,3 \cdot 10^8/4,1 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^8/5 \cdot 10^8$	$6,5 \cdot 10^8/6 \cdot 10^8$	
Медная сетка с наноиглами на поверхности	I	0/0	0/0	0/0	0/0	–
	II	$7,1 \cdot 10^7/4 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^7/5,1 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^7/5 \cdot 10^7$	$6,85 \cdot 10^7/5,2 \cdot 10^7$	

П р и м е ч а н и е. Количество вносимого носителя – 1 г/л КЖ; контроль (жидкая культура без внесения сорбента): средний показатель сухой биомассы – 2,0 г/л, средний показатель титра КОЕ/спор –  $5,2 \cdot 10^9/2,3 \cdot 10^9$ ; показатели сорбции: I – сухая биомасса, г/г носителя/% к контролю, II – титр КОЕ/спор, л/мл.

Согласно результатам проведенных исследований, оптимальная продолжительность насыщения носителя клетками и спорами штамма-продуцента составляет 2 ч. Наиболее высокой сорбирующей способностью характеризуются 5 потенциальных носителей из 10 исследованных – полотно геотекстильное Лавсан ГЕО-100, полотно полиэфирное Лавсан О2-1, марля медицинская, капроновая ткань, хлопчатобумажная ткань.

Оптимальное количество сорбента для получения иммобилизованного инокулята определяли по биомассе клеток и спор, адгезированных на разновесных образцах отобранных материалов в течение 2 ч в 1 л КЖ. Результаты эксперимента представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Динамика накопления биомассы бактерий

T a b l e 2. The dynamics of biomass accumulation of bacteria

Основа иммобилизованного инокулята	К-во носителя, г/л	Биомасса сорбированных на образце носителя клеток и спор, г
Полотно геотекстильное Лавсан ГЕО-100	0,5	0,19
	1	0,35
	2	0,41
	2,5	0,55
Полотно полиэфирное Лавсан О2-1	0,5	0,4
	1	0,77
	2	0,82
	2,5	1,02
Марля медицинская	0,5	0,12
	1	0,3
	2	0,42
	2,5	0,66
Капроновая ткань	0,5	0,2
	1	0,51
	2	0,67
	2,5	0,79
Хлопчатобумажная ткань	0,5	0,18
	1	0,23
	2	0,38
	2,5	0,44
Контроль (без внесения сорбента)	–	2,1

Отбор оптимальной массы носителя производили также с учетом его площади и объема. Так, навеска полотна Лавсан О2-1 массой 2,5 г сорбирует на 30 % больше биомассы, чем навеска массой 1 г, но при этом ее объем составляет 222,3 см<sup>3</sup>, а площадь – 283 см<sup>2</sup>. Это создает технические проблемы при проведении ферментации в лабораторных ферментерах, так как носитель такой массы занимает много полезного объема аппарата. Путем сравнения соотношения биомассы

сорбированных клеток к площади разновесных носителей установлено, что для получения иммобилизованного инокулята на 1 л КЖ необходимо вносить 1 г сорбента.

В дальнейших исследованиях отобранные носители служили основой для получения иммобилизованных инокулятов путем периодического культивирования бактерий в питательной среде 2 в течение 2 ч. Данные инокуляты использовали для засева питательной среды 2 и последующего глубинного культивирования бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д в 2-литровых колбах на качалке в течение 48 ч при  $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Для окончательного выбора носителя проводили сравнение качественных характеристик наработанных экспериментальных образцов биопестицида Бетапротектин. В контрольном варианте использовали жидкий инокулят, объем которого составлял 10 % от объема КЖ (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Влияние различных иммобилизованных инокулятов *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д на качественные характеристики биопестицида Бетапротектин

Table 3. The effect of different immobilized inoculated *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BIM IN-439D on the quality characteristics of biopesticide Betaprotektin

Основа иммобилизованного инокулята	Показатель конечного продукта	
	Титр КОЕ/спор, n/мл	Диаметр зоны задержки роста <i>F. oxysporum</i> F-381, мм
Полотно геотекстильное Лавсан ГЕО-100	$5,3 \cdot 10^8 / 2,7 \cdot 10^8$	31
Полотно полиэфирное Лавсан О2-1	$2,9 \cdot 10^9 / 1,3 \cdot 10^9$	31,5
Марля медицинская	$1,06 \cdot 10^9 / 5,8 \cdot 10^8$	30
Капроновая ткань	$1,0 \cdot 10^9 / 6,2 \cdot 10^8$	28
Хлопчатобумажная ткань	$1,1 \cdot 10^9 / 5,0 \cdot 10^8$	31
Контроль (жидкий инокулят)	$2,5 \cdot 10^9 / 1,0 \cdot 10^9$	31

По результатам экспериментов в качестве основы для иммобилизованного инокулята выбрано полиэфирное нетканое полотно Лавсан О2-1. Использование именно этого материала, характеризующегося максимальной среди исследованных образцов адгезионной способностью, позволяло наработать биопрепарат с высокими показателями титра и антагонистической активности.

При получении иммобилизованного инокулята для засева питательной среды в 100-литровом ферментере навеску сорбента Лавсан О2-1 весом 6 г вносили в 6 л односуточной культуры *B. amyloliquefaciens* БИМ В-439Д и продолжали культивирование в течение 2 ч для сорбции клеток и спор. Иммобилизованные клетки вместе с остатками жидкой культуры вносили в стерильную среду 2 объемом 60 л. Далее осуществляли периодическое культивирование в течение 24 ч до фазы спороношения культуры, затем начинали отъемно-доливной процесс. В качестве контроля параллельно проводили ферментацию в аналогичных условиях с использованием жидкого посевного материала в количестве 10 % от объема КЖ. Режим отъема-долива отработывали при скорости разбавления от 0,2 до 0,3 л/ч<sup>-1</sup>. Периодичность отъема-долива составляла 4 ч, максимальная продолжительность ферментационного процесса – 188 ч (более 7 сут).

При отъемно-доливном культивировании со скоростью разбавления  $D = 0,2\text{ л/ч}^{-1}$  показатели выхода бактериальной биомассы и продуктивности процесса в контрольном и опытном вариантах оказались примерно одинаковыми и колебались в пределах 4,13–4,20 г/л и 0,82–0,84 г/л·ч соответственно, тогда как при повышении скорости разбавления до  $D = 0,25\text{ л/ч}^{-1}$  использование иммобилизованного инокулята способствовало увеличению выхода биомассы и продуктивности процесса в среднем на 17 % по сравнению с контролем: средний показатель продуктивности ферментации с иммобилизованным инокулятом составил 1,02 г/л·ч, а в контроле – 0,87 г/л·ч. При скорости разбавления  $D = 0,3\text{ л/ч}^{-1}$  как в опытном, так и в контрольном вариантах наблюдалось вымывание культуры: при ферментации с использованием иммобилизованного инокулята – после 4 сут, с использованием жидкого инокулята – уже после 60 ч отъемно-доливного культивирования (рис. 1–3).

Показатели антагонистической активности биопрепарата Бетапротектин в зависимости от скорости разбавления отъемно-доливной ферментации приведены на рис. 4.

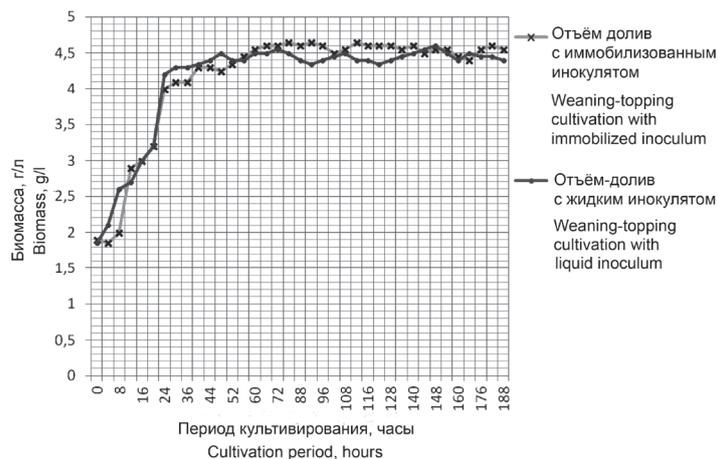


Рис. 1. Динамика биомассы бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-439Д при отъемно-доливном культивировании,  $D = 0,2 \text{ л/ч}^{-1}$

Fig. 1. Dynamics of the biomass of bacteria *B. amyloliquefaciens* БИМ В-439Д when weaning-topping fermentation,  $D = 0.2 \text{ l/h}^{-1}$

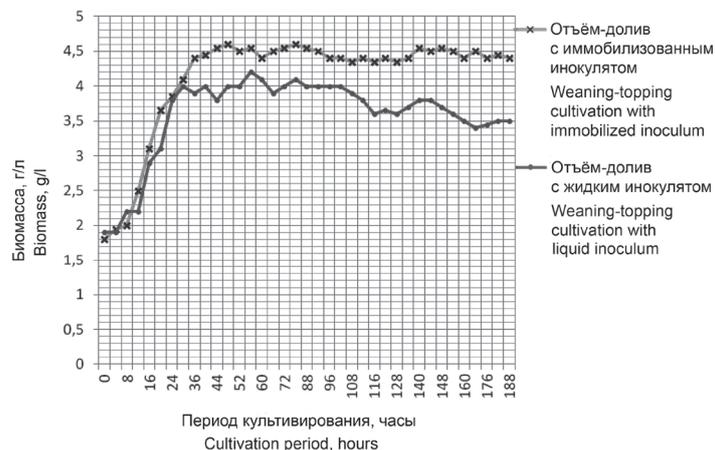


Рис. 2. Динамика биомассы бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-439Д при отъемно-доливном культивировании,  $D = 0,25 \text{ л/ч}^{-1}$

Fig. 2. Dynamics of the biomass of bacteria *B. amyloliquefaciens* БИМ В-439Д when weaning-topping fermentation,  $D = 0.25 \text{ l/h}^{-1}$



Рис. 3. Динамика биомассы бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-439Д при отъемно-доливном культивировании,  $D = 0,3 \text{ л/ч}^{-1}$

Fig. 3. Dynamics of the biomass of bacteria *B. amyloliquefaciens* БИМ В-439Д when weaning-topping fermentation,  $D = 0.3 \text{ l/h}^{-1}$

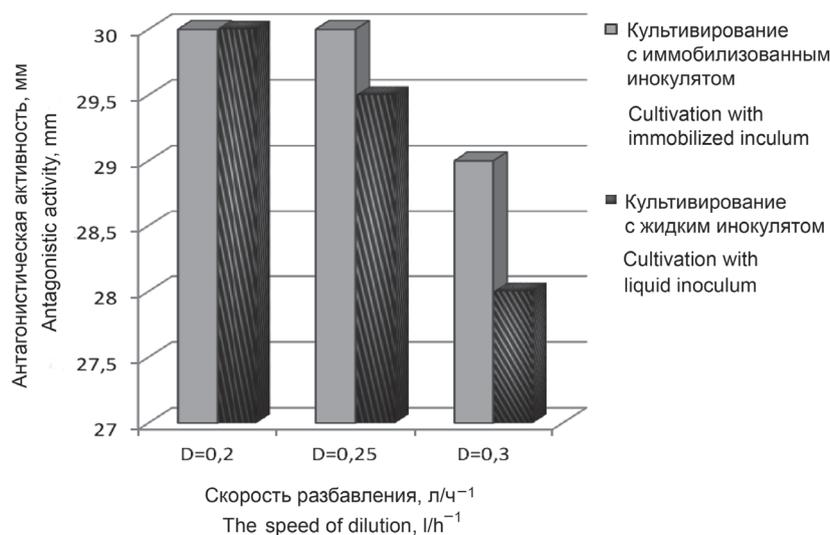


Рис. 4. Показатели антагонистической активности биоpestицида Бетапротектин в отношении *F. oxysporum* F-381

Fig. 4. Indicators of antagonistic activity of the biopesticide Betaprotektin against *F. oxysporum* F-381

Как следует из результатов эксперимента, применение иммобилизованного инокулята в отъемно-доливной ферментации при скорости разбавления  $D = 0,25$  л/ч<sup>-1</sup> способствует стабилизации выхода биомассы на уровне, превышающем контрольный вариант на 17 %, при этом полученный продукт имеет высокие показатели антагонистической активности. В контрольном варианте при данной скорости разбавления наблюдается постепенное снижение выхода биомассы в процессе отъема-долива и понижение антагонистической активности препарата.

Таким образом, установлено положительное влияние применения иммобилизованного инокулята на основе материала Лавсан О2-1 на продуктивность отъемно-доливного культивирования бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-439Д со скоростью разбавления  $D = 0,25$  л/ч<sup>-1</sup>. Это можно объяснить тем, что иммобилизованные клетки в меньшей степени подвержены воздействию различных неблагоприятных инактивирующих внешних факторов (температура, кислотность, концентрация токсических веществ и др.). Кроме того, в результате иммобилизации становится возможной дополнительная защита культуры от атаки патогенной для нее микрофлорой при случайных нарушениях стерильности биотехнологической системы [5–7]. Показано также, что применение иммобилизованного инокулята делает возможным замену периодического культивирования отъемно-доливным процессом, что обеспечивает снижение энерго- и трудозатрат в ходе ферментации и одновременно позволяет получить большее количество биопрепарата.

**Заключение.** В ходе работ оптимизированы условия получения иммобилизованного инокулята: в качестве носителя по критерию сорбирующей способности рекомендовано полиэфирное полотно Лавсан О2-1, подобрана продолжительность насыщения материала клетками и спорами штамма-продуцента – 2 ч, определено оптимальное соотношение массы носителя и объема КЖ для получения иммобилизованного инокулята – 1 г/л. При использовании иммобилизованного инокулята в отъемно-доливном культивировании штамма *B. amyloliquefaciens* БИМ В-439Д оптимальная скорость разбавления среды составляет 0,25 л/ч<sup>-1</sup>. Полученный в результате биопрепарат имеет высокие показатели антагонистической активности в отношении типового патогена *F. oxysporum* F-381, а продуктивность ферментационного процесса и выход биомассы культуры в среднем на 17 % выше, чем в контроле.

Предложенный способ усовершенствования технологии получения биопрепарата Бетапротектин способствует повышению продуктивности ферментации, снижает энерго- и трудозатраты, что положительно сказывается на его конкурентоспособности.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Белов, Л. П. Возможности использования препаратов на основе *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* в растениеводстве / Л. П. Белов, В. А. Шкалик, Ю. С. Дунаева // АгроXXI. – 2008. – № 4–6. – С. 58–59.
2. Коломиец, Э. И. Биологическая альтернатива удобрениям и средствам защиты растений / Э. И. Коломиец, Л. И. Стефанович, Н. А. Здор // Беларус. сельск. хоз-во. – 2011. – № 10. – С. 33–35.
3. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхарда. – М.: Мир, 1984. – Т. 3. – 264 с.
4. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги. – М.: Колос, 1983. – 253 с.
5. Влияние условий культивирования на некоторые свойства бацилл, составляющих основу пробиотиков / Т. М. Фурзикова [и др.] // Микробиол. журн. – 1999. – Т. 61, № 5. – С. 19–27.
6. Имобилизованные клетки микроорганизмов / А. П. Синицын [и др.]. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 288 с.
7. Пестова, О. В. Биосинтез экзополисахаридов бактериями *Bacillus mucilaginosus* в глубоких условиях культивирования и новый аспект их использования: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23. – СПб.: Биотехнология, 2000.

## References

1. Belov, L. P., Shkalikov, V. A. and Dunaeva, Y. S. (2008) "Possibility of use of preparations based on *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* in crop production", *AgroXXI*, no. 4–6, pp. 58–59.
2. Kolomiets, E. I., Stefanovich, L. I. and Zdor, N. A. (2011) "Biological alternative to the fertilizers and facilities of defence of plants", *Belorusskoe selskoe hozaystvo* [Belarusian agriculture], no. 10, pp. 33–35.
3. Gerhard, F. (ed.) (1984) "Methods of the general bacteriology", *Mir* [World], Moscow, vol. 3, p. 264.
4. Sehgi, J. (1983) "Methods of soil Microbiology", *Kolos* [Ear], Moscow, p. 253.
5. Furzikova, T. M., Sergejchuk, M. G., Sorokulova, I. B. and Smirnov, V. V. (1999) "The influence of cultivation conditions on the properties of bacilli comprising the basis of probiotics", *Mikrobiologicheskii zhurnal* [Journal of the microbiology], vol. 61, no. 5, pp. 19–27.
6. Sinicin, A. P., Rajnina, E. I., Lozinskij, V. I. and Spasov, S. D. (1994) "Immobilized cells of microorganisms", *Izd-vo MGU* [Publishing house of Moscow State University], Moscow, p. 288.
7. Pestova, O. V. (2000) "Biosynthesis of exopolysaccharides by the bacteria *Bacillus mucilaginosus* in deep conditions cultivation and a new aspect of their use", *Avtoref. dissertacii na soiskanie uchenoj stepeni kandidata biol. nauk: 03.00.23* [Abstract of thesis of dissertation on the competition of graduate degree of candidate of biological sciences], Biotechnology, Sankt-Peterburg, 2000.

## Информация об авторах

*Бережная Анастасия Валерьевна* – науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: domilazo@bk.ru

*Романовская Татьяна Витальевна* – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: romanovskaja@mbio.bas-net.by

*Молчан Ольга Владиславовна* – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: olga\_molchan@mail.ru

*Коломиец Эмилия Ивановна* – чл.-кор., 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

## Для цитирования

Получение иммобилизованного инокулята *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д для отъемно-доливной ферментации / А. В. Бережная [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 1. – С. 70–76.

## Information about the authors

*Berezhnaya Anastasiya Valer'evna* – Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: domilazo@bk.ru

*Romanovskaya Tatiana Vital'evna* – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: romanovskaja@mbio.bas-net.by

*Molchan Olga Vladislavovna* – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olga\_molchan@mail.ru

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

## For citation

Berezhnaya, A. V., Romanovskaya, T. V., Molchan, O. V. and Kolomiets, E. I. (2017), "Creating immobilized inoculums of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BIM В-439Д for weaning-topping cultivation", *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, no. 1, pp. 70–76.

ISSN 0002-3558 (print)  
УДК 577.15:581.142.02:633.1

Поступила в редакцию 13.10.2016  
Received 13.10.2016

**В. И. Домаш<sup>1</sup>, О. А. Иванов<sup>1</sup>, И. А. Гордей<sup>2</sup>, О. М. Люсиков<sup>2</sup>, И. С. Гордей<sup>2</sup>,  
Т. П. Шарпио<sup>1</sup>, С. А. Забрейко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск,  
Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

## **РОЛЬ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В УСТОЙЧИВОСТИ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР К ПРОРАСТАНИЮ ЗЕРНА В КОЛОСЕ**

Предуборочное прорастание является одной из причин снижения посевных и технологических свойств зерна, что наносит значительный урон. В связи с этим проведены генетико-биохимические исследования этого процесса с целью выяснения роли гидролитических ферментов в устойчивости злаковых культур к прорастанию зерна в колосе.

Объектами исследования служили ди- и тетраплоидные формы ржи и гексаплоидные формы тритикале и секалотритикум. В ходе исследования отобраны стабильные и урожайные формы злаковых культур для оценки их устойчивости к прорастанию зерна на корню. Показано, что на прорастание зерна на корню влияет плоидность ржи и тип цитоплазмы гетероплазматических тритикале. Установлен различный уровень активности протеолитических и амилитических ферментов у исследованных генотипов злаковых культур. У озимого тритикале отмечен более высокий уровень активности нейтральных, щелочных протеаз и  $\alpha$ -амилазы. Уровень активности Na-бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилидазы (БАПАазы) составил 7,15–24,4 ЕА/г абс. сух. массы,  $\alpha$ -амилазы – 92–118,7 мг/мл·ч. Показано наличие тесной корреляционной связи между активностью щелочной БАПАазы,  $\alpha$ -амилазы и устойчивостью злаковых культур к прорастанию зерна в колосе. Установлена гетерогенность и особенности электрофоретического спектра белков у исследованных генотипов ржи и тритикале. Полученные данные позволили установить причины устойчивости злаковых культур к прорастанию зерна на корню и выявить маркеры для использования в селекции.

*Ключевые слова:* протеазы,  $\alpha$ -амилаза, электрофорез, прорастание, рожь, тритикале.

**V. I. Domash<sup>1</sup>, O. A. Ivanov<sup>1</sup>, I. A. Gordei<sup>2</sup>, O. M. Lyusikov<sup>2</sup>, I. S. Gordei<sup>2</sup>, T. P. Sharpio<sup>1</sup>, S. A. Zabreiko<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk,  
Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

## **THE ROLE OF HYDROLYTIC ENZYMES IN CEREAL RESISTANCE TO GRAIN GERMINATION IN THE EAR**

Pre-harvesting germination of grain causes a considerable loss and it is one of the reasons for the decline of sowing and technological properties of grain. In this regard, the aim of this work was to elucidate the role of hydrolytic enzymes in the grain crop sustainability to germination in the ear. The object of the study were di- and tetraploid forms of rye and hexaploid forms of triticale and secalotriticum. The research allowed to select a stable and productive form of cereals to evaluate the resistance to grain germination for assessment of resistance to germination of grain at the root. It is shown that the germination of the grain at the root is affected by the ploidy of rye and the type of cytoplasm from heteroplasmic triticale. It is shown different levels of activity of proteolytic and amylolytic enzymes in the studied genotypes of cereals. Winter triticale had a marked higher level of activity of neutral, alkaline protease and  $\alpha$ -amylase. Variation in the level of BAPase activity is 7.15–24.4 EA/g. a. d. m. and  $\alpha$ -amylase activity – 92–118.7 mg/ml·h. It is shown the close correlation between the activity of alkaline BAPase,  $\alpha$ -amylase and resistance to the cereal grain germination in the ear. Heterogeneity of an electrophoretic range of proteins at the studied genotypes of rye and triticale is shown. The obtained data make a contribution to clarification of the reasons underlying the resistance of cereal cultures to germination of grain at the root and open possibilities of identification of their markers for use in selection.

*Keywords:* proteases,  $\alpha$ -amylase, electrophoresis, germination, rye, triticale.

**Введение.** Рожь и тритикале являются важнейшими зерновыми культурами в Нечерноземной зоне России и в Беларуси. К сожалению, серьезную проблему представляет характерное для этих культур прорастание зерна в колосе вследствие нарушения периода покоя у созревающих семян, приводящего к активации физиологических процессов и началу роста зародыша.

Установлено, что одна из главных причин прорастания зерна в колосе – повышенная ферментативная активность в условиях повышенной влажности. Увеличение активности гидролаз, осо-

бенно  $\alpha$ -амилазы, вызывает декстринизацию крахмала, нарушает его гидратацию и делает зерно дефектным. Предуборочное прорастание зерна наносит значительный урон и считается одной из основных причин снижения посевных и технологических свойств семян в годы частых или избыточных осадков в период уборки, при этом потери урожая зерна могут достигать 20–50 % [1, 2]. Устойчивость к предуборочному прорастанию рассматривается как комплексный признак. Формирование устойчивости мягкой пшеницы (одного из родительских компонентов тритикале) ассоциировано со специфическими генами, которые находятся в локусах QPhsR, охватывающих практически все хромосомы трех геномов пшеницы, и подвержено сильному влиянию окружающей среды [3, 4]. У ржи, второго родительского компонента тритикале, один из основных QTL, влияющих на активность  $\alpha$ -амилазы, локализован на длинном плече хромосомы 5R [5]. Признак устойчивости к прорастанию на корню у тритикале контролируется группой полимерных генов, что значительно затрудняет селекцию на его улучшение при использовании классических подходов [6, 7]. Кроме того, определение всех известных показателей оценки устойчивости к прорастанию на корню требует сравнительно большого объема анализируемого материала, что практически невозможно получить на ранних этапах селекционного процесса. В этой связи выявление и применение генетико-биохимических маркеров является одним из оптимальных путей увеличения эффективности отбора и оптимизации селекционного процесса по данному признаку. Существенно ограничивает возможности повышения устойчивости тритикале к предуборочному прорастанию и тот факт, что некоторые селекционно-значимые гены локализованы в хромосомах D-генома пшеницы, который у гексаплоидных тритикале отсутствует. В связи с этим встает вопрос о необходимости тщательного селекционно-генетического изучения основных компонентов устойчивости к прорастанию на корню злаковых культур и в первую очередь тех биохимических процессов, которые лежат в основе прорастания зерна на корню.

Цель работы – изучение роли активности гидролитических ферментов в устойчивости злаковых культур к прорастанию зерна в колосе.

**Объекты и методы исследования.** Основными объектами исследования служили ди- (RR,  $2n = 14$ ) и тетраплоидные (RRRR,  $2n = 28$ ) формы ржи и гексаплоидные формы гетероплазматических аллополиплоидов ржи с пшеницей – тритикале ( $^V$ RRAABB,  $2n = 6x = 42$ ), а также секалотритикум ( $^S$ RRAABB,  $2n = 6x = 42$ ) с идентифицированным с помощью молекулярного анализа ДНК хлоропластов типом цитоплазмы.

Цитологический анализ микроспорогенеза проводили по общепринятой методике на препаратах пыльников соответствующих стадий созревания, окрашенных 2 %-ным раствором ацетокармина в 45 %-ной уксусной кислоте. Анализировали по 200–300 однотипных мейотических клеток на генотип у 3–5 растений [8].

Всхожесть семян определяли по ГОСТ 12038-84 [9], активность нейтральных протеиназ – по методу Ансона [10] в нашей модификации (за единицу активности принимали количество фермента, вызывающего образование 1 мкМ тирозина за 1 мин инкубации), активность Na-бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилидазы (БАПАазы) – по методу Эрлангера [11], амилолитическую активность – по методу Плешкова [12] и по ГОСТ [13], содержание белка – по методу Лоури в модификации Хартри [14] и Бредфорда [15].

Электрофорез белков проводили по методу Лэммли [16]. Для электрофореза использовали 15 %-ную концентрацию разрешающего геля. Катодным буфером являлся 25 мМ трис, 192 мМ глициновый буфер, pH 8,3, содержащий 0,1 % SDS. В лунки вносили по 90 мкг белка. Электрофорез осуществляли при силе тока 25 мА и напряжении 120 В в разрешающем геле. Для окраски гелей использовали 0,125 %-ный Coomassie brilliant blue R-250.

**Результаты и их обсуждение.** В ходе исследования отобраны перспективные формы гетероплазматических тритикале для оценки на устойчивость к прорастанию зерна в колосе. Подбор перспективных образцов проводили по критериям цитологической стабильности в мейозе и зерновой продуктивности. Установлено, что динамика стабилизации генома и мейотическая стабильность генома секалотритикум обеспечиваются отбором гибридных генотипов, способствующих преимущественно десинаптическому типу образования унивалентов и высокому уровню стабильности мейоза в поколениях. Стабильность генотипов тритикале достигалась путем длитель-

ной селекции на продуктивность за счет достижения более регулярной конъюгации (синапсиса) хромосом и снижения частоты асинаптических унивалентов в мейозе. Реципрокная гибридизация секалотритикум с исходными тритикале как в прямом (гибриды с ржаным типом цитоплазмы), так и в обратном (гибриды с пшеничным типом цитоплазмы) направлении приводила к снижению показателей мейотической стабильности у амфидиплоидов (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Цитологическая стабильность гетероплазматических тритикале и их реципрокных гибридов в мейозе

Table 1. Cytological stability of heteroplasmic triticale and their reciprocal hybrids in meiosis

Тип гексаплоидных гетероплазматических тритикале	К-во клеток с нарушениями в мейозе по стадиям, %					
	MI	AI	MII	AII	Тетрады	В среднем
Секалотритикум	16,9	7,8	10,5	8,6	4,7	9,4
Гибриды секалотритикум × тритикале	16,0	4,6	15,4	14,6	5,7	10,9
Гибриды тритикале × секалотритикум	15,0	6,2	13,9	13,1	8,5	11,5
Тритикале	13,9	16,1	12,2	24,3	10,6	14,6

Примечание. Значения достоверны при  $p \leq 0,05$ .

На основании приведенных результатов и данных полевых испытаний для оценки на устойчивость к прорастанию зерна в колосе отобраны перспективные (наиболее стабильные и урожайные) формы гетероплазматических гексаплоидных тритикале.

Результаты анализа на устойчивость образцов зерна ржи и тритикале к прорастанию на корню представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Устойчивость к прорастанию коллекционных образцов ржи и тритикале

Table 2. Resistance to germination in collection samples of rye and triticale

Образец	Всхожесть, %
Секалотритикум ( <sup>S</sup> RRAABB, 2n = 6x = 42):	
Str В <sub>8</sub> М	76
Str В <sub>8</sub> Д	84
Str 12	100
Str 39	96
Str 42	100
<i>В среднем</i>	<b>91</b>
Тритикале ( <sup>T</sup> RRAABB, 2n = 6x = 42):	
Тг Михась	100
Тг Гренадо	100
<i>В среднем</i>	<b>100</b>
Рожь диплоидная (RR, 2n = 14):	
Алькора	96
Валдай × Каупо	96
Зарница	100
Плиса	96
Юбилейная	92
<i>В среднем</i>	<b>96</b>
Рожь тетраплоидная (RRRR, 2n = 28):	
Алькора	92
Валдай × Каупо	96
Зарница	96
Плиса	96
Юбилейная	60
<i>В среднем</i>	<b>88</b>

Результаты исследований показали, что на прорастание зерна оказывает влияние уровень плоидности ржи и тип цитоплазмы у гетероплазматических тритикале. Так, семена некоторых образцов (тетраплоидной ржи Юбилейная, гексаплоидных секалотритикум В<sub>8</sub>М и В<sub>8</sub>Д), а также в целом полиплоидов (тетраплоидов) в сравнении с диплоидами ржи и ржано-пшеничных алло-

полиплоидов (ржаной (S) тип цитоплазмы) в сравнении с семенами пшенично-ржаных (пшеничный (T) тип цитоплазмы) обладают относительно низкой способностью к прорастанию.

Литературные данные [17] свидетельствуют о том, что семена тритикале способны прорасти на разных этапах их формирования, начиная с возраста зерновки 10 сут с момента опыления и заканчивая фазой полной спелости. Причем период покоя очень краток (4–8 сут). Показано, что наиболее чувствительна к преждевременному прорастанию зерна в колосе фаза начала восковой спелости (32–34-е сутки с момента опыления). Нарушение периода покоя у созревающих семян зерновых культур может приводить к преждевременной активации физиологических процессов и к началу развития зародыша – явлению предуборочного прорастания зерна на корню. Основным физиологическим процессом при этом выступает увеличение активности ферментов, в особенности  $\alpha$ -амилазы, в условиях повышенной влажности, а в последующем – декстринизация и нарушение гидратации крахмала, рыхлость эндосперма.

Нами изучена роль гидролитических ферментов (протеаз и  $\alpha$ -амилазы) в устойчивости семян злаковых культур к прорастанию на корню. Результаты исследований приведены в табл. 3, 4.

Т а б л и ц а 3. Активность протеолитических ферментов в зерне ржи и тритикале

Table 3. Activity of proteolytic enzymes in rye and triticale grain

Сортообразец	Нейтральные протеазы		Щелочная протеаза БАПАаза	
	ЕА/г сырой массы	ЕА/г абс. сух. массы	ЕА/г сырой массы	ЕА/г абс. сух. массы
<i>Озимая рожь</i>				
Плиса 28 хр.	0,9	1,02 ± 0,03	7,70	8,70 ± 0,04
Плиса 14 хр.	1,5	1,69 ± 0,00	8,4	10,57 ± 0,39
Валдай × Каупо 28 хр.	0	0	6,0	6,78 ± 0,00
Валдай × Каупо 14 хр.	0	0	6,7	7,54 ± 0,04
Зарница 28 хр.	1,5	1,70 ± 0,00	12,5	14,07 ± 0,40
Зарница 14 хр.	2,3	2,60 ± 0,07	19,2	21,71 ± 0,00
<i>Озимое тритикале</i>				
Михась	13,5	15,35 ± 0,00	12,20	13,87 ± 0,32
STR В <sub>8</sub> М	10,3	11,72 ± 0,35	21,4	24,36 ± 0,45
STR В <sub>8</sub> Д	9,0	10,22 ± 0,00	6,90	7,84 ± 0,00
STR 42	13,1	14,80 ± 0,19	10,6	11,97 ± 0,26
STR 39	8,6	9,98 ± 0,32	6,30	7,15 ± 0,00
STR 12	9,00	10,20 ± 0,00	6,50	7,37 ± 0,19

Примечание. ЕА – единицы активности.

Т а б л и ц а 4. Активность  $\alpha$ -амилазы в зерне ржи и тритикале (в миллиграммах гидролизованного крахмала)

Table 4.  $\alpha$ -Amylase activity in rye and triticale grain (in milligrams of hydrolyzed starch)

Образец	$\Delta OD_{cp, 595 \text{ нм}}$ (изменение поглощения между опытной и холостой пробой при 595 нм)	Активность, мг/мл·ч
<i>Тритикале</i>		
Михась (СТ)	0,237	118,75 ± 1,76
STR В <sub>8</sub> М	0,237	92,75 ± 1,77
STR В <sub>8</sub> Д	0,219	115,53 ± 0,37
STR 7	0,193	96,25 ± 1,77
STR 12	0,222	117,10 ± 1,86
STR 23	0,221	110,5 ± 0,2
STR 24	0,195	100,0 ± 0,0
STR 42	0,237	118,75 ± 1,77
STR 39	0,208	109,48 ± 1,49
Тр Гренадо	0,221	116,58 ± 1,12

Окончание табл. 4

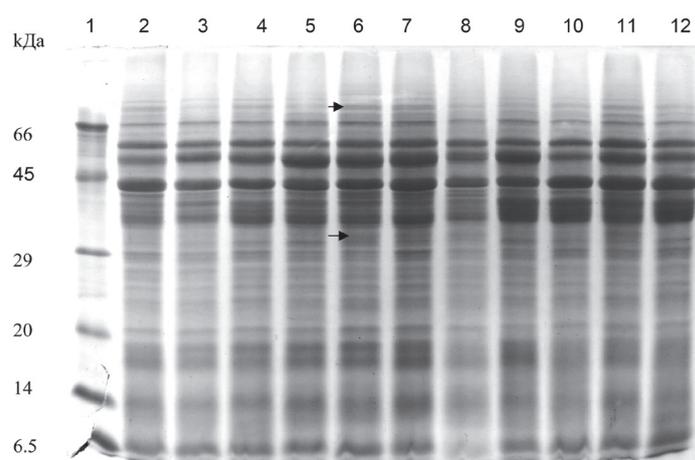
Образец	$\Delta OD_{595}$ (изменение поглощения между опытной и холостой пробой при 595 нм)	Активность, мг/мл·ч
<i>Рожь</i>		
Юбилейная 14 хр.	0,162	83,79 ± 2,19
Юбилейная 28 хр.	0,166	75,86 ± 0,00
Алькора 14 хр.	0,162	101,38 ± 0,74
Алькора 28 хр.	0,186	96,20 ± 3,65
Зарница 14 хр.	0,175	90,77 ± 4,02
Зарница 28 хр.	0,165	85,34 ± 3,66
Плиса 14 хр.	0,152	80,27 ± 1,86
Плиса 28 хр.	0,174	91,58 ± 0,75
Валдай × Каупо 14 хр.	0,155	81,85 ± 4,09
Валдай × Каупо 28 хр.	0,148	77,90 ± 2,23

Как видно из табл. 3, у озимого тритикале более высокий уровень активности нейтральных и щелочных протеаз. Уровень активности нейтральных протеаз у исследованных образцов ржи варьируется от 0 до 2,6 ЕА, а щелочной БАПАазы – от 6,78 до 21,71 ЕА/г абс. сух. массы. Установлена высокая корреляционная связь ( $r = +0,88$ ) между активностью щелочной протеазы и прорастанием в колосе зерна озимой ржи. У озимого тритикале коэффициент корреляции ( $r$ ) равен  $-0,61$ , что говорит об участии щелочной гидролазы в процессах прорастания зерна на корню.

Данные об активности  $\alpha$ -амилазы в зерне ржи и тритикале представлены в табл. 4.

Результаты исследования показали различный уровень активности  $\alpha$ -амилазы (77,9–118,7 ЕА) в зерне исследуемых сортообразцов ржи и тритикале. Выявлена тесная корреляционная связь между активностью альфа-амилазы и всхожестью зерна тритикале ( $r = +0,81$ ). Коэффициент корреляции у ржи равен  $+0,45$ . Полученные результаты согласуются с литературными сведениями [7] и указывают на возможность использования показателя активности  $\alpha$ -амилазы в селекции на устойчивость злаковых культур к прорастанию зерна в колосе. Установлено, что образцы, имеющие более низкую активность  $\alpha$ -амилазы, отличаются меньшей энергией прорастания и всхожестью зерна, а следовательно, большей устойчивостью к прорастанию на корню. Полученные результаты вносят вклад в выявление маркеров устойчивости зерна злаковых культур к прорастанию в колосе.

Перспективным в селекции на устойчивость к прорастанию зерна в колосе является и метод электрофореза, позволяющий выявить функциональную и физико-химическую неоднородность



Электрофорез белков в ПААГ образцов тритикале и ржи: 1 – молекулярные маркеры AppliChem 66–6,5 кДа; 2 – тритикале, сорт Михась; 3 – образец 1; 4 – образец 4; 5 – образец 12; 6 – образец 23; 7 – образец 42; 8 – рожь 13; 9 – сорт Валдай × Каупо, 28 хромосом; 10 – сорт Зарница, 28 хр.; 11 – сорт Зарница, 14 хр.; 12 – сорт Юбилейная, 28 хр.

PAG electrophoresis of proteins in rye and triticale samples: 1 – molecular markers (AppliChem 66–6.5 kDa); 2 – triticale, cultivar Mihas; 3 – sample 1; 4 – sample 4; 5 – sample 12; 6 – sample 23; 7 – sample 42; 8 – rye 13; 9 – cultivar Valdai × Kaupo, 28 chromosomes; 10 – cultivar Zarnitsa, 28 chr.; 11 – cultivar Zarnitsa, 14 chr.; 12 – cultivar Uibileinaia, 28 chr.

ферментов амилазного комплекса (см. рисунок). Кроме того, с помощью этого метода можно установить, чем обусловлена активность фермента  $\alpha$ -амилазы – процессом прорастания или же необычно высоким эндогенным уровнем энзима в нормальном зерне.

**Заклучение.** Энзиматический подход к оценке свойств сорта дает возможность установить внутренние закономерности связи биохимических показателей с генетическими особенностями злаковых культур. Получение селекционного материала, сочетающего такие важнейшие агрономические характеристики, как устойчивость к прорастанию на корню и высокая урожайность, позволило отобрать перспективные образцы.

### Благодарность

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (договор B15-076).

### Acknowledgement

The work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (contract B15-076).

### Список использованных источников

1. Крупнов, В. А. Генетический контроль покоя и устойчивости к предуборочному прорастанию семян у пшеницы / В. А. Крупнов, С. Н. Сибикеев, О. В. Крупнова // С.-х. биол. – 2011. – № 3. – С. 3–16.
2. Гордей, И. А. Тритикале. Генетические основы создания / И. А. Гордей. – Минск: Наука и техника, 1992. – 287 с.
3. Kato, K. Mapping QTLs controlling grain yield and its components on chromosome 5 A of wheat / K. Kato, H. Miura, S. Sawada // *Theor. Appl. Genet.* – 2000. – Vol. 101, N 7. – P. 1114–1121.
4. Ogonnaya, F. C. Haplotype diversity of pre-harvest sprouting QTLs in wheat / F. C. Ogonnaya, M. Imtiaz, R. M. DePauw // *Genome.* – 2007. – Vol. 50. – P. 107–118.
5. A doubled haploid rye linkage map with a QTL affecting  $\alpha$ -amylase activity / T. Tenhola-Roininen [et al.] // *J. Appl. Genet.* – 2011. – Vol. 52, N 3. – P. 299–304.
6. Rybka, K. An approach to identification of rye chromosomes affecting the pre-harvest sprouting in triticale / K. Rybka // *J. Appl. Genet.* – 2003. – Vol. 44, N 4. – P. 491–496.
7. Данилкин, Н. М. Устойчивость линий и гибридов яровой тритикале к прорастанию зерна на корню / Н. М. Данилкин, А. А. Соловьев // *Известия ТСХА.* – 2008. – Вып. 1. – С. 81–85.
8. Паушева, З. П. Практикум по цитологии растений / З. П. Паушева. – М.: Колос, 1970. – 254 с.
9. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести: ГОСТ 12038-84. – Введ. 01.06.86. – М.: Стандартиформ, 2011. – 30 с.
10. Anson, M. Z. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin / M. Z. Anson // *J. Gen. Physiol.* – 1938. – Vol. 22, N 1. – P. 79–89.
11. Erlanger, F. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. / F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 1961. – Vol. 96. – P. 271–278.
12. Плешков, Б. П. Практикум по биохимии растений / Б. П. Плешков. – М.: Колос, 1985. – 255 с.
13. Препараты ферментные. Методы определения амилазной активности: ГОСТ 20264.4-89. – Введ. 01.01.1999. – М.: Гос. ком. СССР по стандартам, 1989. – 7 с.
14. Hartree, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response / E. F. Hartree // *Anal. Biochem.* – 1972. – Vol. 48, N 2. – P. 422–427.
15. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
16. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
17. Рубец, В. С. Покой и предуборочное прорастания зерна в колосе озимой гексаплоидной тритикале / В. С. Рубец, В. В. Пыльнев, Л. В. Кондрашина // *Достижения науки и техники АПК.* – 2012. – № 11. – С. 14–19.

### References

1. Krupnov, V. A., Sibikeev, S. N. and Krupnova, O. V. (2011), “Genetic control of dormancy and resistance to pre-harvest sprouting in wheat seeds”, *Selskochoziaistvennaia biologia* [Agricultural biology], no. 3, pp. 3–16.
2. Gordey, I. A. (1992), *Tririkale. Geneticheskie osnovy sozdaniia* [Tririkale. Genetic bases of selection], Science and Technology, Minsk, BY.
3. Kato, K., Miura, H. and Sawada, S. (2000), “Mapping QTLs controlling grain yield and its components on chromosome 5 A of wheat”, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 101, no. 7, pp. 1114–1121.
4. Ogonnaya, F. C., Imtiaz, M. and DePauw, R. M. (2007), “Haplotype diversity of pre-harvest sprouting QTLs in wheat”, *Genome*, vol. 50, pp. 107–118.
5. Tenhola-Roininen, T., Kalendar, R., Schulman, A. and Tanhuanpa, P. (2011), “A doubled haploid rye linkage map with a QTL affecting  $\alpha$ -amylase activity”, *Journal of Applied Genetics*, vol. 52, no. 3, pp. 299–304.
6. Rybka, K. (2003), “An approach to identification of rye chromosomes affecting the pre-harvest sprouting in triticale”, *Journal of Applied Genetics*, vol. 44, no. 4, pp. 491–496.

7. Danilkin, N. M. and Soloviov, A. A. (2008), “Different lines and hybrids of spring triticale grain and its resistance to germinate at the root”, *Isvestia TSCA* [TSCA News], no. 1, pp. 81–85.
8. Pauscheva, S. P. (1970), *Praktikum po citologii rastenij* [Plant cytology practicum]. Kolos, Moscow, RU.
9. The USSR State Committee on Standards (2011), *GOST 12038-84: Semena selskokochoziaistvennykh kultur. Metody opredelenia vschozhesti* [State Standard 12038-84: Agricultural seeds. Methods for determining the germination], Standartinform, Moscow, RU.
10. Anson, M. Z. (1938), “The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin”, *Journal of General Physiology*, vol. 22, no. 1, pp. 79–89.
11. Erlanger, F., Kokowsky, N. and Cohen, W. (1961), “The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 96, pp. 271–278.
12. Pleshkov, B. P. (1985), *Praktikum po biochimii rastenii* [Plant Biochemistry Protocols], Kolos, Moscow, RU.
13. The USSR State Committee on Standards (1989), *GOST 20264.4-8: Preparaty fermentnye. Metody opredeleniia amilpliticheskoj aktivnosti* [GOST 20264.4-8: Enzyme preparations. Methods for determination of amylolytic activity], Gosudarstvennyj komitet SSSR po standartam, Moscow, RU.
14. Hartree, E. F. (1972), “Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response”, *Analytical Biochemistry*, vol. 48, no. 2, pp. 422–427.
15. Bradford, M. M. (1976), “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Analytical Biochemistry*, vol. 72, pp. 248–254.
16. Laemmli, U. K. (1970), “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage”, *Nature*, vol. 227, pp. 680–685.
17. Rubec, V. S., Pylnev, L. V. and Kondrashina, L. V. (2012), “Rest and Pre-harvest sprouting of grain in the ear of winter hexaploid triticale”, *Dostizhenia nauki i tehniki APK* [Advances in science and technology AIC], no. 11, pp. 14–19.

### Информация об авторах

Домаш Валентина Иосифовна – д-р биол. наук, заведующий сектором. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: valdomash@mail.ru

Иванов Олег Александрович – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: heleg-zero@mail.ru

Гордей Иван Андреевич – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: I.Gordej@igc.by

Люсиков Олег Михайлович – науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: O.Lyusikov@igc.by

Гордей Игорь Станиславович – мл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: I\_Gordej777@mail.ru

Шарпио Тамара Петровна – науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь).

Забрейко Светлана Алексеевна – науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь).

### Для цитирования

Роль гидролитических ферментов в устойчивости злаковых культур к прорастанию зерна в колосе / В. И. Домаш [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2017. – № 1. – С. 77–83.

### Information about the authors

Domash Valentina Iosifovna – D. Sc. (Biol.), Head of Department. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaja Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: valdomash@mail.ru

Ivanov Oleg Aleksandrovich – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaja Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: heleg-zero@mail.ru

Gordei Ivan Andreevich – D. Sc. (Biol.), Professor, Chief scientific employee. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaja Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: I.Gordej@igc.by

Lyusikov Oleg Mihailovich – Scientific employee. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaja Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: O.Lyusikov@igc.by

Gordei Igor Stanislavovich – Junior scientific employee. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaja Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: I\_Gordej777@mail.ru

Sharpio Tamara Petrovna – Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaja Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

Zabreiko Svetlana Alekseevna – Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaja Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

### For citation

Domash, V. I., Ivanov, O. A., Gordei, I. A., Lyusikov, O. M., Gordei, I. S., Sharpio, T. P. and Zabreiko, S. A. (2017), “The role of hydrolytic enzymes in cereal resistance to grain germination in the ear”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, no. 1, pp. 77–83.

**А. Г. Литвинова, В. В. Вежновец, В. П. Семенченко**

*Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь*

## **СОСТОЯНИЕ И ПРОГНОЗ РАЗВИТИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *EURYTEMORA* (COPEPODA, CALANOIDA) В ВОДОЕМАХ БЕЛАРУСИ**

Изучена многолетняя динамика численности реликтовой каланоидной копеподы *E. lacustris* в населенных ею двух белорусских озерах, а также связь между численностью чужеродной каланоидной копеподы *E. velox* и качеством воды населенных ею водных объектов. Несмотря на относительно малую численность *E. lacustris* в обоих озерах и значительные колебания ее по сезонам и годам, популяции остаются стабильными и воспроизводимыми. Чужеродный вид *E. velox* заселяет водоемы юга Беларуси с широким спектром трофности и загрязненности, предпочитая умеренно-загрязненные воды. Это является предпосылкой для дальнейшей экспансии.

*Ключевые слова:* чужеродные и аборигенные виды копепод, распространение, плотность популяций, качество воды, эврибионтность.

**A. G. Litvinova, V. V. Vezhnavecs, V. P. Semchenko**

*Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences for Bioresources, Minsk, Republic of Belarus*

## **STATE ASSESSMENT AND DEVELOPMENT FORECAST OF POPULATIONS OF REPRESENTATIVES GENUS *EURYTEMORA* (COPEPODA, CALANOIDA) IN WATER RESERVOIRS OF BELARUS**

The long-term dynamics of the relic calanoid copepode *E. lacustris* density in two Belarusian lakes inhabited by this species was studied, as well as link of number alien calanoid copepode *E. velox* with quality of water of the inhabited water objects. The decrease of the *E. lacustris* density in both of lakes was determined. Despite the relative low index of density and its significant seasonal and year fluctuation, populations remain stabilized and reproducible. The alien species *E. velox* populates reservoirs of the South of Belarus with a wide range of a trofnost and impurity, preferring the moderate polluted waters. It is a prerequisite for further expansion.

*Keywords:* alien and native species of copepodes, spread, density of populations, water quality, evribiontnost.

**Введение.** Появление новых и исчезновение аборигенных видов в фауне требует всестороннего анализа как исторических, так и современных причин этих явлений. На территории Беларуси обитают два вида рода *Eurytemora* разного географического происхождения, один из которых (*Eurytemora velox* (Lilljeborg, 1853)) является чужеродным, другой (*Eurytemora lacustris* (Poppe, 1887)) – аборигенным видом. *E. lacustris* сохранился как реликтовый вид ракообразных со времен ледниковых трансгрессий в фауне Беларуси и имеет северное происхождение. Исходным же ареалом *E. velox* считается Понто-Каспийский регион. Оба вида в исходном ареале относятся к солоноватоводной фауне. В водоемах Беларуси они населяют пресные воды, но значительно отличаются по отношению к основным факторам среды обитания, что определяет их распространение, пространственное расположение, жизненные циклы, численность популяций и тенденции ее изменения [1, 2]. Сопоставление сведений о биологии данных видов, оценка современного состояния их популяций и прогноз изменений имеют общебиологическое значение как вклад в общую теорию формирования пресноводных сообществ, обусловленного проникновением представителей солоноватоводной фауны. Изучаемые виды представляют кормовой ресурс для планктоноядных рыб, поэтому такого рода исследования имеют и научно-практическое значение при оценке кормовой базы рыб.

Цель исследования – оценить распространение, численность и условия обитания каланоидных копепод рода *Eurytemora* в водоемах Беларуси, дать прогноз развития данных представителей.

**Материалы и методы исследования.** Для оценки состояния популяций *E. lacustris* количественные сборы проведены в летнюю межень с разной периодичностью: в оз. Вечелье – с 2002 по 2015 г., в оз. Волчин – с 1992 по 2015 г. Ловы зоопланктона для этого вида проведены на станциях с максимальной глубиной замыкающейся сетью Джели, фракционно, через 5 м глубины. Количественные пробы для *E. velox* отобраны путем процеживания 50 л воды через планктонную сеть в летнее время 2007, 2011–2013 гг. из водотоков Мухавца, Днепро-Бугского канала, Пины, Припяти и Сожа.

Количественную обработку проб зоопланктона проводили в счетной камере Богорова под бинокулярным микроскопом МБС-10 при увеличении 8×4, для морфологического анализа применяли микроскоп Jenaval с увеличением до 600. У обоих видов учитывали все 12 стадий развития.

Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами с использованием программного пакета Statistica v. 6.0 для Windows и пакета анализа в Microsoft Excel 2008.

**Результаты и их обсуждение.** *Распространение.* В водоемах и водотоках Беларуси оба вида пространственно разделены: *E. lacustris* отмечается в двух мезотрофных димиктических озерах бассейна Западной Двины: Волчин (Мядельский р-н Минской обл.) и Вечелье (Ушачский р-н Витебской обл.). *E. velox* распространен в Мухавце, Днепро-Бугском канале, Пине, Припяти и Соже, что географически охватывает территорию Гомельского и Брестского Полесья (рис. 1) [3, 4].

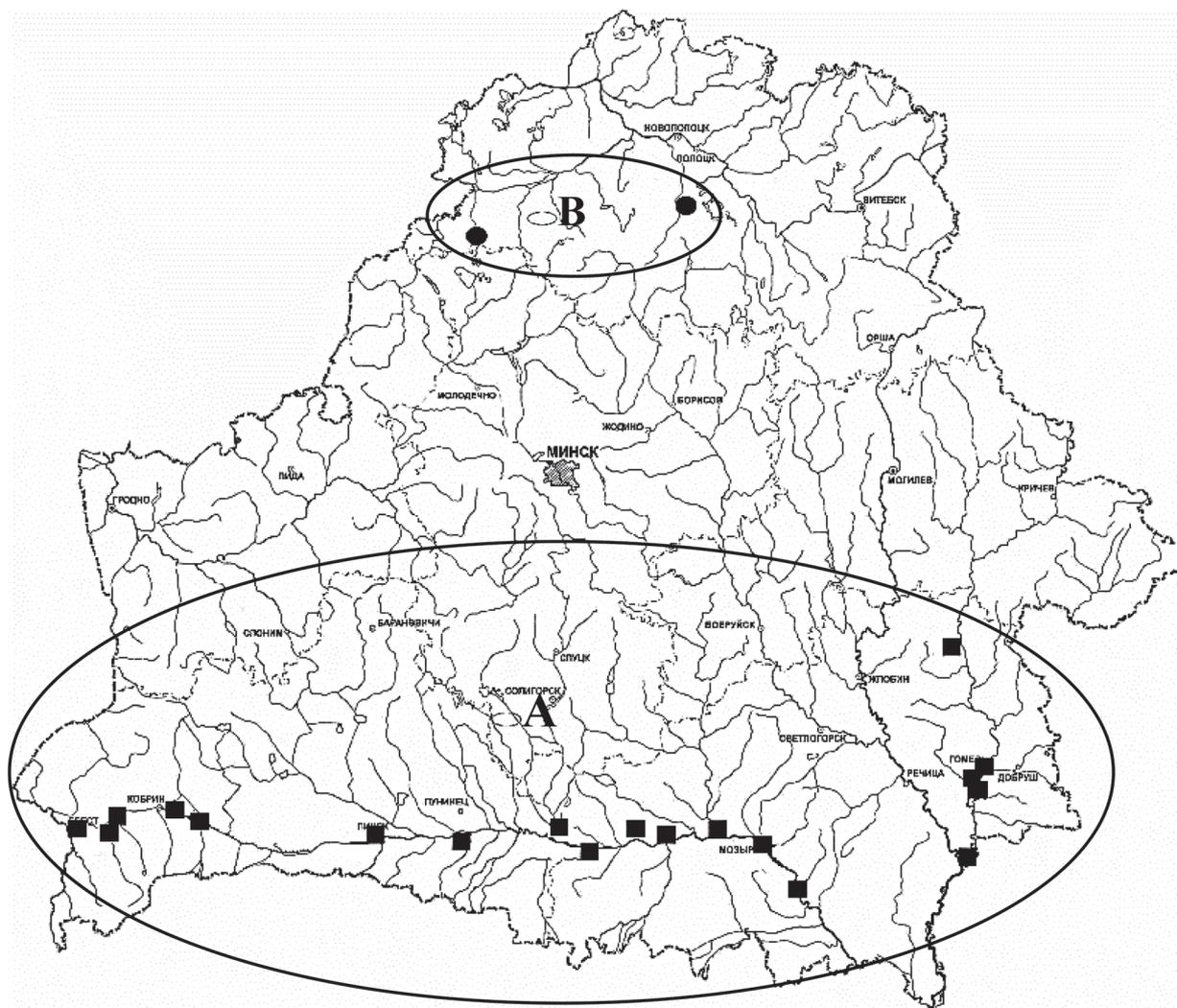


Рис. 1. Места обнаружения *E. velox* (A) и *E. lacustris* (B) в водных объектах Беларуси

Fig. 1. *E. velox* (A) and *E. lacustris* (B) points of detection in water bodies of Belarus

Таким образом, *E. velox* на современном этапе колонизировал местообитания и распространился по водоемам юга Беларуси, а реликтовый *E. lacustris* встречается на севере страны.

*Эколого-биологические различия Eurytemora velox и E. lacustris.* Сравнительные данные по биологии обоих видов приведены в табл. 1. Более северным, балтийским, регионом происхождения *E. lacustris* объясняется холодолюбивость вида и его способностью обитать лишь в пресных и слабосоленых чистых водах. Поэтому *E. lacustris* встречается лишь в двух мезотрофных озерах бассейна Зап. Двины (север Беларуси), обитая преимущественно в глубоководной части пелагиали.

Т а б л и ц а 1. Особенности биологии реликтового и чужеродного видов

Table 1. Features of biology and the relic of alien species

Признак/особенность	<i>E. lacustris</i>	<i>E. velox</i>
Происхождение	Балтийский регион	Понто-Каспийский регион
Распространение в Беларуси	Витебская и север Минской области, редок	Гомельская и Брестская области, часто встречаемый
Отношение к солёности	Пресноводный, солоноватоводный, 0–12 ‰	Эвригалинный, 0–40 ‰
Температура обитания	Стенотермный, холодолюбивый (0–13 °С)	Эвритермный, теплолюбивый (0–28 °С)
Питание	Растительноядный, фильтратор, пеннатные диатомовые водоросли	Растительноядный, фильтратор, центрические диатомовые водоросли
Местообитания	Олиготрофные и мезотрофные озера, чистые воды	Реки, пойменные водоемы, водохранилища, умеренно загрязненные воды
Биотопическая приуроченность	Пелагиаль, гипolimнион озер	Прибрежье стоячих и текучих водоемов
Жизненный цикл	Две генерации в течение года, наличие зимнего пика размножения	Несколько генераций в течение года, стадия покоя в зимнее время
Приспособления для выживания в неблагоприятных условиях	Отсутствие покоящихся стадий	Наличие покоящихся стадий
Размеры половозрелых особей, мм	♂: 1,340 ± 0,0768 ♀: 1,308 ± 0,0694	♂: 1,113 ± 0,0635 ♀: 1,331 ± 0,1084
Средняя плодовитость, яиц/самку	13,12 ± 3,868	38,95 ± 27,458
Плодовитость (мин.-макс.)	2–81	1–48
Средний размер яйца, мкм	100,53 ± 1,7334	87,09 ± 2,391

*E. velox*, вид изначально южный, в силу специфических особенностей (более высокой плодовитости, наличия покоящихся яиц и, вероятно, генетической обусловленности к выживанию в условиях более широкого спектра факторов среды), отличается эврибионтностью. Этот вид населяет самые разнообразные типы водоемов и водотоков в пределах бассейнов рек Западный Буг, Припять и Днепр (юг Беларуси). Данный вид в них имеет приуроченность к прибрежной зоне, на течении и в пелагиали встречаются только единичные особи.

Зрелые особи обоих видов эуритемор имеют близкий размерный диапазон. При этом специфической особенностью, присущей *E. lacustris* по крайней мере в водоемах Беларуси, можно считать более длинное тело самцов в сравнении с длиной тела самок. У *E. velox*, как и у подавляющего числа видов каланид, отмечается противоположная тенденция. Размерные характеристики половых продуктов (яиц) обоих видов также имеют отличия. Вероятно, это объясняется разной стратегией размножения видов.

Исходя из представленных данных, основные биологические и экологические характеристики видов рода *Eurytemora* из водоемов Беларуси значительно различаются.

*Состояние популяций E. lacustris по многолетним данным.* Результаты ряда собственных многолетних наблюдений реликтового вида, а также литературные данные позволяют провести анализ изменения состояния популяций. На фоне межгодовых колебаний и наблюдаемого в последние два года роста численности *E. lacustris* установлено постепенное снижение его плотности в обоих населенных озерах, особенно в сравнении с более ранними годами наблюдений. Так, например, в оз. Волчин более чем за 20 лет (1992–2015 гг.) численность рачка снизилась

приблизительно в 2 раза, а начиная с 1950 г. она сократилась более чем в 4 раза (табл. 2). Причиной этого являются высокая требовательность к качеству воды и содержанию кислорода в ней. В этом водоеме вертикальное распределение *E. lacustris* сверху ограничивается высокой температурой, а снизу – дефицитом кислорода. Установлено, что в зависимости от содержания кислорода популяция перемещается, избегая зоны с дефицитом кислорода (рис. 2). В зависимости от величины зоны с низким содержанием кислорода в гипolimнионе озера жизненное пространство изменяется по годам, что может быть причиной значительных колебаний численности.

Т а б л и ц а 2. Межгодовые изменения абсолютной (экз/м<sup>3</sup>) и относительной (% в зоопланктоне) численности *E. lacustris* в озерах Беларуси

Table 2. The interannual change of absolute (copies/m<sup>3</sup>) and relative (% of zooplankton) number of *E. lacustris* in the lakes of Belarus

оз. Волчин			оз. Вечелье		
Год	экз/м <sup>3</sup>	%	Год	экз/м <sup>3</sup>	%
1950 (по [5])	4400	–	1977 (по [6])	3500	–
1992*	1632	1,83	2002	2877	2,68
2002	1293	1,08	2005	647	0,50
2011	435	0,80	2011*	216	0,63
2014	762	2,31	2014	1178	6,04
2015	910	1,78	2015	2172	6,6

Пр и м е ч а н и е. \* – науплии в пробе не учтены.

Учитывая, что одна из генераций *E. lacustris* развивается зимой, некоторый рост ее плотности в последние годы обусловлен улучшением кислородных условий в связи с мягкими зимами и малой продолжительностью ледового покрова.

Подобное снижение численности популяций под влиянием естественных процессов эвтрофирования и загрязнения может привести к исчезновению данного вида из фауны озер Беларуси, что уже наблюдается в некоторых сопредельных странах – Литве, Латвии, Польше и Германии [4].

*Развитие популяций E. velox в зависимости от условий среды обитания.* Многолетние наблюдения для этого вида не проводили, поэтому развитие популяций оценивали, учитывая связь количественного развития с уровнем трофии и качеством воды. В Беларуси данный вид заселяет водоемы с широким спектром уровня трофности и загрязнения. Так, индекс сапробности на створах обнаружения *E. velox* составлял 1,03–2,24 (II–III классы качества воды), при этом индекс

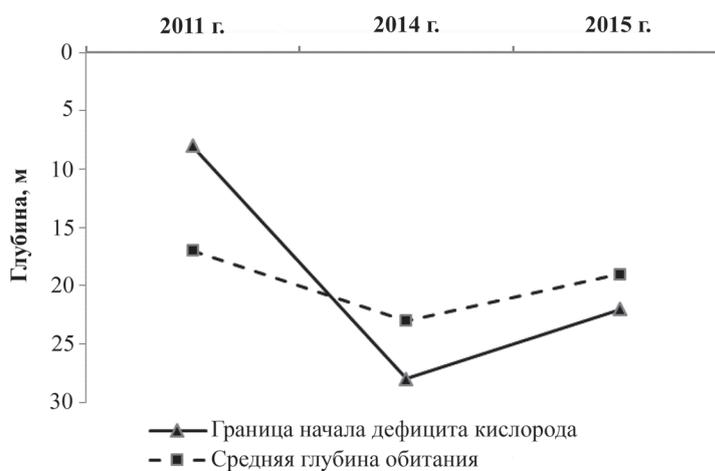


Рис. 2. Изменение средней глубины обитания *E. lacustris* в зависимости от содержания кислорода в гипolimнионе, оз. Волчин

Fig. 2. Change of average depth of dwelling of *E. lacustris* depending on the content of oxygen in the gipolimniyena, lake Volchin

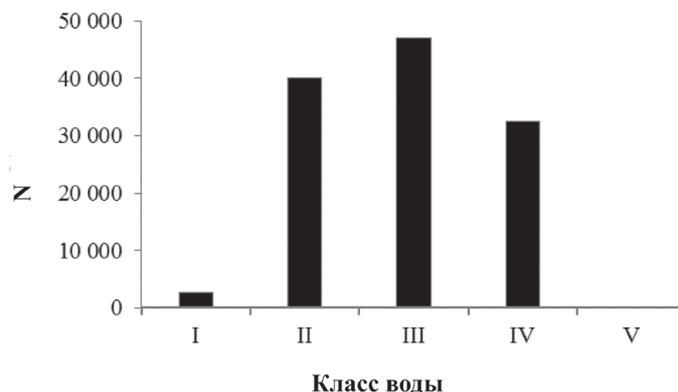


Рис. 3. Зависимость плотности ( $N$ , тыс. экз/м<sup>3</sup>) *E. velox* от качества воды

Fig. 3. Dependence of density ( $N$ , thousands copies/m<sup>3</sup>) *E. velox* from quality of water

видового разнообразия Шеннона изменялся в очень широких пределах – от 0,49 до 4,37 (I–V классы качества воды). Связь качества воды на исследованных створах с плотностью *E. velox* приведена на рис. 3. Со снижением качества воды отмечалось повышение численности рачка, причем *E. velox* предпочитал умеренно-загрязненные воды (III класс качества).

Учитывая рост численности *E. velox* в водоемах с пониженным качеством воды, а также его эврибионтность, обусловленную способностью занимать специфическую пространственную нишу и наличием покоящихся стадий, можно прогнозировать дальнейшее расселение этого вида и колонизацию новых местообитаний.

**Заключение.** Сравнительный анализ близкородственных видов рода *Eurytemora* показал значительные различия их биологических характеристик, что отражается на состоянии популяций. У аборигенного вида *E. lacustris* наблюдается постепенное снижение плотности популяций в обоих населенных белорусских озерах, что ведет к риску исчезновения этого вида из фауны Беларуси. Отсутствие покоящихся стадий развития, обитание на большой глубине снижают шансы его выживания и возможность заселения им мезотрофных озер со сходными условиями обитания.

Чужеродный вид *Eurytemora velox* населяет разнообразные по качеству воды водоемы, имея более высокие показатели численности на створах с низким качеством воды (III класс, умеренно-загрязненные воды). Это повышает шансы его выживания и обеспечивает колонизацию им новых местообитаний.

Учитывая различия между основными биологическими характеристиками, а также повышение трофии и загрязнения водоемов, усиление антропогенного пресса, популяции реликтового *E. lacustris* в будущем подвержены вымиранию, а чужеродный *E. velox* будет расширять свой ареал и вселяться в новые водоемы и водотоки.

### Благодарность

Работа поддержана грантом Президиума НАН Беларуси для аспирантов (2014–2015 гг).

### Acknowledgement

This work was supported by grant of Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus for postgraduate students.

### Список использованных источников

- Литвинова, А. Г. Годовая динамика возрастного состава и цикл развития *Eurytemora lacustris* (Poppe, 1887) в озере Вечелье (Беларусь) / А. Г. Литвинова, В. В. Вежновец // Вестн. БарГУ. Сер. Биол. науки. Сельхоз. науки. – 2015. – Вып. 3. – С. 34–43.
- Литвинова, А. Г. Особенности развития *Eurytemora velox* в водоемах Беларуси / А. Г. Литвинова // Вестн. Нац. акад. Навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2015. – № 1. – С. 95–99.
- Вежновец, В. В. Особенности распространения инвазивной копеподы *Eurytemora velox* (Lilljeborg, 1853) в водоемах белорусского Полесья / В. В. Вежновец, А. Г. Литвинова // Вестн. Брэсц. ун-та. Сер. 5. Хімія. Біялогія. Навукі аб зямлі. – 2012. – № 2. – С. 21–28.

4. Распространение *Eurytemora lacustris* (Poppe, 1887) (Copepoda, Calanoida) в озерах Беларуси / В. В. Вежновец, А. Г. Литвинова // Экологическая культура и охрана окружающей среды: I Дорофеевские чтения: материалы междунар. науч.-практ. конф, Витебск, 21–22 нояб. 2013 г. / Вит. гос. ун-т им. П.М. Машерова; редкол.: И. М. Прищепа [и др.]. – Витебск, 2013. – С. 87–88.

5. Петрович, П. Г. Видовой состав зоопланктона рыбопромысловых озер западных областей БССР / П. Г. Петрович // Уч. зап. БГУ им. В. И. Ленина. – 1956. – Вып. 26. – С. 3–39.

6. Митрахович, П. А. Характеристика популяции *Eurytemora lacustris* (Poppe) в оз. Вечелье Белорусской ССР / П. А. Митрахович, В. П. Ляхнович // Вестн. БГУ им. В. И. Ленина. – 1979. – № 2. – С. 39–44.

## References

1. Litvinova, A. G. and Vezhnovets, V. V. (2015), “Annual dynamics of age structure and cycle of development *Eurytemora lacustris* (Poppe, 1887) in the lake Vechelye (Belarus)”, *BarSU Herald. Series: Biological sciences (General Biology). Agricultural sciences (Agronomy)*, no. 3, pp. 34–43.

2. Litvinova, A. G. (2015), “Features of development of *Eurytemora velox* in reservoirs of Belarus”, *Vesci Nacyjanal'naj Akademii navuk Belarusi. Seryja bijalagichnyh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], no. 1, pp. 95–99.

3. Litvinova, A. G. and Vezhnovets, V. V. (2012), “Features of distribution invasive copepods of *Eurytemora velox* (Lilljeborg, 1853) in reservoirs of the Belarusian Polesia”, *Vesnik of Brest University. Series 5, Chemistry. Biology. Sciences about earth*, no. 2, pp. 21–28.

4. Litvinova, A. G. and Vezhnovets V. V. (2013), “*Eurytemora lacustris* distribution (Poppe, 1887) (Copepoda, Calanoida) in the lakes of Belarus”, *Ekologicheskaya kultura i ohrana okruzhayushey sredy: I Dorofeevskie chteniya: materialy mezhdunar. nauch.-prakt. konf. (21–22 noyab. 2013 g.)* [Ecological culture and environmental protection: I Dorofeevsky readings: materials of International scientific-practical conference (21–22 November 2013)], Vitebsk, BY, 21–22 November 2013, pp. 87–88.

5. Petrovich, P. G. (1956), “Specific structure of zooplankton of fishery lakes of the BSSR western areas”, *Uchenye zapiski BGU imeni V. I. Lenina* [Scientific notes of the Belarusian State University of V. I. Lenin], no. 26, pp. 3–39.

6. Mitrahovich, P. A. and Lyahnovich, V. P. (1979), “The characteristic of population of *Eurytemora lacustris* (Poppe) in the lake Vechelye of the Belarusian SSR”, *Vestnik Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta im. V. I. Lenina. Seriya 2, Himiya. Biologiya. Geografija* [Bulletin of the Belarusian State University of V. I. Lenin. Series 2, Chemistry. Biology. Geography], no. 2, pp. 39–44.

## Информация об авторах

Литвинова Анастасия Геннадьевна – магистр биол. наук, мл. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nastya\_litvinova\_1986@mail.ru

Вежновец Василий Васильевич – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vvv@biobel.bas-net.by

Семенченко Виталий Павлович – чл.-кор., д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Semenchenko57@mail.ru

## Для цитирования

Литвинова, А. Г. Состояние и прогноз развития популяций представителей рода *Eurytemora* (Copepoda, Calanoida) в водоемах Беларуси / А. Г. Литвинова, В. В. Вежновец, В. П. Семенченко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 1. – С. 84–89.

## Information about the authors

Litvinova Anastasiya Gennadevna – M. S. (Biol.), Junior scientific researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nastya\_litvinova\_1986@mail.ru

Vezhnovets Vasil Vasilievich – Ph. D. (Biol.), Senior scientific researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vvv@biobel.bas-net.by

Vitaliy Pavlovich Semenchenko – Corresponding Member, Dr. Sci. (Biol.), Head of Laboratory. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Semenchenko57@mail.ru

## For citation

Litvinova, A. G., Vezhnovets, V. V. and Semenchenko, V. P. (2017), “State assessment and development forecast of populations of representatives genus *Eurytemora* (Copepoda, Calanoida) in water reservoirs of Belarus”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, no. 1, pp. 84–89.

И. Н. Голубкова

*Национальный ботанический сад им. Н. Н. Гришко НАН Украины, Киев, Украина***МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПЫЛЬЦЫ  
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *PERSICA* MILL.**

Лесостепная зона Украины часто подвергается воздействию неблагоприятных метеорологических явлений, которые оказывают существенное влияние на процессы развития пыльцы персика. В связи с этим исследование его генеративной сферы является важной задачей.

Изучены микроморфологические особенности поверхности пыльцевого зерна представителей рода *Persica* Mill. в условиях лесостепной зоны и показаны отличия, которые позволяют идентифицировать виды этого рода.

Объектами исследования являлись виды рода *Persica* Mill. коллекции Национального ботанического сада имени Н. Н. Гришко НАН Украины, а именно их предварительно подсушенная пыльца. При исследовании морфологических параметров использовали сканирующие электронные микроскопы REMMA-102 AT "SELMI" (Сумы, Украина) и GSM-6700F (JEOL, Япония). Размер пыльцевых зерен измеряли с помощью лицензионной программы AxioVision 40 V 4.8.2.0 (Carl Zeiss).

Скульптурные элементы пыльцы расположены меридиально и параллельно, обычно прерывистые, короткие и удлиненные стенки чередуются с извилистыми желобками. Результаты измерений длины полярной оси и экваториального диаметра показали, что пыльцевые зерна изучаемых видов характеризуются как большие и их размер варьируется от 47,89 до 64,27 мкм на полярной оси и от 25,60 до 34,74 мкм с экваториального диаметра. Средний индекс формы составляет 1,75–1,99, а для вида *P. davidiana* – 1,75–1,80.

Сравнительно-морфологический анализ пыльцы двух видов рода персика в условиях лесостепной зоны Украины показал как качественные признаки отличия пыльцевых зерен видов *P. davidiana* и *P. vulgaris* (прежде всего это наличие или отсутствие перфораций, форма и элементы скульптуры), так и количественные (длина полярной оси и экваториального диаметра). Статистический анализ полученных данных позволил выделить некоторые особенности исследуемых генотипов персика и на основании этого определить видовую принадлежность пыльцы.

*Ключевые слова:* персик, пыльца, вид, скульптурные элементы, экзина, перфорация.

I. N. Golubkova

*National Botanical Garden of M. M. Gryshko of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine***MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF POLLEN OF THE GENUS *PERSICA* MILL. SPECIES**

In the conditions of the Forest steppe zone of Ukraine the adverse meteorological phenomena is observed, as a result it exerts the dominating impact on peach's pollen development. Therefore the main task of current research was the generative features of genus *Persica*.

The purpose – to study pollen micromorphological features of a surface the sort *Persica* Mill. representatives in the conditions of Forest steppe zone to show differences which could be used in identification of a genus.

Objects of research – species of *P. davidiana* Carr. and *P. vulgaris* Mill. collections of the National botanical garden of M. M. Gryshko NAS of Ukraine. To carry out our research we used previously dried pollen. At research of morphological parameters we used scanning electronic microscopes of REMMA-102 of JSC SELMI (Sumy, Ukraine) and GSM-6700F (JEOL, Japan). For measurements of pollen grains we used the Axio Vision 40 V 4.8.2.0 (Carl Zeiss) licensed program.

Sculptural elements of pollen are located meridionally and in parallel, usually faltering, short and extended walls alternate with twisting fillets. Results of measurements of length of a polar axis and equatorial diameter showed that pollen grains of the studied species are characterized as big and vary in amount from 47.89 to 64.27 mkm on a polar axis and 25.60 to 34.74 mkm from the equatorial diameter. The average index of a form is in the range from 1.75 to 1.99 mkm which is smaller for *P. davidiana* (1.75–1.80).

Comparative and morphological analysis of pollen of two peach species in conditions of the Forest steppe zone of Ukraine showed that qualitative signs of difference of pollen grains *P. davidiana* and *P. vulgaris*. First of all there are lack of perforation, a form and sculptural elements, and also quantitative: length of a polar axis and equatorial diameter. The statistical analysis of the received values and the allocated signs of studied peach genotypes allowed us to mark out some features which would be helpful at identification of pollen grains of different species.

*Keywords:* peach, pollen, species, sculpture, exine, perforation.

**Введение.** В последние десятилетия среди распространенных на Украине плодовых культур, таких как яблоня, груша, слива, вишня, абрикос, значительное место начинает занимать и персик. Основными причинами возделывания этой культуры является ее скороплодность, регулярность плодоношения, пищевая ценность и экономическая эффективность.

Самыми благоприятными для произрастания персика являются южные регионы страны. В условиях лесостепной зоны часто наблюдаются неблагоприятные метеорологические явления, которые оказывают существенное влияние на процессы развития пыльцы. Поэтому изучение генеративной сферы интродуцентов и ее функционирования является неотъемлемой частью комплексного анализа. Нормальный процесс цветения, образования плодов и качественных семян – одни из критериев успешного прохождения процессов адаптации растений к новым условиям произрастания [1–3].

Различные морфологические характеристики, такие как характер поверхности пыльцевого зерна, его диаметр и размер, обусловлены влиянием множества биотических и абиотических факторов. Аномалии пыльцевых зерен могут влиять и на фертильность, что в свою очередь приводит к снижению репродуктивного потенциала культуры [1, 4]. Однако в литературе отсутствуют данные о морфометрических параметрах пыльцы у растений разных видов рода *Persica* Mill.

Анатомо-морфологические и физиологические особенности пыльцы плодовых растений представляют несомненный интерес для многих научных и практических направлений (систематика, палинология, генетико-селекционные исследования, медицина и др.).

Цель данного исследования – определение микроморфологических особенностей поверхности пыльцевого зерна представителей рода *Persica* в условиях лесостепной зоны Украины, и отличий, позволяющих идентифицировать виды этого рода.

**Материалы и методы исследования.** Объектом для исследования служила предварительно просушенная пыльца, которую отбирали во время полного цветения растений у двух видов рода *Persica*:  *davidiana* и  *vulgaris*. Первый был представлен двумя формами –  *davidiana* var.  *rubra* Bean,  *davidiana* var.  *alba* Bean. Вид  *Persica vulgaris* включал сорта Спутник, Полесский, Днепровский. Материал брали с 5 растений каждого вида, формы и сорта.

Пыльник помещали на предметное стекло, затем препаровальной иглой разрушали его оболочку, пыльцевые зерна кисточкой переносили на объектный столик микроскопа с предварительно наклеенным на него двусторонним скотчем. Материал напыляли углеродом, а затем золотом [5, 6]. Для исследования морфологических параметров использовали сканирующие электронные микроскопы РЕММА-102 АТ “SELMИ” (Сумы, Украина) и GSM-6700F (JEOL, Япония). Размер выборки при измерении пыльцевых зерен для каждого вида составлял 30 штук и рассчитывался при самом большом коэффициенте вариации [7].

Для измерения морфологических параметров пыльцевых зерен (полярной оси  $P$  (прямая линия между дистальным и проксимальным полюсами пыльцевого зерна) и экваториального диаметра  $E$  (прямая линия в экваториальной части пыльцевого зерна, перпендикулярная полярной оси) использовали лицензионную программу Axio Vision 40 V 4.8.2.0 (Carl Zeiss). Метрические данные снимали в 30-кратной повторности [8].

Для описания поверхности пыльцы использовали качественные признаки отличия пыльцевых зерен (наличие или отсутствие перфораций, форму и элементы морфоскульптуры) и количественные (длину полярной оси и экваториального диаметра). Морфологическое описание пыльцевых зерен проводили при 2000-кратном увеличении. При описании пыльцы использовали общепринятую терминологию [5, 6]. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel.

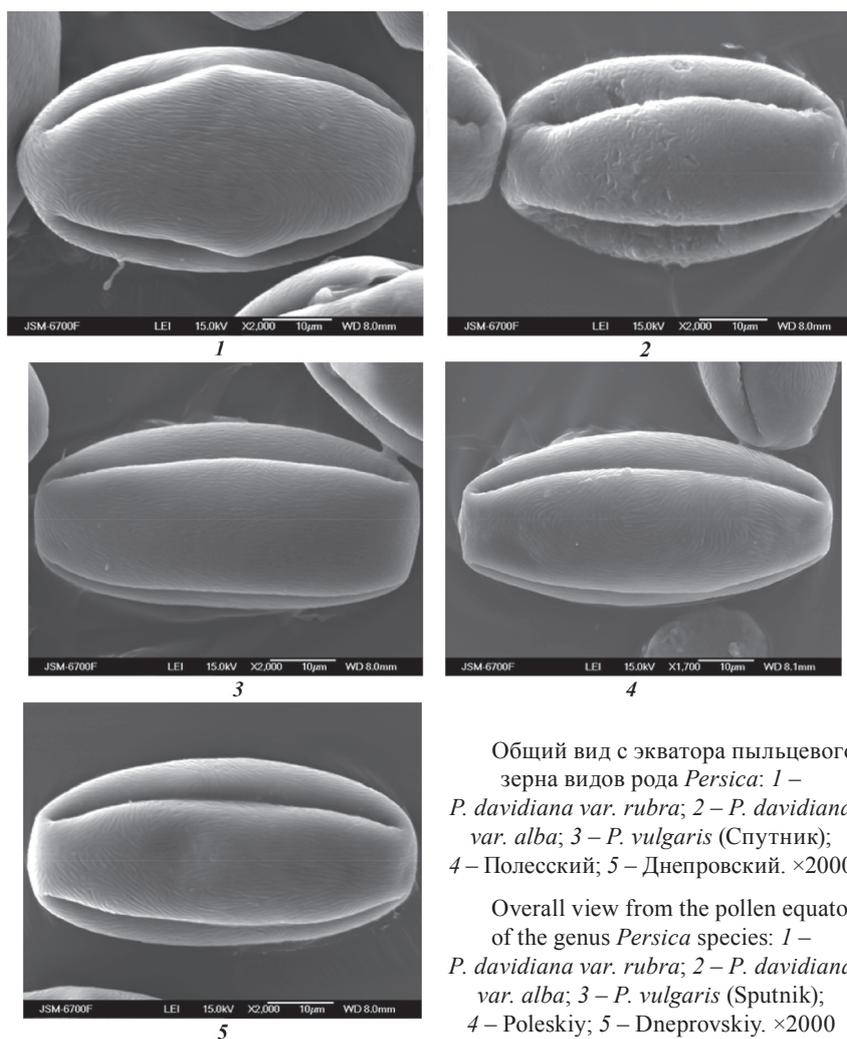
**Результаты и их обсуждение.** Пыльца всех исследованных видов имела желтую окраску. Пыльцевые зерна одиночные (монады), апертуры сложные – трехборозднопоровые, полярная и экваториальная оси четко различались: с экватора они удлиненно-эллипсоидальной формы, с полюса – округло-треугольной. Характер контура ровно-округлый [2, 9]. Меридиональные борозды у представителей  *P. vulgaris* длинные, ровные, немного не доходящие до полюсов, у  *P. davidiana* – немного сужающиеся к полюсам. Бороздная мембрана гладкая.

У большаінства изученных аб'ектаў скульптура мезокольпіума струйчатая, пераходзячая в струйчато-сросшуюся (см. рисунок, 3–5) и волнисто-морщинистую (2), часто перфорированная. У *P. davidiana* var. *alba* набудалась небульшая деформация спородермы пыльцевого зерна, что может являться свидетельством абиотического воздействия окружающей среды. В свою очередь скульптура имела прямо-ребристую (3) и извилисто-ребристую структуру (2, 4, 5), в зависимости от расположения гребневидных выростаний, которые были размещены прерывисто (2) или сгруппированы в извилистые ряды (4).

Скульптурные элементы расположены меридиально и параллельно, а обычно прерывчатые, короткие и удлиненные стенки чередовались с извилистыми желобками. На полюсах пыльцевого зерна исследованных видов набудался сетчатый скульптурный орнамент. Борозды длинные, с параллельными краями, концы борозд слегка округлые и слабо заостренные. Микроспоры персика обоих видов дисимметричны.

Результаты измерения длины полярной оси и экваториального диаметра показали, что пыльцевые зерна исследуемых видов характеризуются как крупные [10]. Так, у *P. davidiana* длина полярной оси составляла 50,10–55,16 мкм, у *P. vulgaris* – 54,65–62,50 мкм, а экваториальный диаметр варьировался от 28,52 до 30,54 мкм у первого и от 29,66 до 32,15 мкм у второго вида (табл. 1). Для представителей *P. vulgaris* характерны более крупные размеры пыльцевых зерен, чем для растений вида *P. davidiana*. Средний индекс формы составил 1,75–1,99. Изменчивость вариационного ряда была незначительной.

Выявленные различия скульптуры поверхности мезокольпіума пыльцевых зерен и сравнительный анализ объектов исследования позволили выделить некоторые критерии отличия (табл. 2).



Общий вид с экватора пыльцевого зерна видов рода *Persica*: 1 – *P. davidiana* var. *rubra*; 2 – *P. davidiana* var. *alba*; 3 – *P. vulgaris* (Спутник); 4 – Полесский; 5 – Днепровский.  $\times 2000$

Overall view from the pollen equator of the genus *Persica* species: 1 – *P. davidiana* var. *rubra*; 2 – *P. davidiana* var. *alba*; 3 – *P. vulgaris* (Sputnik); 4 – Poleskiy; 5 – Dneprovskiy.  $\times 2000$

Таблица 1. Морфометрическая характеристика видов и сортов *Persica*

 Table 1. Morphometric characteristic of *Persica* species and varieties

Генотип		P-полярная ось, мкм				E-экваториальный диаметр, мкм				SI
		min	max	$\Delta x$	V, %	min	max	$\Delta x$	V, %	
<i>P. davidiana</i>	<i>var. alba</i>	47,89	52,71	50,10	3,61	25,60	33,23	28,52	8,70	1,75
	<i>var. rubra</i>	54,11	60,14	55,16	4,72	28,40	33,27	30,54	5,54	1,80
<i>P. vulgaris</i>	Спутник	49,24	56,81	54,65	4,68	27,28	29,98	29,66	6,43	1,84
	Полесский	55,72	64,27	61,86	4,03	28,34	34,29	30,99	5,58	1,99
	Днепровский	59,78	63,62	62,50	2,2	30,31	34,74	32,15	4,37	1,94

Примечание. min – минимальное значение; max – максимальное значение;  $\Delta x$  – среднее арифметическое выборки; V – коэффициент вариации (%); SI – индекс формы (соотношение P/E).

 Таблица 2. Наличие или отсутствие выделенных признаков у изучаемых видов *Persica*

 Table 2. Presence or lack of the selected micromorphological features of *Persica* species

Признак		<i>P. davidiana</i>		<i>P. vulgaris</i>		
		<i>var. alba</i> Bean	<i>var. rubra</i> Bean	Спутник	Полесский	Днепровский
Апертура борозднопоровая		+	+	+	+	+
Структура	струйчато-сросшаяся		+	+	+	+
	волнисто-морщинистая	+				
Руги		+		+		
Перетяжка			+	+	+	+
Перфорации				+	+	+

Примечание. + – наличие признака.

**Заключение.** В результате сравнительного морфологического анализа пыльцевых зерен видов рода *Persica*, произрастающих в Национальном ботаническом саду им. Н. Н. Гришко, установлены следующие количественные и качественные их особенности:

- размер пыльцевых зерен – крупный (*P. davidiana*, *P. vulgaris*);
- строение – трехборозднопоровое (*P. davidiana*, *P. vulgaris*);
- текстура экзины – струйчато-сросшаяся (*P. vulgaris*), волнисто-морщинистая (*P. davidiana var. alba*);
- наличие перфорации (*P. vulgaris*);
- наличие перетяжек у струйчатых элементов скульптуры (*P. vulgaris*, *P. davidiana var. rubra*);
- наличие руг (*P. davidiana var. alba*, Спутник).

Результаты исследований показали, что у сортов Днепровский и Полесский пыльца более крупного размера (62,50 и 61,86 мкм – полярная ось, 32,15 и 30,99 мкм – экваториальный диаметр), чем у сорта Спутник (54,65 и 29,66 мкм) и у представителей *P. davidiana*, а также отличается бóльшим значением индекса формы (1,94–1,99).

### Список использованных источников

1. Голубинский, И. Е. Биология прорастания пыльцы / И. Е. Голубинский. – Киев: Наук. думка, 1974. – 368 с.
2. Особенности микроструктуры пыльцевых зерен некоторых представителей рода *Prunus* L. / С. М. Мотылева [и др.] // Достижения и перспективы развития селекции, возделывания и использования плодовых культур. – Ялта, 2011. – С. 44–46.
3. Соколова, Е. А. Значение анатомических признаков для систематики представителей подсемейства Prunoideae (Rosaceae): дис. ... д-ра биол. наук / Е. А. Соколова. – СПб., 2000. – 28 с.
4. Самвелян, Г. Е. О разнокачественности пыльцы сортов *Persica vulgaris* Mill. в условиях Армянской ССР / Г. Е. Самвелян, А. И. Башкирян // Биол. журн. Армении. – 1980. – № 33 (7). – С. 703–708.
5. Карупу В. Я. Электронная микроскопия / В. Я. Карупу. – Киев: Наука, 1984. – 208 с.
6. Уикли, Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли. – М.: Мир, 1975. – 325 с.
7. Куприянова, Л. А. Пыльца двудольных растений европейской части СССР / Л. А. Куприянова, Л. А. Алешина. – Л.: Наука, 1978. – 184 с.

8. Урбах, В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков / В. Ю. Урбах; Акад. наук СССР, Ин-т биол. физики. – М.: Изд-во Акад. наук СССР, 1963. – 323 с.
9. Федоров, А. А. Атлас по описательной морфологии высших растений. Цветок / А. А. Федоров, З. Т. Артюшенко. – Л.: Наука, 1975. – С. 62–66.
10. Токарев, П. И. Морфология и ультраструктура пыльцевых зерен / П. И. Токарев. – М.: КМК, 2002. – 51 с.

### References

1. Golubinskiy, I. E. (1974), *Biologiya prorstaniya pyiltsyi* [Pollen germination biology], Naukova dumka, UA.
2. Motyleva, S. M., Dzhigadlo, Ye. N., Kuznetsov, M. N. and Mertvishcheva, M. E. (2011), “Features of the microstructure of pollen grains of some members of the genus *Prunus* L.”, *Dostizheniya i perspektivy razvitiya seleksii, vzdelyvaniya i ispolzovaniya plodovykh kultur* [Achievements and prospects of breeding, cultivation and utilization of horticultural crops], Yalta, UA, pp. 44–46.
3. Sokolova, E. A. (2000), “The value of the anatomical features of the systematics of the subfamily Prunoideae (Rosaceae)”, Ph. D. Theses, Sankt-Peterburg, RU.
4. Samvelyan, G. E. and Bashkiryan, A. I. (1980), “About the pollen of different quality grades *Rersica vulgaris* Mill in Armenian SSR”, *Biologicheskij zhurnal Armenii*, no. 33 (7), pp. 703–708.
5. Karupu, V. Ya. (1984), *Elektronnaya mikroskopiya* [Electron microscopy], Nauka, Kyiv, UA.
6. Uikli, B. (1975), *Elektronnaya mikroskopiya dlya nachinayuschih* [A beginner’s handbook in biological electron microscopy], Mir, Moscow, RU.
7. Kupriyanova, L. A. and Aleshina, L. A. (1978), *Pyiltsa dvudolnyih rasteniy Evropeyskoy chasti SSSR* [Pollen dicotyledonous plants of the European part of the USSR], Nauka, Leningrad, RU.
8. Urbakh, V. Yu. (1963), *Matematicheskaya statistika dlya biologov i medikov* [Mathematical statistics for biologists and physicians], Izdatel’stvo Akademii nauk SSSR, Moscow, RU.
9. Fedorov, A. A. and Artyushenko, Z. T. (1975), *Atlas po opisatelnoy morfologii vyisshih rasteniy. Tsvetok* [Atlas of descriptive morphology of higher plants. Flower], Nauka, Leningrad, RU.
10. Tokarev, P.I. (2002), *Morfologiya i ultrastruktura pyiltsevyih zeren* [Morphology and ultrastructure of pollen], KMK, Moscow, RU.

### Информация об авторах

Голубкова Ирина Н. – вед. науч. сотрудник. Национальный ботанический сад им. Н. Н. Гришко НАН Украины (ул. Тимирязевская, 1, 01014, г. Киев, Украина). E-mail: Ira\_golubkova@mail.ru

### Information about the authors

**Golubkova Irina N.** – Leading researcher. National Botanical Garden of M. M. Gryshko of the National Academy of Sciences of Ukraine (1, Timiryazevskaya Str, 01014, Kyiv, Ukraine). E-mail: Ira\_golubkova@mail.ru

### Для цитирования

Голубкова, И. Н. Морфологический анализ пыльцы представителей рода *Persica* Mill. / И. Н. Голубкова // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 1. – С. 90–94.

### For citation

Golubkova, I. N. (2017), “Morphological analysis of pollen of the genus *Persica* Mill. species”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, no. 1, pp. 90–94.

**Т. В. Рябцева<sup>1</sup>, Е. Л. Седёлкина<sup>1</sup>, Д. А. Макаревич<sup>2</sup>, Г. Н. Бычко<sup>1</sup>,  
В. В. Кирковский<sup>1</sup>, В. П. Голубович<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

### **СИНТЕЗ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ И ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ НЕЙТРОФИЛАМИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO* В ОТВЕТ НА ДЕЙСТВИЕ АКТИВАТОРА НА ОСНОВЕ КЛЕТОК *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Иммуномодуляция представляет собой систему мер, направленных на возвращение иммунного статуса к исходному (нормальному) уровню при различных состояниях. В последние годы среди иммуномодулирующих средств особый интерес вызывают препараты микробного происхождения, под влиянием которых усиливаются функциональные свойства фагоцитов (повышаются фагоцитоз и внутриклеточный киллинг поглощенных бактерий), возрастает продукция провоспалительных цитокинов, необходимых для инициации гуморального и клеточного иммунитета.

Целью работы являлось определение влияния активатора, полученного из клеток *Saccharomyces cerevisiae*, на синтез провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8) и экспрессию на поверхности нейтрофилов доноров-маркеров клеточной адгезии (CD162, CD177) и активации клеток (CD69, CD281, CD282, CD286).

Показано, что выделенный из клеточного лизата дрожжей гликопротеин обладает способностью индуцировать синтез провоспалительных цитокинов клетками крови, причем в большей степени индуцируется синтез ИЛ-8. Кроме того, выделенный гликопротеин обладает способностью активировать нейтрофилы доноров, что подтверждается изменением экспрессии на поверхности клеток маркеров активации и молекул адгезии. При воздействии гликопротеина на *Saccharomyces cerevisiae* на нейтрофилы происходит достоверное увеличение содержания как CD281+282+-клеток, так и CD282+286+-клеток. После взаимодействия клеток крови с гликопротеином дрожжей доля нейтрофилов, экспрессирующих CD162, достоверно снижается, при этом происходит достоверное увеличение количества клеток, экспрессирующих маркер CD177.

*Ключевые слова:* иммуномодулятор, цитокины, гликопротеин, нейтрофилы, маркеры дифференцировки.

**T. V. Ryabtseva<sup>1</sup>, E. L. Sedelkina<sup>1</sup>, D. A. Makarevich<sup>2</sup>, G. N. Bychko<sup>1</sup>, V. V. Kirkovskiy<sup>1</sup>, V. P. Golubovich<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, Minsk, Republic of Belarus

### **PROINFLAMMATORY CYTOKINES SYNTHESIS AND ADHESION MOLECULES EXPRESSION BY NEUTROPHILS *IN VITRO* IN RESPONSE TO ACTIVATOR BASED ON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Immunomodulation is a modulation (regulatory adjustment) of the immune system at the return of the immune status to the normal level. Of particular interest are the immunomodulatory drugs of microbial origin. Under the influence of these drugs are enhanced functional properties of phagocytes (increased phagocytosis and intracellular killing of bacteria absorbed), increased production of proinflammatory cytokines, required for the initiation of humoral and cellular immunity.

The article presents the results of studying activity of the biological activator obtained from *Saccharomyces cerevisiae* cell. Activator induce the synthesis of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) by blood donor's cells.

As a result, that isolated from yeast cell lysate glycoprotein has the ability to induce synthesis of proinflammatory cytokines blood cells, largely induced synthesis of IL-8. These results indicate that isolated from yeast cell lysate glycoprotein has the ability to activate neutrophils donors by changing expression adhesion markers (CD162, CD177) and cell activation (CD69, CD281, CD282, CD286). Under the influence of the glycoprotein *Saccharomyces cerevisiae* on neutrophils occurs as a significant increase in the percentage of CD281+282+ cells and CD282+286+ cells. After the interaction of blood cells with the yeast glycoprotein, the percentage of neutrophils expressing CD162 reduced significantly, thus there is a significant increase in cells expressing the CD177 marker.

*Keywords:* immunomodulator, cytokine, glycoprotein, neutrophils, differentiation markers.

**Введение.** Иммуноterapia представляет интерес для врачей всех специальностей в связи с неуклонным ростом инфекционно-воспалительных заболеваний, хроническое и рецидивирующее течение которых отмечается на фоне низкой эффективности проводимой базовой терапии злокачественных новообразований, аутоиммунных и аллергических заболеваний, системных заболеваний, вирусных инфекций, обуславливающих высокий уровень заболеваемости, смертности и инвалидности.

В настоящее время выделяют 6 основных групп иммуномодуляторов: микробные, тимические, костномозговые, цитокины, нуклеиновые кислоты и химически чистые [1].

Иммуномодуляторы микробного происхождения условно можно разделить на три поколения.

Первым препаратом, разрешенным к медицинскому применению в качестве иммуностимулятора, была вакцина БЦЖ, обладающая выраженной способностью усиливать факторы как врожденного, так и приобретенного иммунитета. К микробным препаратам первого поколения можно отнести и такие лекарственные средства, как пирогенал и продигозан, представляющие собой полисахариды бактериального происхождения. В настоящее время из-за пирогенности и других побочных эффектов они применяются редко.

К микробным препаратам второго поколения относятся лизаты (Бронхомунал, ИРС-19, Имудон, сравнительно недавно появившийся на российском фармацевтическом рынке препарат швейцарского производства Бронхо-Ваксом) и рибосомы бактерий (Рибомунил), относящихся к основным возбудителям респираторных инфекций (*Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* и др.). Эти препараты имеют двойное назначение: специфическое (вакцинирующее) и неспецифическое (иммуностимулирующее).

К микробным препаратам третьего поколения можно отнести Ликопид, который состоит из природного дисахарида – глюкозаминилмурамила и присоединенного к нему синтетического дипептида – L-аланил-D-изоглутамина. В организме главной мишенью для иммуномодуляторов микробного происхождения являются фагоцитарные клетки. Под влиянием этих препаратов усиливаются функциональные свойства фагоцитов (повышаются фагоцитоз и внутриклеточный киллинг поглощенных бактерий), возрастает продукция провоспалительных цитокинов, необходимых для инициации гуморального и клеточного иммунитета [1–3].

Не останавливаясь на характеристике иммуномодуляторов остальных групп, нами изучена биологическая активность полученного из клеток *Saccharomyces cerevisiae* активатора. Данный активатор предполагается использовать в дальнейшем в качестве лиганда для иммобилизации на твердый носитель и синтеза модуля для изучения возможности экстракорпоральной иммуномодуляции.

Цель работы – определить влияние активатора на основе клеток *Saccharomyces cerevisiae* на синтез провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8) и экспрессию на поверхности нейтрофилов доноров-маркеров клеточной адгезии (CD162, CD177) и активации клеток (CD69, CD281, CD282, CD286).

**Материалы и методы исследования.** Для получения активатора лиофилизированную биомассу клеток дрожжей (5 г) суспензировали в 50 мл хлорида натрия. Затем проводили первичную механическую обработку суспензии дрожжевых клеток в физиологическом растворе на аппарате РЦД 160 (диспергатор) в течение 2 ч в режиме тонкого измельчения. Диспергированную суспензию обрабатывали жидким азотом, затем измельчали в ступке керамическим пестиком в течение 10 мин. Полученную массу распределяли по 10-миллилитровым пробиркам и центрифугировали 10 мин при 1000 оборотов для удаления крупных фракций и клеток. Далее надосадочную жидкость центрифугировали при 3000 оборотов 15 мин для осаждения более крупных клеток и фрагментов клеточных стенок. Полученный супернатант, содержащий гликопротеины и белки клеточной стенки дрожжевых клеток, отбирали в пробирки «эппендорф», хроматографически выделяли обогащенную гликопротеинами фракцию, которую затем высушивали с помощью лиофильной сушки и хранили при 4–10 °С. В эксперименте использовали 2 мл цельной гепаринизированной крови и 1 мл раствора полученного активатора (2 мг/мл). Смесь инкубировали 90 мин при 37 °С, затем центрифугировали (10 мин при 3000 оборотов), собирали надосадочную жидкость, которую замораживали для дальнейшего изучения. Концентрацию цитокинов определяли методом иммуноферментного анализа. Для сравнения активности использовали известный активатор Зутозан (2 мг/мл). Фоновый уровень синтеза цитокинов клетками крови регистрировали после инкубации цельной крови с соответствующим объемом физиологического раствора (0,9 % NaCl).

Интенсивность воздействия определяли по скорости синтеза цитокина в единицу времени и рассчитывали по формуле  $I = (K_1 - K_0)/t$ , где  $K_1$  – концентрация цитокина после инкубации с активатором,  $K_0$  – концентрация цитокина после инкубации с физраствором,  $t$  – время инкубации.

Экспрессию маркеров на поверхности нейтрофилов оценивали с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Нормальный уровень экспрессии маркеров регистрировали после инкубации цельной крови с соответствующим объемом физраствора (0,9 % NaCl).

**Результаты и их обсуждение.** В табл. 1 представлены результаты определения концентрации цитокинов в надосадочной жидкости после взаимодействия цельной крови с гликопротеином клеточной стенки дрожжей.

Т а б л и ц а 1. Концентрация цитокинов в крови практически здоровых доноров в ответ на действие активатора

Table 1. The concentration of cytokines in the blood of healthy donors in response to activator

Цитокин	Физраствор	Гликопротеин	Дрожжи	Зимозан
ФНО- $\alpha$	13,59 (4,57; 38,57)	274,69* (245,94; 317,64)	345,14* (310,27; 350,41)	5412,80* (2453,02; 8372,58)
ИЛ-1 $\beta$	1,31 (0,00; 13,62)	16,23* (2,13; 62,36)	8,31 (5,59; 17,61)	118,50* (7,02; 199,50)
ИЛ-6	0,00 (0,00; 3,56)	37,49* (24,81; 137,94)	8,49* (2,13; 20,91)	81,59* (71,79; 199,50)
ИЛ-8	48,67 (35,77; 187,80)	413,35* (399,35; 498,00)	362,10* (275,30; 386,90)	78,63 (67,49; 89,14)

П р и м е ч а н и е. \* – достоверная разница ( $p \leq 0,05$ ) при попарном сравнении с группой контроля (физраствор).

Установлено, при взаимодействии гликопротеина дрожжей и клеток крови концентрация провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8) увеличивается.

Как следует из результатов рангового дисперсионного анализа по методу Фридмана, представленных в табл. 2, существуют достоверные различия между скоростью синтеза различных цитокинов при действии разных активаторов. Так, при активации клеток крови исследуемым гликопротеином максимальная скорость синтеза наблюдалась для ИЛ-8 (31,23 (18,66; 50,82) нг/мин), минимальная – для ИЛ-1 $\beta$  (0,17 (0,00; 0,68) нг/мин). Следует отметить, что при активации клеток крови цельными дрожжевыми клетками скорость синтеза всех цитокинов была незначительна, наибольшее значение скорости синтеза наблюдалось для ФНО- $\alpha$  (3,06 (2,72; 3,58) нг/мин), наименьшее – для ИЛ-6 и ИЛ-1 $\beta$  (0,07 (0,03; 0,20) и 0,08 (0,04; 0,10) нг/мин соответственно).

Т а б л и ц а 2. Скорость синтеза цитокинов клетками крови доноров в ответ на действие активатора, нг/мин

Table 2. The rate of synthesis of cytokines cells of blood donors in response to the action of the activator, NG/min

Цитокин	Гликопротеин**	Дрожжи**	Зимозан**	Достоверность различий в ряду
ФНО- $\alpha$ *	2,55 (2,03; 3,38)	3,06 (2,72; 3,58)	57,86 (24,79; 90,94)	$p = 0,0039$ , $N = 11,08$
ИЛ-1 $\beta$	0,17 (0,00; 0,68)	0,08 (0,04; 0,10)	1,20 (0,07; 1,52)	$p = 0,2181$ , $N = 3,04$
ИЛ-6*	0,41 (0,31; 1,27)	0,07 (0,03; 0,20)	0,65 (0,28; 1,52)	$p = 0,0009$ , $N = 14,01$
ИЛ-8*	31,23 (18,66; 50,82)	2,52 (0,65; 4,24)	0,33 (0,00; 0,94)	$p = 0,0243$ , $N = 7,43$
Достоверность различий в столбце	$p = 0,00738$ $k = 1,00$	$p = 0,04206$ $k = 0,911$	$p = 0,00635$ $k = 0,850$	

П р и м е ч а н и е. Достоверность различий: \* – между группами в ряду (независимые группы), использовали ранговый дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса; \*\* – между группами в столбце (зависимые группы), использовали ранговый дисперсионный анализ Фридмана.

Под действием Зимозана максимально эффективно клетками крови синтезируется ФНО- $\alpha$  (57,86 (24,79; 90,94) нг/мин), наименее эффективно – ИЛ-8 (0,33 (0,00; 0,94) нг/мин). Таким образом, можно сделать вывод, что цельные клетки микроорганизмов активируют синтез цитокинов незначительно, в то время как выделенные из клеток дрожжей полисахариды (Зимозан) или гликопротеины обеспечивают активный синтез цитокинов клетками крови человека. Причем активация клеток крови человека полисахаридами (Зимозан) приводит к значительному накоплению ФНО- $\alpha$ , в то время как активация гликопротеинами способствует накоплению ИЛ-8. Учитывая тяжелые системные влияния на организм, которые опосредует ФНО- $\alpha$ , активация клеток крови гликопротеинами *Saccharomyces cerevisiae*, с нашей точки зрения, более предпочтительна. Данный цитокин является хемокином, способствует экспрессии Toll-like рецепторов (ТЛР), что будет приводить к активации хемотаксиса нейтрофилов и моноцитов в очаг воспаления [4, 5].

В ходе исследования установлено, что после взаимодействия гликопротеина дрожжей с нейтрофилами крови доноров происходит достоверное увеличение количества клеток, экспрессирующих маркер CD177 (табл. 3). Молекула CD177 является нейтрофил-специфическим антигеном человека. Согласно данным научной литературы, под действием антигенов микроорганизмов и некоторых цитокинов экспрессия данной молекулы на поверхности нейтрофилов возрастает [6]. Предполагается также участие CD177 в развитии микробицидных реакций нейтрофилов. Кроме того, CD177 является молекулой клеточной адгезии, принимающей активное участие в миграции лейкоцитов в очаг воспаления, опосредуя взаимодействие нейтрофилов с клетками эндотелия. Таким образом, выделенный нами активатор увеличивает долю нейтрофилов, способных к миграции в очаг воспаления через увеличение экспрессии CD177.

Т а б л и ц а 3. Изменение доли нейтрофилов доноров, экспрессирующих на своей поверхности маркер активации и клеточной адгезии, в ответ на действие активатора

Table 3. The change in share of donor cells, neutrophils on its surface activation token and cell adhesion in response to activator

Маркер дифференцировки	К-во нейтрофилов, %	
	Физраствор	Гликопротеин
CD69+	64,20 (53,80; 85,20)	81,90 (53,00; 89,70)
CD162+	98,30 (93,90; 99,90)	83,30 (59,90; 92,30)*
CD177+	87,80 (70,50; 94,40)	99,20 (94,10; 100,00)*
CD281+282+	0,67 (0,54; 1,05)	1,43 (1,21; 2,96)*
CD282+286+	0,78 (0,51; 3,06)	2,98 (1,33; 8,66)*

Примечание. \* – достоверная разница ( $p \leq 0,05$ ) при статистическом анализе методом Вилкоксона.

Кластером дифференцировки CD162 является гликопротеиновый лиганд Р-селектина 1 (PSGL-1) – трансмембранный белок на поверхности лейкоцитов (основной лиганд селектинов). Он играет важную роль в процессе задержки и роллинга лейкоцитов на поверхности эндотелия сосудов, который является начальным этапом в связывании, секвестрации и трансмиграции лейкоцитов при воспалительной реакции. Белок находится на нейтрофилах, моноцитах и большинстве лимфоцитов [7]. Наши исследования показали, что после взаимодействия клеток крови с гликопротеином дрожжей доля нейтрофилов, экспрессирующих CD162, достоверно снижается. Факт уменьшения содержания CD162+ нейтрофилов говорит об активации клеток. По данным литературы, экспрессия CD162 снижается при развитии воспаления, а также при активации ИЛ-6 и другими провоспалительными факторами [8].

Динамика экспрессии CD69 на поверхности нейтрофилов носит статистически недостоверный характер. В процессе исследования наблюдались разнонаправленные изменения. Вероятнее всего, синтез и экспрессия CD69 опосредуются различными факторами и во многом зависят от индивидуальных особенностей организма.

Изучение динамики экспрессии ТЛР на поверхности нейтрофилов показало, что при воздействии гликопротеина *Saccharomyces cerevisiae* на нейтрофилы происходит достоверное изменение относительного содержания как CD281+282+-клеток, так и CD282+286+-клеток в сторону его увеличения. Положительная динамика коэкспрессии ТЛР-1 (CD281) с ТЛР-2 (CD282), а также ТЛР-2 (CD282) с ТЛР-6 (CD286) говорит об активации нейтрофилов и о готовности данных клеток к распознаванию антигенов грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибковых антигенов [9].

**Заключение.** Установлено, что выделенный из клеточного лизата дрожжей гликопротеин обладает способностью индуцировать синтез провоспалительных цитокинов клетками крови, причем в большей степени индуцируется синтез ИЛ-8. Кроме того, выделенный из клеточного лизата дрожжей гликопротеин обладает способностью активировать нейтрофилы доноров, что подтверждается изменением экспрессии на поверхности клеток маркеров активации и молекул

адгезии. В дальнейшем гликопротеин *Saccharomyces cerevisiae* может быть использован для синтеза иммуномодуляторов. Выделенная форма гликопротеина, в отличие от известного активатора Зимозана, является хорошо растворимой и может быть ковалентно «пришита» на матрицу с целью синтеза иммуномодуля, который в дальнейшем можно будет использовать у пациентов с хроническими гнойными инфекциями для активации клеточного иммунитета.

### Список использованных источников

1. Доценко, Э. А. Иммунодефициты и некоторые иммуномодулирующие средства / Э. А. Доценко, Д. А. Рождественский, Г. И. Юпатов // Вестн. ВГМУ. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 103–120.
2. Новиков, Д. К. Иммунокоррекция, иммунопрофилактика, иммунореабилитация / Д. К. Новиков. – Витебск, 2006. – 198 с.
3. Хаитов, Р. М. Основные принципы иммуномодулирующей терапии / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин // Аллергия, астма и клин. иммунология. – 2000. – № 1. – С. 9–16.
4. Фрейдлин, И. С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции / И. С. Фрейдлин // Иммунология. – 2001. – № 5. – С. 4–7.
5. Симбирцев, А. С. Интерлейкин-8 и другие хемокины / А. С. Симбирцев // Иммунология. – 1999. – № 4. – С. 9–15.
6. Ulrich, J. H. The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) / J. H. Ulrich, Sachs, Cornelia L. Andrei-Selmer // The J. of Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282, N 32. – P. 23603–23612.
7. Zarbock, A. PSGL-1-dependent myeloidleukocyte activation / A. Zarbock, H. Müller, Y. Kuwano, K. Ley // J. Leukoc. Biol. – 2009. – N 86. – P. 1119–1124.
8. Hashizume, M. IL-6 plays an essential role in neutrophilia under inflammation / M. Hashizume, Y. Higuchi, Y. Uchiyama // Цитокине. – 2011. – N 54. – P. 92–99.
9. Iwasaki, A. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses / A. Iwasaki, R. Medzhitov // Nature immunol. – 2004. – Vol. 5, N 10. – P. 987–995.

### References

1. Dotsenko, E. A., Christmas, D. A. and Yupatov, G. I. (2014), “Immunodeficiencies and some immunomodulatory agents”, *Vestnik Vitebsk State Medical University*, vol. 13, no. 3, pp. 103–120.
2. Novikov, D. K. (2006), *Immunotherapy, immunoprophylaxis, immunorehabilitation*, Vitebsk, p. 198.
3. Khaïtov, R. M. and Pinegin, B. V. (2000). “Basic principles of therapies, allergy, asthma, and wedge”, *Immunology*, no. 1, pp. 9–16.
4. Freidlin, J. S. (2001), “Paracrine and autocrine mechanisms of immune cytokine”, *Immunology*, no. 5, pp. 4–7.
5. Simbirtsev, A. (1999) “Interleukin-8 and other chemokines”, *Immunology*, no. 4, pp. 9–15.
6. Ulrich, J. H., Sachs, Cornelia L. Andrei-Selmer (2007), “The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)”, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 32, pp. 23603–23612.
7. Zarbock, A., Müller, H., Kuwano and Y., Ley, K. “PSGL-1-dependent myeloidleukocyte activation”, *Journal of Leukocyte Biology*, no. 86, pp. 1119–1124.
8. Hashizume, M., Higuchi, Y. and Uchiyama, Y. (2011), “IL-6 plays an essential role in neutrophilia under inflammation”, *Цитокине*, no. 54, pp. 92–99.
9. Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2004), “Toll-like receptor control of the adaptive immune responses”. *Nature immunology*, vol. 5, no. 10, pp. 987–995.

### Информация об авторах

*Рябцева Татьяна Владимировна* – науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ta-yana@yandex.ru

*Седёлкина Елена Леонидовна* – науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: hemosorption@mail.ru

*Макаревич Денис Александрович* – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, д. 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: demkarevich@yandex.ru

### Information about the authors

*Ryabtseva Tatiana Vladimirovna* – Researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinsky Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ta-yana@yandex.ru

*Sedelkina Elena Leonidovna* – Researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinsky Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: hemosorption@mail.ru

*Makarevich Dzenis Aleksandrovich* – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences (5/2, V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: demkarevich@yandex.ru

*Бычко Галина Николаевна* – канд. биол. наук, вед. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: hemosorption@mail.ru.

*Кирковский Валерий Васильевич* – д-р мед. наук, профессор, гл. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kirkovskv@mail.ru

*Голубович Владимир Петрович* – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, д. 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: demkarevich@yandex.ru

### Для цитирования

Синтез провоспалительных цитокинов и экспрессия молекул адгезии нейтрофилами человека *in vitro* в ответ на действие активатора на основе клеток *Saccharomyces cerevisiae* / Т. В. Рябцева [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 1. – С. 95–100.

*Bychko Galina Nicolaevna* – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinsky Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: hemosorption@mail.ru

*Kirkovskiy Valeriy Vasilevich* – D. Sc. (Med.), Professor, Leading researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinsky Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kirkovskv@mail.ru

*Golubovich Vladimir Petrovich* – D. Sci. (Biol.), Professor, Leading researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences (5/2, V. F. Kuprevicha Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: demkarevich@yandex.ru

### For citation

Ryabtseva, T. V., Sedelkina, E. L., Makarevich, D. A., Bychko, G. N., Kirkovskiy, V. V. and Golubovich, V. P. (2017), “Proinflammatory cytokines synthesis and adhesion molecules expression by neutrophils *in vitro* in response to activator based on *Saccharomyces cerevisiae*”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, no. 1, pp. 95–100.

## АГЛЯДЫ

## REVIEWS

Е. А. Волуевич

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*ГЕНЕТИКА УСТОЙЧИВОСТИ РАПСА (*BRASSICA NAPUS* L.) К ФОМОЗУ

Фомоз является широко распространенной болезнью рапса, которую вызывают два вида грибных патогенов – *Leptosphaeria maculans* и *L. biglobosa*, причем наиболее значимые потери урожая наносит *L. maculans*. Оба патогена являются гемибитрофами. Они способны сохраняться в течение многих лет на стерне и растительных остатках. Источником первичной инфекции для всходов рапса служат аскоспоры и пикнидиоспоры. Фомоз развивается на всех органах растений: на листьях и стручках – в виде серых сухих овальных пятен, на стеблях – в виде рака стебля (наиболее тяжелое поражение растений), на корнях – в виде сухой корневой гнили. При высоких температурах тяжесть симптомов усиливается, поэтому с потеплением климата угроза фомоза еще больше возрастает.

Геном *L. maculans* секвенирован, клонировано 7 генов авирулентности. Секвенирован также геном рапса, но клонирован пока 1 из 14 известных главных генов устойчивости к *L. maculans*. Взаимодействие генов авирулентности с комплементарными генами устойчивости в фитопатосистеме *Brassica* – *L. maculans* происходит по типу «ген на ген». Все известные главные гены устойчивости рапса к *L. maculans* локализованы в А-геноме, с помощью ассоциативного картирования определены локусы устойчивости и в С-геноме. Некоторые гены устойчивости интрогрессированы в рапс из других видов (*B. rapa*, *B. juncea*, *B. nigra*). Кроме главных генов ювенильной (расоспецифической) устойчивости выявлены малые гены количественной (частичной, полевой) устойчивости рапса к фомозу. Необходимо активизировать изучение генетики устойчивости рапса и к *L. biglobosa*, который вызывает существенные потери урожая в странах с высокой летней температурой.

*Ключевые слова:* рапс, фомоз, гены авирулентности, гены устойчивости.

Е. А. Voluevich

*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*GENETICS OF RAPE (*BRASSICA NAPUS* L.) RESISTANCE TO BLACKLEG

Blackleg, harmful and widespread disease of rape, is caused by two species of fungal pathogen *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*, *L. maculans* does more significant losses to crop. Both pathogens are hemibiotrophs. They can persist for many years in the stubble and crop residues. The source of primary infection for rape seedlings are ascospores and picnidiospores. Blackleg develops on all plant organs. The disease manifests on the leaves and pods as dry gray oval spots, on the stems may occur most damaging defeat of plants (stem cancer), on the roots – dry root rot. The severity of symptoms increased at high temperatures, so global warming leads to greater threat of blackleg.

*L. maculans* genome was sequenced and seven avirulence genes were cloned. Rapeseed genome also sequenced but only one gene was cloned of 14 known major resistance genes to *L. maculans*. The interaction of avirulence genes with complementary resistance genes in *Brassica* – *L. maculans* system occurs by «gene to gene». All known major rape resistance genes to *L. maculans* were localized in A – genome, but resistance loci were identified also in C-genome of rape by association mapping. Some resistance genes were introgressed into rape from other species (*B. rapa*, *B. juncea*, *B. nigra*). Besides the major genes of juvenile (race-specific) resistance there were identified minor genes of quantitative (partial, field) blackleg rape resistance. It is necessary to intensify the research of rape resistance genetics to *L. biglobosa* which causes significant yield loss in countries with high summer temperatures.

*Keywords:* rape, blackleg, avirulence genes, resistance genes.

**Введение.** Рапс (*Brassica napus* L., ААСС,  $2n = 38$ ) является второй после сои культурой для получения растительного масла пищевого назначения. Семена современных сортов, как правило, содержат от 40 до 45 % масла, что обеспечивает сырьем производство метилового эфира (биодизельное топливо), промышленных смазочных и гидравлических масел, поверхностно-активных моющих средств и мыла, биоразлагаемых пластмасс [1]. После отжима масла жмых, содержащий 38–44 % высококачественного белка, используется на корм скоту.

Широко распространенной болезнью рапса в различных странах мира, включая Беларусь, является фомоз. С потеплением климата и интенсификацией производства культуры возросло значение этой болезни. В статье рассмотрены биологические особенности возбудителей фомоза, их вредоносность и генетика взаимодействия в фитопатосистеме *Brassica napus* – *Leptosphaeria maculans*.

**Вредоносность возбудителей фомоза и их биологические особенности.** Фомоз рапса вызывается двумя видами грибов – *L. maculans* (Desm.) Ces. et de Not. и *L. biglobosa* Shoemaker & H. Brun. из класса Dothideomycetes O. E. Eriksson & Winka, порядка Pleosporales Luttr. ex M. E. Barr, семейства Leptosphaeriaceae M. E. Barr. Предполагается, что они произошли от общего предка, а *L. biglobosa* – более древний вид [2, 3].

*L. maculans* (анаморфа *Phoma lingam* (Tode: Fr.) Desm.) является экономически значимым патогеном, так как вызывает рак стебля [4]. Возбудитель фомоза впервые описан Tode [5] в 1791 г. Патоген имеет широкий круг растений-хозяев в пределах семейства Brassicaceae, включая как дикорастущие, так и культивируемые виды, в том числе модельный для генетики вид *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Резуховидка Таля, Резушка Таля) [5] и важную сельскохозяйственную культуру – *Brassica napus* L. (рапс) [6, 7]. В 2001 г. слабовирулентные изоляты этого вида отнесены к виду *L. biglobosa* [8].

Считается, что распространенность *L. maculans* и *L. biglobosa* в разных странах мира обусловлена передачей с семенами *B. oleracea* L., *B. napus* L., *B. rapa* L. и других *Brassica* [7]. Ранее в Северной Америке и Восточной Европе встречался только *L. biglobosa*, но затем был выявлен и *L. maculans* [9]. До середины 1990-х годов заболеваемость фомозом в Польше, как правило, также была связана с *L. biglobosa* [10]. К 2002 г. в западной части Польши на рапсе широко распространился *L. maculans*, в то время как в восточной Польше был определен только *L. biglobosa* [11]. Проведенное недавно в Польше исследование *Leptosphaeria* spp. на листьях рапса показало рост численности изолятов *L. maculans* в сравнении с их встречаемостью, наблюдавшейся десятилетие назад [12]. Изменения относительной частоты этих двух патогенов выявлены также в Чехии и Венгрии [13]. Изучение распространения видов в Литве в 2006–2009 гг. показало варьирование их соотношения в зависимости от экологических условий, однако в целом было обнаружено 70,3 % изолятов *L. maculans* и 29,7 % *L. biglobosa* [14]. Эти результаты свидетельствуют о распространении *L. maculans* в Европе с запада на восток. В настоящее время *L. maculans* представляет угрозу для рапса в Азии [15]. *L. maculans* присутствует во многих странах мира (за исключением Китая), где широко выращиваются крестоцветные культуры [16]. В Китае на рапсе выявлен только *L. biglobosa* [17]. В Европе потери урожая не связывают с *L. biglobosa*, так как патоген, поражая листья и верхнюю часть стебля, обычно не приводит к гибели растений [9]. Тем не менее, в странах с высокой летней температурой, например в Польше, этот вид может вызывать значительные потери урожая рапса [18]. Считалось, что преваляирование *L. maculans* над *L. biglobosa* связано с низкой агрессивностью последнего, так как *L. biglobosa* развивается только на стареющих растениях в конце сезона и не приводит к существенным поражениям фомозом. Однако недавно установлено, что этот патоген может вызывать значительные поражения не только верхней части стебля, но и его основания, приводя к большим потерям урожая. В условиях высокой относительной влажности воздуха изоляты *L. biglobosa* становятся высокоагрессивными при поражении семядолей, поскольку в клеточных стенках растений накапливается меньше лигнина [19].

Оба патогена являются гембиотрофами и имеют сложный жизненный цикл. Гриб способен выживать на остатках стеблей и стерне как сапрофит в течение многих лет. Попадая на листья, он становится некротрофом, продуцирует пятна на листьях. Затем патоген как биотроф колонизирует межклеточные пространства, при этом эндофитная латентная стадия, где грибок живет в состоянии покоя, является бессимптомной. После колонизации межклеточных пространств *L. maculans* достигает сосудистой системы озимого рапса и распространяется вниз по ксилеме до основания стебля в течение 9 мес. (в Европе). В результате кора стебля разрушается и развивается рак стебля [20], т. е. в конце вегетации растений начинается вторая некротрофная стадия.

В генеративной стадии (телеоморфы *L. maculans*, *L. biglobosa*) гриб на одревесневших остатках корней или стеблей рапса половым путем формирует аски с аскоспорами, которые развиваются в псевдотециях. В вегетативной стадии (анаморфа *Ph. lingam*) гриб формирует почти поверхностные шаровидные черные пикниды с толстой склероциальной оболочкой, в которых образуются бесцветные пикнидиоспоры. При достаточном увлажнении из пикнид выделяется розово-пурпурная слизь, содержащая вегетативные споры. Возбудители фомоза перезимовывают в виде пикнид и псевдотеций на стерне [21], в виде мицелия в зараженных растениях озимого рапса и на пораженных остатках крестоцветных культур, в виде мицелия или пикнид на оболочке семян [22, 23]. Цикл развития болезни начинается с распространения по воздуху аскоспор, которые выделяются из псевдотеций (в Европе, например, как осенью, так и весной) и, прорастая, инокулируют растения через устьица или в местах ранения (первичная инфекция) [24]. Аскоспоры от первоначального источника инфекции могут переноситься на 1–2 км, максимум – на расстояние до 10 км [23, 25, 26]. Недавно сообщалось, что в Канаде потенциал распространения аскоспор патогена ветром – 17 км в год, а в Китае – 47 км в год на яровом рапсе и 70 км в год на озимом рапсе [27]. Вскоре после заражения листьев на них формируются пикниды с пикнидиоспорами, которые разносятся дождем на короткие дистанции в пределах 1 м и вызывают обычно менее тяжелую вторичную инфекцию. Однако отмечалось, что, например, в Западной Канаде первичную инфекцию могут вызывать и пикнидиоспоры (цит. по [28]). Вторичные циклы, продуцируемые на пораженных растениях пикнидиоспорами, не приводят к значительному снижению урожая, поэтому возбудитель фомоза считается моноциклическим патогеном [4, 22, 29].

Жизненный цикл гриба протекает в широком диапазоне температур. Для проявления поражений на листьях, инокулированных аскоспорами, требуется 5 сут при 20 °С и 2 недели при 8 °С [30], а время между проявлением поражений на листьях и их проявлением на стеблях составляет 77 сут при 18 °С и 175 сут при 3 °С [20]. При высоких температурах тяжесть симптомов на семядолях, листьях и стеблях усиливается, поэтому с потеплением климата угроза фомоза возрастает. Отмечалось, что несовместимые реакции (малые некротические поражения) на семядолях, инокулированных при 18 °С авирулентными изолятами, изменяются на полностью совместимые реакции при 27 °С [31], что свидетельствует о температурочувствительности генов устойчивости, поэтому, например, при 24 °С болезнь развивается быстрее, чем при 14 °С [4]. В Западной Канаде высокие летние температуры могут привести к серьезным эпидемиям фомоза. Созревание псевдотеций зависит от влажности и температуры (оптимум 14–15 °С) [32]. В Западной Канаде псевдотеции обычно образуются на стерне спустя 9–10 мес. после сбора урожая, поскольку температура ниже 0 °С зимой задерживает их созревание (цит. по [28]). В зависимости от условий окружающей среды период высвобождения аскоспор может длиться 3–4 мес. и более, а пик его наблюдается обычно через 1–2 мес. после его начала [33]. Для прорастания аскоспор после их освобождения требуется не менее 8 ч влажности при 4–28 °С (оптимум 15–20 °С и 48 ч влажности) [30]. Выживаемость *L. maculans* на стерне играет важную роль в эпидемии, так как аскоспоры и пикнидиоспоры с инфицированных остатков могут служить первичным инокулюмом для заражения рапса весной (цит. по [28]). На сохранение гриба на зараженных остатках влияют погодные условия и агротехника. Скорость деградации остатков зависит от влажности и температуры почвы, для выживания патогена благоприятны сухое лето и холодные зимы. В Западной Канаде, например, с зараженной фомозом стерни на поверхности почвы освобождение аскоспор происходит в течение 3–5 лет, потому что зимы очень холодные, а лето сухое и жаркое [34]. Выживаемость гриба на стерне рапса в течение 3–5 лет превышает длительность севооборота (в среднем 3 года). В Западной Австралии *L. maculans* может выживать в течение 4 лет, так как зараженные остатки рапса не разлагаются в условиях жаркого сухого лета [4]. В Великобритании, где климат мягкий и влажный, остатки рапса разлагаются в основном в течение 2 лет [35]. В связи с этим эффективными агроприемами контроля фомоза являются правильный севооборот и удаление стерни, так как это уменьшает количество инокулюма для перезимовки [36].

Симптомы развития болезни наблюдаются на гипокотиле и семядолях, листьях, стеблях, стручках и корнях [28, 33, 37]. При посеве зараженных семян на гипокотиле и семядолях моло-

дых растений появляются водянистые пятна различной формы, которые, подсыхая, становятся серого цвета с черными точками (пикнидами) на поверхности. В дальнейшем на стеблях у черешков нижних листьев появляются округлые или удлинённые, слегка вдавленные светло-коричневые или сероватые с пурпурной каймой пятна или язвы, покрытые черными пикнидами. Разрастаясь, пятна и язвы охватывают стебель вокруг. Эта форма проявления болезни называется раком стебля. При поражении основания стебля (корневой рак шейки, некроз шейки) *L. maculans* часто распространяется на корневую систему, вызывая сухую корневую гниль, что приводит к полеганию и гибели растений. Иногда фомоз наблюдается в виде некротических пятен серого цвета с темными пикнидами на междоузлиях. На листьях и стручках болезнь проявляется в виде серых сухих овальных пятен с концентрической зональностью и пикнидами. Пораженные стручки растрескиваются и имеют мелкие, морщинистые, щуплые семена. В Австралии выявлена хорошая корреляция между частотой поражения семядолей и последующим развитием рака стебля [38]. У озимого рапса наиболее пагубные поражения основания стебля, как правило, связаны с фомозной пятнистостью листьев, если она развилась до начала быстрого удлинения стебля.

Распространение фомоза рапса в мировом масштабе может вызывать серьезные потери урожая в Европе, Австралии и Северной Америке [4, 39]. Вредоносность фомоза проявляется в снижении всхожести инфицированных семян, отмирании молодых пораженных побегов осенью, выпадении больных растений во время перезимовки, гибели взрослых растений при поражении раком основания стебля, уменьшении ассимиляционной поверхности в результате преждевременного отмирания пораженных листьев, снижении кормовых качеств зеленой массы, существенном уменьшении массы 1000 семян, ухудшении технологических свойств семян.

Фомоз является весьма значимой проблемой в Англии, а во Франции, Германии и США (Северная Дакота), где недобор продукции рапса вследствие этой болезни составляет 5–20 % [15], 50 % [26] и 75–90 % [40] соответственно. В Австралии ежегодные потери урожая рапса от фомоза составляли в среднем от 15 до 48 % [41–43], причем наиболее значимыми они были при преодолении сортов с устойчивостью от *B. rapa* ssp. *sylvestris* Janch. [44]. В Беларуси в последние годы фомоз встречается повсеместно, особенно в западной части страны [45].

**Генетика авирулентности *Leptosphaeria maculans*.** *L. maculans* – гаплоидный гриб с небольшим размером генома в 45,12 Мб, кодирующим предположительно 10 000–13 000 генов в пределах 17–18 хромосом (некоторые хромосомы являются необязательными, т. е. В-типа), геном *L. biglobosa* меньше (30–40 Мб) [46]. Консорциум *Leptosphaeria* Геном был создан в 2004 г. Genoscope (CEA) (<http://www.genoscope.cns.fr>), а в 2011 г. было завершено секвенирование генома *L. maculans*. Последовательность генома выложена в открытом доступе (<http://urgi.versailles.inra.fr/index.php/urgi/Species/Leptosphaeria>) [46, 47].

Генетическое разнообразие популяции *L. maculans* обусловлено в основном половой рекомбинацией, мутационным процессом, большим размером популяции и высоким потоком генов вследствие крупномасштабного распространения аскоспор [5]. Секвенирование генома *L. maculans* показало наличие множества транспозонов (около 30 % генома) [46]. Предполагается, что эта выродившаяся, богатая ретротранспозонами часть генома вносит вклад в быструю эволюцию вирулентности у изолятов *L. maculans* через многие делеции целых генов, мутации и повторно индуцируемые точечные мутации (RIP, repeat-induced point mutation) в аллелях авирулентности (*AvrLm*) [48–50]. Вероятно, благодаря RIP-мутациям и локализации *Avr*-генов внутри повторяющихся регионов гриб адаптируется под давлением отбора генами устойчивости [51].

У *L. maculans* идентифицировано 14 генов авирулентности [52], причем 8 из них генетически кластеризуются в двух различных регионах. Первый кластер содержит *AvrLm1*, *AvrLm2*, *AvrLm6* [52, 53], второй – *AvrLm3*, *AvrLm4*, *AvrLm7*, *AvrLm9* и *AvrLepR1* [52, 54–56]. Эти кластеры могут представлять сотни килобаз из-за отсутствия мейотической рекомбинации в таких регионах [46]. К настоящему времени клонировано 7 генов авирулентности *L. maculans* – *AvrLm1* [57], *AvrLm2* [58], *AvrLm3* [52], *AvrLm4-7* [50], *AvrLm6* [53], *AvrLm11* [59], *AvrLmJ1* [60]. Все гены авирулентности, за исключением *AvrLm1*, локализованного в гетерохроматиновой области [57], коди-

руют малые, богатые цистеином, секретируемые белки и сильно экспрессируются на ранних стадиях патогенеза [52]. Ген *AvrLm4-7* кодирует белок из 143 аминокислотных остатков [50]. Мутация только одного основания, приводящая к замене глицина на аргинин, обуславливает потерю способности узнавать ген *Rlm4*, тогда как узнавание *Rlm7* сохраняется (*AvrLm7*-специфичность не изменяется) [50]. Точечная мутация является главным событием, приводящим к потере *Rlm4*-опосредованной устойчивости [50]. После клонирования *AvrLm7* установлено, что *AvrLm4* и *AvrLm7* – два различных аллеля одного гена (переименованы в *AvrLm4-7*) [52].

Исследование структуры популяции *L. maculans* по признаку авирулентности/вирулентности в Польше, Швеции, Германии, Англии [24] и Франции [61] показало высокую частоту генов вирулентности *avrLm2*, *avrLm3*, *avrLm9* и *avrLm5*. Гены *avrLm1*, *avrLm4* обнаружены у небольшого числа изолятов (менее чем у 10 %). В Англии в 2012–2013 гг. выявлены единичные изоляты с *avrLm7*, и все они имели *AvrLm4* [62]. В Канаде в 2012 г. обнаружено менее 5 % изолятов с генами *AvrLm1* и *AvrLm3* [63]. Однако, по данным Zhang с соавт. [64], в 2012 г. в Канаде (Манитоба) в популяции гриба с *AvrLm1* встречалось 22,0 % изолятов, с *AvrLm3* – 2,7, с *AvrLm9* – 3,3, с *AvrLepR2* – 10,7, с *AvrLepR1* – 39,1, с *AvrLm2* – 64,3, с *AvrLm11* – 65,3, с *AvrLm6* – 66,0 %. Высокой была доля изолятов с генами авирулентности *AvrLm4*, *AvrLm5* и *AvrLm7* – 77,1; 80,7 и 89,2 % соответственно. В Германии анализ популяций гриба в 2011–2014 гг. выявил высокую частоту генов вирулентности к генам устойчивости *Rlm1*, *Rlm2*, *Rlm3*, *Rlm4* и *Rlm9* (более 80 % изолятов) и низкую – к гену *Rlm7* (менее 5 %) [65].

**Генетика устойчивости рапса к фомозу.** У видов рода *Brassica*, включая рапс, выявлены два типа устойчивости к болезням: качественная (расоспецифическая, ювенильная, моно- и олигогенная) и количественная (нерасоспецифическая, возрастная, обычно полигенная) [66–75]. Ювенильная устойчивость, которая экспрессируется начиная со стадии проростков (семядолей) [69], зависит от наличия у генотипа растения *R*-гена устойчивости и от наличия у изолята патогена соответствующего *Avr*-гена. Это очень эффективная устойчивость, которая действует через активность *R*-гена – возбудитель попадает на семядоли или листья, в результате чего развивается реакция сверхчувствительности, препятствующая дальнейшему распространению инфекции *L. maculans* на все растение, хотя воздействие патогена может длиться в течение вегетационного сезона [6]. То есть эффективные главные гены расоспецифической устойчивости к *L. maculans* действуют, когда аскоспоры или пикнидиоспоры заражают семядоли или листья, предотвращая последующее распространение инфекции к стеблю [54, 70]. Напротив, полигенная устойчивость представляет собой частичную устойчивость, и обуславливающие ее малые гены сложно взаимодействуют между собой при формировании ответа растения на патоген. Каждый из этих генов обычно не проявляет большого фенотипического эффекта, поэтому отсутствует сильное давление отбора определенных патотипов гриба [37, 71]. Количественная устойчивость особенно важна для полевой защиты растений, так как наибольший вред урожаю и качеству продукции наносит поражение взрослых растений [37, 71]. Тип устойчивости можно определить только при наличии (или отсутствии) расоспецифических генов устойчивости в тестируемом генотипе *B. napus* и аллелей авирулентности у изолятов *L. maculans*, используемых для инокуляции в контролируемой среде или полевых экспериментах. Полевая (возрастная) устойчивость может быть обусловлена не только малыми генами, но и расоспецифическими главными генами. Она может контролироваться главным геном, к которому полевая популяция *L. maculans* несет авирулентные изоляты, или многими генами с небольшими эффектами [69]. Обычно нет различий в симптомах развития фомозной пятнистости на листьях молодых растений сортов как с полигенной устойчивостью к *L. maculans*, так и без нее, но в конце сезона у сортов с количественной устойчивостью язвы на стеблях не развиваются или являются менее серьезными, чем у сортов без этой устойчивости [69].

Все выявленные к настоящему времени главные гены расоспецифической устойчивости к фомозу обнаружены в А-геноме *B. napus* и ни один не найден в С-геноме [72, 73]. К настоящему времени у *B. napus* идентифицировано и генетически картировано несколько таких генов (см. таблицу).

Главные гены устойчывості *Brassica napus* L. к *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.Major genes *Brassica napus* L. resistance to *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.

Ген устойчивости	Источник гена	Локализация в хромосоме <i>B. napus</i>	Ссылки
<i>Rlm1</i>	<i>B. napus</i> (ААСС, 2n = 38)*	A7	[54, 57, 67, 73–77]
<i>Rlm2</i>	<i>B. napus</i> *	A10	[54, 67, 73, 74, 78–80]
<i>Rlm3</i>	<i>B. napus</i>	A7	[54, 73, 74]
<i>Rlm4 = LEM1</i>	<i>B. napus</i> *	A7	[50, 73–75, 81, 82]
<i>Rlm5</i>	<i>B. juncea</i> (L.) Czern. (ААВВ, 2n = 36) сарептская (индийская, коричневая) горчица	A8	[54]
<i>Rlm6 = Jlm1</i>	<i>B. juncea</i>	A8	[53, 54, 75, 83, 84]
<i>Rlm7</i>	<i>B. napus</i> *	A7	[50, 54, 73, 74, 82]
<i>Rlm8</i>	<i>B. rapa</i> L. (АА, 2n = 20) сурепица	–	[54]
<i>Rlm9</i>	<i>B. napus</i>	A7	[54, 73, 74, 82]
<i>Rlm10</i>	<i>B. nigra</i> (L.) W. D. J. Koch (ВВ, 2n = 16) черная (французская или настоящая) горчица	A7	[85]
<i>Rlm11</i>	<i>B. rapa</i>	Диспенсома	[59]
<i>LepR1</i>	<i>B. rapa</i> ssp. <i>sylvestris</i> Janch.	A2	[86, 87]
<i>LepR2</i>	<i>B. rapa</i> ssp. <i>sylvestris</i>	A10	[86]
<i>LepR3</i>	<i>B. rapa</i> ssp. <i>sylvestris</i>	A10	[79, 80, 88]
<i>LepR4</i>	<i>B. rapa</i> ssp. <i>sylvestris</i>	A6	[89]
<i>rjlm2</i>	<i>B. juncea</i>	–	[90, 91]
<i>LmFr1</i>	<i>B. napus</i>	A7	[86, 92]
<i>cRlmj</i>	<i>B. napus</i>	A7	[88]
<i>aRlmj</i>	<i>B. napus</i>	A7	[93]

Примечание. \* – ген присутствует и у *B. rapa* [73], «–» – не определено.

Являются ли гены *Rlm1*, *Rlm3*, *Rlm4*, *Rlm7*, *Rlm9* кластером тесно сцепленных факторов, пока не ясно [74]. Считается, что *Rlm1* отличается от *Rlm3*, так как, присутствуя в одном сорте, они генетически картированы в разных позициях. Гены *Rlm1* и *Rlm4* сцеплены между собой, не аллельны и могут присутствовать в одном сорте, так же как гены *Rlm1* и *Rlm3*. В то же время гены *Rlm3* и *Rlm4*, встречающиеся во многих сортах рапса, редко присутствуют вместе в одном генотипе и, возможно, являются аллельными формами одного гена [69]. Не обнаружено и сортов, которые одновременно содержат гены *Rlm7* и *Rlm9*. Также не выяснено, являются ли *Rlm4* и *Rlm7* разными генами или аллельными формами одного и того же гена устойчивости. Гены *LEM1*, *LmR1*, *cRlmm* и *cRlmrb*, присутствующие в различных сортах *B. napus*, картированы в хромосоме А7 [88, 94]. Установлено, что ген *LEM1* ювенильной устойчивости к изоляту с *Avr1-2-4-7* [95] локализован в районе обширной тандемной дупликации [94]. Гены *LEM1*, *LmR1*, *cRlmm* и *cRlmrb* могут быть идентичны гену *Rlm4* [96]. Ген *Rlm4* несут французские сорта Major, Jet Neuf и австралийские сорта Maluka, Dunkeld, Skipton [82, 96].

В А-геноме *B. rapa* обнаружены расоспецифические гены *Rlm8*, *Rlm11*, *LepR1–LepR4* (см. таблицу). Ген *LepR3*, который интрогрессирован в рапс от *B. rapa* ssp. *sylvestris*, – первый клонированный ген устойчивости рапса к фомозу [79]. Он принадлежит к семейству рецептор-подобных белков. Рецессивный ген устойчивости *LepR4*, который обуславливает широкий спектр устойчивости и картирован в хромосоме А6, представлен двумя разными аллелями – *LepR4a* и *LepR4b* [89]. Кроме того, *B. rapa* может содержать гены, ранее идентифицированные у *B. napus*, – *Rlm1*, *Rlm2*, *Rlm4*, *Rlm7* [73], которые расположены у *B. rapa* и *B. napus* в той же позиции [69]. Так, например, с помощью тонкого картирования установлено совпадение локализации генов *LepR3* и *Rlm2* [80].

У вида *B. nigra* с В-геномом идентифицированы два гена устойчивости – *Rlm1* и *Rlm10* [85, 97]. Интрогрессированный в рапс ген *Rlm10* локализован у *B. napus* в хромосоме А7 [83, 98]. Растения рапса с *Rlm1* имеют лучшую устойчивость к *L. maculans* в фазу семядолей и на взрослой стадии развития, когда ген сверхэкспрессируется у *B. napus* [97]. Важно отметить, что ген *Rlm1*

принадлежит к семейству серин/треонин киназ [39]. Указывалось, что он контролирует большую долю возрастной устойчивости (около 70 % фенотипической вариации) [74]. Отмечалось, что возрастная устойчивость сорта Махол объясняется главным образом присутствием гена *Rlm1*, который эффективен, когда в популяции преобладают изоляты гриба с *AvrLm1* [78, 99]. С возрастной устойчивостью рапса к фомозу ассоциирован и ген устойчивости *Rlm2*, либо как обладающий остаточным эффектом на возрастную устойчивость, либо как сцепленный с другими генами, находящимися в этом QTL и обуславливающими долю вариации возрастной устойчивости [100].

Устойчивость к *L. maculans* амфилоидного вида *B. juncea* опосредована двумя генами, которые названы *Rlm5* и *Rlm6* [54, 70, 73] (см. таблицу). Кроме того, у гибридов *B. napus* идентифицирован рецессивный ген *rjlm2*, происходящий от *B. juncea*, который очень эффективен к широкому спектру изолятов *L. maculans* на стадии семядолей [90]. На основании аналогов генов устойчивости (RGA, resistance gene analogues) разработан SCAR-маркер, тесно сцепленный с локусом устойчивости *rjlm2* у *B. napus*, *B. rapa* и *B. oleracea*. Анализ последовательности этого гена показал существенную гомологию двух предполагаемых R-генов в кластере генов устойчивости в хромосоме 5 *Arabidopsis thaliana* [91]. Интрогрессия генов устойчивости *Rlm6* [83, 84] и *rjlm2* [90] в *B. napus* обусловила его эффективную устойчивость к изолятам *L. maculans* на стадии проростков.

При наличии главных генов устойчивости у генотипов растений и комплементарных им генов авирулентности у изолятов гриба наблюдается типичное «ген на ген» взаимодействие *Brassica* с *L. maculans*, впервые установленное при исследовании фитопатосистемы лен – ржавчина льна [101]. В соответствии с ним осуществляется прямое или опосредованное узнавание белком, который кодирует ген устойчивости растения, эффектора, контролируемого определенным геном авирулентности патогена [54, 67, 81]. Когда R-гену соответствует комплементарный *Avr*-ген, растение является устойчивым (расоспецифическая устойчивость) [102, 103]. Такая устойчивость впервые описана при взаимодействии гена устойчивости *Rlm1* у сорта рапса Quinta и соответствующего гена авирулентности *AvrLm1* у изолята патогена [67], позднее – при взаимодействии генов *Rlm1* и *LepR3* с геном *AvrLm1* [76, 79], а также *Rlm2* с *AvrLm2* [80]. Оказалось также, что если изолят обладает обоими генами *AvrLm3* и *AvrLm4-7*, то *Rlm3*-опосредованная устойчивость рапса не проявляется в связи с наличием *AvrLm4-7*, который маскирует узнавание эффектора *AvrLm3* геном устойчивости *Rlm3*, но вирулентность изолята к *Rlm7* восстанавливает фенотип *AvrLm3*. Таким образом, наличие гена *AvrLm4-7* не подавляет экспрессию *AvrLm3*, а супрессирует *Rlm3*-опосредованное узнавание [52].

Часть исследований посвящено генетике количественной устойчивости рапса к фомозу, которая обычно наследуется полигенно и может сдерживать продвижение гриба с листовой пластинки в черешок и ткани стебля [70, 74]. Поэтому у сортов с такой устойчивостью поражение раком основания стебля на стадии взрослого растения слабее, чем у восприимчивых сортов. Количественная устойчивость сортов, которая может быть эффективна в борьбе с *L. maculans* [100, 104], варьируется в зависимости от метеорологических условий. У некоторых озимых европейских сортов наблюдается высокий уровень полевой устойчивости к *L. maculans* [69]. Однако когда концентрация инокулюма этого патогена высока, количественная устойчивость не предотвращает больших потерь урожая [105, 106], так как гриб может выживать и размножаться даже на самых устойчивых линиях *B. napus* [107].

Ferreira с соавт. [95] определили QTL вблизи гена *Rlm1*, который ассоциирован с ювенильной устойчивостью и уменьшенным поражением стеблей в теплице, и два QTLs, обуславливающих полевую устойчивость к *L. maculans*. Pilet с соавт. [108] идентифицировано 10 QTLs, из которых в ходе двухлетних исследований выявлено 4 QTLs, ассоциированных с уменьшенной пораженностью фомозом и гибелью растений. В другом скрещивании при использовании удвоенных гаплоидных линий картировано 6 QTLs и 4 QTLs при анализе семей F2:3 [100]. Так как из 16 QTLs, обнаруженных в ходе этих исследований [100, 108], только 4 были общими, авторы сделали вывод о значительном влиянии на проявление QTLs с малыми эффектами генетического фона и давления отбора патогеном в каждой местности. У сорта Crésor выявлен QTL, который, вероятно, является геном ювенильной устойчивости *LmFr1* и обуславливает 57–84 % вариации полевой устойчивости

в зависимости от года и местности [92]. Как отмечалось ранее, 70 % фенотипической вариации полевой устойчивости сорта Махол объясняется наличием гена *Rlm1* [74]. Влияние гена расо-специфической устойчивости на полевую устойчивость зависит от частоты соответствующего аллеля авирулентности в структуре популяции *L. maculans*, однако не определен порог частоты аллеля вирулентности, при котором соответствующий ген устойчивости более не эффективен для защиты урожая [109].

С использованием подхода полногеномного картирования недавно изучена количественная устойчивость популяции удвоенных гаплоидных линий от скрещивания австралийских сортов масличного рапса Skipton и Ag-Spectrum [82]. Так, в условиях теплицы выявлено 2 QTLs (в хромосомах A1 и A10), ассоциированных с устойчивостью растений на стадии семядолей при инокуляции одним изолятом и обуславливающих 19,5–22,8 % фенотипической вариации развития болезни, а также QTL (в хромосоме A1) возрастной устойчивости (24,6 % вариации). В этих же условиях при инокуляции вторым изолятом гриба определены локусы устойчивости на стадии семядолей (= *Rlm4*) и взрослых растений в том же маркерном интервале в хромосоме A7, которые обуславливали 88,9 и 67,8 % фенотипической вариации развития болезни соответственно [82]. В 2008 г. при исследовании в полевых условиях этой же картирующей популяции определено 7 QTLs возрастной устойчивости (локализованы в хромосомах A2, A9, A10, C1, C2, C3, C6), обуславливающих от 5 до 24,5 % вариации. Как оказалось, ген *Rlm4* не проявлял никакого достоверного эффекта на полевую устойчивость, что могло быть связано с присутствием в питомнике изолятов гриба, вирулентных к данному гену. Это согласуется с результатами других исследователей [110], которые показали, что взрослые растения сортов, имеющих ген *Rlm4*, характеризуются плохой выживаемостью. В 2009 г. выявлен только один QTL в хромосоме A1, ассоциированный с полевой устойчивостью и обуславливающий 26,1 % вариации развития болезни [82]. Кроме того, идентифицировано 5 QTLs, ассоциированных с процентом выживших растений, которые определяли совместно 52,2 % генетической вариации [82]. В ходе полевых экспериментов в 5 различных условиях среды (1995, 1996 и 2007 гг. во Франции и 2008, 2009 гг. в Англии) выявлено 17 QTLs возрастной устойчивости, совместно обуславливающих 51 % фенотипической вариации болезни, 6 из которых оказались стабильными, так как проявлялись не менее чем в двух условиях среды [111]. С помощью ассоциативного картирования при генотипировании коллекции *Brassica* (181 образец *B. napus*, 1 – *B. rapa*, 3 – *B. juncea*, 2 – *B. carinata*) с использованием 1513 маркеров (DArT и SSR) установлен ряд локусов ювенильной и возрастной устойчивости, локализованных в хромосомах A1, A2, A3, A5, A6, A7, A10, C1, C2 [112]. Ассоциативное картирование 128 линий масличного рапса с помощью 67 SSR, 4 SCAR и одного аллель-специфического маркера показало наличие 61 маркерного аллеля, связанного с устойчивостью к фомозу [113]. Некоторые из этих маркеров связаны с QTLs устойчивости в предыдущих исследованиях, что подтвердило их полезность для MAS; другие маркеры ассоциированы, как предполагается, с QTLs новых генов устойчивости [113]. Использование в ассоциативном картировании элитного материала дает преимущество, поскольку полученные результаты могут быть применены в будущих селекционных программах. Таким образом, для выявления маркеров, ассоциированных с генами устойчивости, современным подходом является широкогеномное ассоциативное картирование (GWAS, genome wide-association mapping), которое позволяет выявлять маркеры к известным и новым локусам устойчивости в коллекции родительских форм и перспективного селекционного материала для последующего применения в маркер-опосредованной селекции в определенной зоне.

О генетике устойчивости рапса к *L. biglobosa* известно мало [15]. Тем не менее некоторые результаты указывают на то, что гены устойчивости к *L. maculans* (например, гены *Rlm1* и *Rlm6*) не эффективны против *L. biglobosa* [114, 115]. Поскольку *L. biglobosa* сильнее колонизирует устойчивые к *L. maculans* сорта и может вызывать существенные потери урожая, необходимо изучение генетической природы устойчивости рапса и к *L. biglobosa*.

**Заключение.** Широко распространенный во всем мире фомоз является экономически значимой болезнью озимого и ярового рапса и других *Brassica*. В Беларуси эпифитотии фомоза на рапсе отмечаются регулярно, наблюдались они также в Европе, Канаде и Австралии [18].

Фомоз рапса вызывают два вида грибных патогенов – *Leptosphaeria maculans* и *L. biglobosa* [2, 4, 9, 35]. В большинстве регионов, производящих рапс, эти виды встречаются совместно, при этом в Китае распространен менее агрессивный вид – *L. biglobosa* [9, 15, 17, 27]. Оба патогена поражают все органы растений и имеют сходные жизненные циклы. Основным источником первичной инфекции для всходов рапса являются аскоспоры и пикнидиоспоры, которые формируются в псевдотециях и пикнидах соответственно.

Геном *L. maculans* секвенирован [46, 47]. У этого гриба идентифицировано 14 генов авирулентности [52], из которых 7 клонированы [50, 52, 53, 57–60]. Они кодируют, за исключением *AvrLm1*, локализованного в гетерохроматиновой области [57], малые, богатые цистеином, секретруемые белки и сильно экспрессируются на ранних стадиях патогенеза [52]. Периодический мониторинг популяций *L. maculans* в разных странах выявлял различную частоту встречаемости генов вирулентности к известным генам устойчивости и ее изменчивость в зависимости от наличия *R*-генов в выращиваемых сортах рапса [24, 44, 61–64, 78, 116].

Геном *B. napus* также секвенирован (<http://www.genoscope.cns.fr/brassicanapus/>) [117]. Все известные главные гены устойчивости рапса к *L. maculans* локализованы в А-геноме. Некоторые гены интрогрессированы в геном рапса из других видов (*B. rapa*, *B. juncea*, *B. nigra*). Показано, что в фитопатосистеме *Brassica* – *L. maculans* гены авирулентности патогена взаимодействуют с комплементарными генами устойчивости растения по типу «ген на ген» [67, 76, 79, 80]. Отдельные главные гены вносят вклад в полевую устойчивость. Так, *Rlm1* может контролировать большую долю возрастной устойчивости (около 70 % фенотипической вариации), если в популяции патогена низка частота встречаемости вирулентных к этому гену изолятов [74, 78, 99]. Ген *Rlm2* вносит вклад в возрастную устойчивость либо за счет остаточного эффекта, либо из-за сцепления с другими генами, локализованными в этом же районе [100]. Кроме главных генов ювенильной устойчивости выявлены малые гены количественной (частичной, полевой) устойчивости рапса к фомозу, а с помощью ассоциативного картирования локусы устойчивости определены не только в А-, но и С-геноме рапса [82, 100, 108, 110–112]. Генетика устойчивости рапса к *L. biglobosa* практически не изучена [15, 114, 115].

### Список использованных источников

1. Plant breeding: assessment of genetic diversity in crop plants and its exploitation in breeding / W. Friedt [et al.] // Progress in Botany. – 2007. – Vol. 168. – P. 151–178.
2. Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans* – *L. biglobosa* species complex / E. Mendes-Pereira [et al.] // Mycol. Res. – 2003. – Vol. 107. – P. 1287–1304.
3. Gudelj, I. Evolution of sibling fungal pathogens in relation to host specialization / I. Gudelj, B. D. L. Fitt, F. van den Bosch // Phytopathology. – 2004. – Vol. 94. – P. 789–795.
4. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe / J. S. West [et al.] // Plant Pathol. – 2001. – Vol. 50. – P. 10–27.
5. Rouxel, T. The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era / T. Rouxel, M. H. Balesdent // Mol. Plant Pathol. – 2005. – Vol. 6. – P. 225–241.
6. Johnson, R. D. Variation in host range, systemic infection and epidemiology of *Leptosphaeria maculans* / R. D. Johnson, B. G. Lewis // Plant Pathol. – 1994. – Vol. 43. – P. 269–277.
7. Williams, R. H. Differentiating A and B groups of *Leptosphaeria maculans*, causal agent of stem canker (blackleg) of oilseed rape / R. H. Williams, B. D. L. Fitt // Plant Pathol. – 1999. – Vol. 48. – P. 161–175.
8. Shoemaker, R. A. The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans* / R. A. Shoemaker, H. Brun // Can. J. Bot. – 2001. – Vol. 79. – P. 412–419.
9. Colonisation of winter oilseed rape tissues by A/Tox<sup>+</sup> and B/Tox<sup>0</sup> *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in France and England / J. S. West [et al.] // Plant Pathol. – 2002a. – Vol. 51. – P. 311–321.
10. Jędrzycka, M. Properties of *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. isolates from Poland I. Pathogenicity characterisation / M. Jędrzycka, E. Lewartowska, I. Frencel // Phytopathologia Polonica. – 1994. – Vol. 7. – P. 71–79.
11. Changes in population structure of *Leptosphaeria maculans* in Poland / Z. Karolewski [et al.] // Phytopathologia Polonica. – 2002. – Vol. 25. – P. 27–34.
12. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a speedy molecular tool to study *Leptosphaeria* spp. populations in air and plant samples / M. Jędrzycka [et al.] // Healthy plant – healthy people: 11<sup>th</sup> conf. of the European foundation for plant pathology, Kraków, 8–13 September 2014. – Kraków, 2014. – P. 137.
13. Population structure and pathogenicity grouping of *L. maculans* isolates from Hungary / S. Z. Szlávik [et al.] // Blackleg News. – 2003. – P. 3–4.

14. Diversity of *Leptosphaeria maculans*/L. *biglobosa* species complex and epidemiology of phoma stem canker on oilseed rape in Lithuania / I. Brazauskienė [et al.] // J. of Plant Pathol. – 2011. – Vol. 93, N 3. – P. 577–585.
15. World-wide importance of Phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*) / B. D. L. Fitt [et al.] // Eur. J. Plant Pathol. – 2006. – Vol. 114, N 1. – P. 3–15.
16. Fernando, W. G. D. Detection of *Leptosphaeria maculans* and *Leptosphaeria biglobosa* causing blackleg disease in canola from canadian canola seed lots and dockage / W. G. D. Fernando, X. Zhang, C. C. Amarasinghe // Plants. – 2016. – Vol. 5, N 1. – P. 1–11.
17. Genetic diversity and differentiation of *Leptosphaeria biglobosa* on oilseed rape in China / L. Hao [et al.] // Phytoparasitica. – 2015. – Vol. 43, issue 2. – P. 253–263.
18. Patterns of ascospore release in relation to phoma stem canker epidemiology in England (*Leptosphaeria maculans*) and Poland (*L. biglobosa*) / Y. J. Huang [et al.] // Eur. J. Plant Pathol. – 2005. – Vol. 111. – P. 263–277.
19. Hadrami, El A. Variations in relative humidity modulate *Leptosphaeria* spp. pathogenicity and interfere with canola mechanisms of defence / A. El Hadrami, W. G. D. Fernando, F. Daayf // Eur. J. Plant Pathol. – 2010. – Vol. 126. – P. 187–202.
20. Hammond, K. E. A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans* / K. E. Hammond, B. G. Lewis, T. M. Musa // Plant Pathol. – 1985. – Vol. 34, N 4. – P. 557–565.
21. Williams, P. H. Biology of *Leptosphaeria maculans* / P. H. Williams // Can. J. Plant Pathol. – 1992. – Vol. 14. – P. 30–35.
22. Hall, R. Epidemiology of blackleg of oilseed rape / R. Hall // Can. J. Plant Pathol. – 1992. – Vol. 14. – P. 46–55.
23. Keri, M. Genetic studies of host-pathogen interaction between *Brassica napus* and *Leptosphaeria maculans*: Ph. D. Thesis ... of Doctor of Philosophy / M. Keri; University of Manitoba. – Winnipeg, 1999. – 207 p.
24. Frequency of avirulence alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe / A. Stachowiak [et al.] // Eur. J. Plant Pathol. – 2006. – Vol. 114. – P. 67–75.
25. Gladders, P. Observations on the epidemiology of *Leptosphaeria maculans* stem canker in winter oilseed rape / P. Gladders, T. M. Musa // Plant Pathol. – 1980. – Vol. 29. – P. 28–37.
26. Gugel, R. K. History, occurrence, impact, and control of blackleg of rapeseed / R. K. Gugel, G. A. Petrie // Can. J. Plant Pathol. – 1992. – Vol. 14. – P. 36–45.
27. Potential spread of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape crops in China / X. Zhang [et al.] // Healthy plant – healthy people: 11<sup>th</sup> conf. of the European foundation for plant pathology, Kraków, 8–13 September 2014. – Kraków, 2014. – P. 135.
28. Fernando, W. G. D. Breeding for blackleg resistance: the biology and epidemiology / W. G. D. Fernando, Y. Chen, K. Ghanbarinia // Adv. Bot. Res. – 2007. – Vol. 45. – P. 271–311.
29. Two weather-based models for predicting the onset of seasonal release of ascospores of *Leptosphaeria maculans* or *L. biglobosa* / M. U. Salam [et al.] // Plant Pathol. – 2007. – Vol. 56. – P. 412–423.
30. Effects of temperature and wetness duration on infection of oilseed rape leaves by ascospores of *Leptosphaeria maculans* (stem canker) / J. E. Biddulph [et al.] // Eur. J. Plant Pathol. – 1999. – Vol. 105. – P. 769–781.
31. Badawy, H. M. A. Temperature and aging of host tissue affect the interactions between different oilseed rape cultivars and pathotype groups of *Leptosphaeria maculans* / H. M. A. Badawy, J. Kakau, H. H. Hoppe // J. Phytopathol. – 1992. – Vol. 134. – P. 255–263.
32. Petrie, G. A. Effects of temperature and moisture on the number, size and septation of ascospores produced by *Leptosphaeria maculans* (blackleg) on rapeseed stubble / G. A. Petrie // Canad. Plant Dis. Survey. – 1994. – Vol. 74. – P. 141–151.
33. Guo, X. W. Seasonal and diurnal patterns of spore dispersal by *Leptosphaeria maculans* from canola stubble in relation to environmental conditions / X. W. Guo, W. G. D. Fernando // Plant Disease. – 2005. – Vol. 89. – P. 97–104.
34. Petrie, G. A. Long-term survival and sporulation of *Leptosphaeria maculans* (blackleg) on naturally-infected rapeseed/canola stubble in Saskatchewan / G. A. Petrie // Canad. Plant Dis. Survey. – 1995. – Vol. 75. – P. 23–34.
35. Epidemiology of *Leptosphaeria maculans* in relation to forecasting stem canker severity on winter oilseed rape in the UK / J. S. West [et al.] // Ann. Appl. Biol. – 1999. – Vol. 135. – P. 535–546.
36. Effect of rotation of canola (*Brassica napus*) cultivars with different compliments of blackleg resistance genes on disease severity / S. J. Marcroft [et al.] // Plant Pathol. – 2012. – Vol. 61. – P. 934–944.
37. Expression of resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus* double haploid lines in France and Australia is influenced by location / R. Delourme [et al.] // Ann. Appl. Biol. – 2008. – Vol. 153. – P. 259–269.
38. Li, H. Hazard from reliance on cruciferous hosts as source of major gene-based resistance for managing blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease / H. Li, M. J. Barbetti, K. Sivasithamparam // Field Crops Res. – 2005. – Vol. 91. – P. 185–198.
39. Howlett, B. J. Current knowledge of the interaction between *Brassica napus* and *Leptosphaeria maculans* / B. J. Howlett // Can. J. Plant Pathol. – 2004. – Vol. 26. – P. 245–252.
40. Lamey, H. A. Blackleg canola (*Brassica napus*) caused by *Leptosphaeria maculans* in North Dakota / H. A. Lamey, D. E. Hershman // Plant Dis. – 1993. – Vol. 77. – P. 1263.
41. Assessment of genetic diversity in Australian canola (*Brassica napus* L.) cultivars using SSR markers / J. Wang [et al.] // Crop Pasture Sci. – 2009. – Vol. 60. – P. 1193–1201.
42. Genetic map construction and QTL mapping of resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in Australian canola (*Brassica napus* L.) cultivars / S. Kaur [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2009. – Vol. 120, N 1. – P. 71–83.
43. Identification and characterization of candidate *Rlm4* blackleg resistance genes in *Brassica napus* using next generation sequencing / R. Tollenaere [et al.] // Plant Biotechnol. J. – 2012. – Vol. 10, N 6. – P. 709–715.
44. Major gene resistance to blackleg in *Brassica napus* overcome within three years of commercial production in south-eastern Australia / S. J. Sprague [et al.] // Plant Pathol. – 2006. – Vol. 59. – P. 190–198.

45. Таргонский, С. Тилмор: ваш ключ к выращиванию рапса [Электронный ресурс] / С. Таргонский // Портал «СБ». – Режим доступа: <http://tv.sb.by/kolonka-eksperta/article/tilmor-vash-klyuch-k-vyrashchivaniyu-rapsa.html>. – Дата доступа: 30.08.2016.
46. Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by repeat-induced Point mutations / T. Rouxel [et al.] // Nature Communications. – 2011. – Vol. 2, N 202. – P. 1–10.
47. Genomic advances will herald new insights into the *Brassica*: *Leptosphaeria maculans* pathosystem / A. Hayward [et al.] // Plant Biology. – 2012. – Vol. 14, suppl. 1. – P. 1–10.
48. Genome structure impacts molecular evolution at the *AvrLm1* avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans* / L. Gout [et al.] // Environ. Microbiol. – 2007. – Vol. 9. – P. 2978–2992.
49. Repeat-induced point mutation (RIP) as an alternative mechanism of evolution toward virulence in *Leptosphaeria maculans* / I. Fudal [et al.] // MPMI. – 2009. – Vol. 22. – P. 932–941.
50. *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm4-7* confers a dual recognition specificity by the *Rlm4* and *Rlm7* resistance genes of oilseed rape, and circumvents *Rlm4*-mediated recognition through a single amino acid change / F. Parlange [et al.] // Mol. Microbiol. – 2009. – Vol. 71. – P. 851–863.
51. Farman, M. L. Telomeres in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*: the world of the end as we know it / M. L. Farman // FEMS Microb. Lett. – 2007. – Vol. 273. – P. 125–132.
52. A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans* / C. Plissonneau [et al.] // New Phytologist. – 2016. – Vol. 209. – P. 1613–1624.
53. Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: map-based cloning of *AvrLm6* / I. Fudal [et al.] // MPMI. – 2007. – Vol. 20. – P. 459–470.
54. New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* / M. H. Balesdent [et al.] // Phytopathology. – 2002. – Vol. 92. – P. 1122–1133.
55. Analysis of *Leptosphaeria maculans* race structure in a worldwide collection of isolates / M. H. Balesdent [et al.] // Phytopathology. – 2005. – Vol. 95. – P. 1061–1071.
56. Genetic mapping of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene corresponding to the *LepRI* resistance gene of *Brassica napus* / K. Ghanbarnia [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2012. – Vol. 124. – P. 505–513.
57. Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans* / L. Gout [et al.] // Mol. Microbiol. – 2006. – Vol. 60. – P. 67–80.
58. Rapid identification of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm2* using an intraspecific comparative genomics approach / K. Ghanbarnia [et al.] // Mol. Plant Pathol. – 2015. – Vol. 16, N 7. – P. 699–709.
59. The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa* / M. H. Balesdent [et al.] // New Phytologist. – 2013. – Vol. 198. – P. 887–898.
60. An avirulence gene, *AvrLmJ1*, from the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, confers avirulence to *Brassica juncea* cultivars / A. P. van de Wouw [et al.] // Mol. Plant Pathol. – 2014 a. – Vol. 15. – P. 523–530.
61. A large-scale survey of races of *Leptosphaeria maculans* occurring on oilseed rape in France / M. H. Balesdent [et al.] // Eur. J. Plant Pathol. – 2006. – Vol. 114. – P. 53–65.
62. Mitrousia, G. K. Phoma stem canker on oilseed rape cultivars with the resistance gene *Rlm7* in the UK / G. K. Mitrousia, Y.-J. Huang, B. D. L. Fitt // Healthy plant – healthy people: 11<sup>th</sup> conf. of the European foundation for plant pathology, Kraków, 8–13 September 2014. – Kraków, 2014. – P. 128.
63. Managing blackleg of canola in western Canada – “new” strategies against an old disease / G. Peng [et al.] // Healthy plant – healthy people: 11<sup>th</sup> conf. of the European foundation for plant pathology, Kraków, 8–13 September 2014. – Kraków, 2014. – P. 132.
64. Breakdown of *Rlm3* resistance in the *Brassica napus*–*Leptosphaeria maculans* pathosystem in western Canada / X. Zhang [et al.] // Eur. J. Plant Pathol. – 2015. – Vol. 145, N 3. – P. 1–16.
65. *Leptosphaeria maculans* in winter oilseed rape: distribution of different races in Germany and efficacy of monogenic resistance genes / M. Winter [et al.] // Healthy plant – healthy people: 11<sup>th</sup> conf. of the European foundation for plant pathology, Kraków, 8–13 September 2014. – Kraków, 2014. – P. 133.
66. Ferreira, M. E. Mapping of a locus controlling resistance to *Albugo candida* in *Brassica napus* using molecular markers / M. E. Ferreira, P. H. Williams, T. C. Osborn // Phytopathology. – 1995. – Vol. 85. – P. 218–220.
67. Genes for race-specific resistance against blackleg disease in *Brassica napus* L. / D. Ansan-Melayah [et al.] // Plant Breeding. – 1998. – Vol. 117. – P. 373–378.
68. Identification of QTL involved in field resistance to light leaf spot (*Pyrenopeziza brassicae*) and blackleg resistance (*Leptosphaeria maculans*) in winter rapeseed (*Brassica napus* L.) / M. L. Pilet [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 1998. – Vol. 97. – P. 398–406.
69. Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*) / R. Delourme [et al.] // Eur. J. Plant Pathol. – 2006. – Vol. 114. – P. 41–52.
70. Rimmer, S. R. Resistance of oilseed *Brassica* spp. to blackleg caused by *Leptosphaeria maculans* / S. R. Rimmer, C. G. J., van den Berg // Can. J. Plant Pathol. – 1992. – Vol. 14. – P. 56–66.
71. Zhu, J. S. Studies on resistance to *Phoma lingam* in *Brassica napus* – *Brassica nigra* addition lines / J. S. Zhu, D. Struss, G. Robbelen // Plant Breeding. – 1993. – Vol. 111. – P. 192–197.
72. RAPD markers associated with resistance to blackleg disease in *Brassica* species / A. O. Ananga [et al.] // Afr. J. Biotechnol. – 2006. – Vol. 5. – P. 2041–2048.
73. Detection, introgression and localization of genes conferring specific resistance to *Leptosphaeria maculans* from *Brassica rapa* into *B. napus* / M. Leflon [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2007. – Vol. 115. – P. 897–906.

74. A cluster of major specific resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus* / R. Delourme [et al.] // *Phytopathology*. – 2004. – Vol. 94. – P. 578–583.
75. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus* / H. Brun [et al.] // *New Phytologist*. – 2010. – Vol. 185. – P. 285–299.
76. Molecular mapping and validation of *Rlm1* gene for resistance to *Leptosphaeria maculans* in canola (*Brassica napus* L.) / R. Raman [et al.] // *Crop Pasture Sci.* – 2012. – Vol. 63. – P. 1007–1017.
77. Wang, Z. Development of high-throughput molecular markers for blackleg (*Leptosphaeria maculans*) resistance genes in *Brassica napus* for gene stacking / Z. Wang // *Universal J. of Plant Sci.* – 2013. – Vol. 1. – P. 118–124.
78. A ten-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape / T. Rouxel [et al.] // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2003. – Vol. 109. – P. 871–881.
79. The *Brassica napus* blackleg resistance gene *LepR3* encodes a receptor-like protein triggered by the *Leptosphaeria maculans* effector AVRML1 / N. J. Larkan [et al.] // *New Phytologist*. – 2013. – Vol. 197. – P. 595–605.
80. Co-localisation of the blackleg resistance genes *Rlm2* and *LepR3* on *Brassica napus* chromosome A10 / N. J. Larkan [et al.] // *BMC Plant Biol.* – 2014. – Vol. 14, N 387. – P. 1–9.
81. Genetic control and host range of avirulence toward *Brassica napus* cultivars Quinta and Jet Neuf in *Leptosphaeria maculans* / M. H. Balesdent [et al.] // *Phytopathology*. – 2001. – Vol. 91. – P. 70–76.
82. Molecular mapping of qualitative and quantitative loci for resistance to *Leptosphaeria maculans* causing blackleg disease in canola (*Brassica napus* L.) / R. Raman [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2012b. – Vol. 125. – P. 405–418.
83. Selection of stable *Brassica napus* – *B. juncea* recombinant lines resistant to blackleg (*Leptosphaeria maculans*). 1. Identification of molecular markers, chromosomal and genomic origin of the introgression / A. M. Chèvre [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 1997. – Vol. 95. – P. 1104–1111.
84. Stabilization of resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus* – *B. juncea* recombinant lines and its introgression into spring type *Brassica napus* / A. M. Chèvre [et al.] // *Plant Disease*. – 2008. – Vol. 92. – P. 1208–1214.
85. Characterization of *Brassica nigra* chromosomes and of blackleg resistance in *B. napus* – *B. nigra* addition lines / A. M. Chèvre [et al.] // *Plant Breeding*. – 1996. – Vol. 115. – P. 113–118.
86. Yu, F. Identification of two novel genes for blackleg resistance in *Brassica napus* / F. Yu, D. J. Lydiate, S. R. Rimmer // *Theor. Appl. Genet.* – 2005. – Vol. 110. – P. 969–979.
87. Yu, F. Identification and mapping of a third blackleg resistance locus in *Brassica napus* derived from *B. rapa* subsp. *sylvestris* / F. Yu., D. J. Lydiate, S. R. Rimmer // *Genome*. – 2008. – Vol. 51. – P. 64–72.
88. Rimmer, S. R. Resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus* / S. R. Rimmer // *Can. J. Plant Pathol.* – 2006. – Vol. 28. – P. 288–297.
89. Identification and mapping of a novel blackleg resistance locus *LepR4* in the progenies from *Brassica napus* × *B. rapa* subsp. *sylvestris* / F. Yu [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2013. – Vol. 126, N 2. – P. 307–315.
90. Identification of a *Brassica juncea*-derived recessive gene conferring resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape / B. Saal [et al.] // *Plant Breeding*. – 2004. – Vol. 123. – P. 505–511.
91. Saal, B. RGA- and RAPD-derived SCAR markers for a *Brassica* B-genome introgression conferring resistance to blackleg in oilseed rape / B. Saal, D. Struss // *Theor. Appl. Genet.* – 2005. – Vol. 111. – P. 281–290.
92. RFLP mapping of resistance to the blackleg disease [causal agent, *Leptosphaeria maculans* (Desm) Ces et de Not] in canola (*Brassica napus* L.) / Y. Dion [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 1995. – Vol. 91. – P. 1190–1194.
93. Zhu, B. Inheritance of resistance to *Leptosphaeria maculans* in two accessions of *Brassica napus* / B. Zhu, S. R. Rimmer // *Can. J. Plant Pathol.* – 2003. – Vol. 25. – P. 98–103.
94. Molecular mapping of resistance to *Leptosphaeria maculans* in Australian cultivars of *Brassica napus* / R. Mayerhofer [et al.] // *Genome*. – 1997. – Vol. 40. – P. 294–301.
95. Mapping loci controlling *Brassica napus* resistance to *Leptosphaeria maculans* under different screening conditions / Ferreira, M. E. [et al.] // *Phytopathology*. – 1995. – Vol. 85. – P. 213–217.
96. Screening and identification of resistance to *Leptosphaeria maculans* (stem canker) in *Brassica napus* accessions / T. Rouxel [et al.] // *Euphytica*. – 2003. – Vol. 133. – P. 219–231.
97. Wretblad, S. Overexpression of a *Brassica nigra* cDNA gives enhanced resistance to *Leptosphaeria maculans* in *B. napus* / S. Wretblad, S. Bohman, C. Dixelius // *MPMI*. – 2003. – Vol. 16. – P. 477–484.
98. Dixelius, C. Inheritance of the resistance to *Leptosphaeria maculans* of *Brassica nigra* and *B. juncea* in near-isogenic lines of *B. napus* / C. Dixelius // *Plant Breeding*. – 1999. – Vol. 118. – P. 151–156.
99. Field efficiency of *Brassica napus* specific resistance correlates with *Leptosphaeria maculans* population structure / D. Ansan-Melayah [et al.] // *Eur. J. Plant Pathol.* – 1997. – Vol. 103. – P. 835–841.
100. Stability of QTL for field resistance to blackleg across two genetic backgrounds in oilseed rape / M. L. Pilet [et al.] // *Crop Sci.* – 2001. – Vol. 41. – P. 197–205.
101. Flor, H. H. The complementary genetic systems in flax and flax rust / H. H. Flor // *Adv. Genet.* – 1956. – Vol. 8, N 1. – P. 29–54.
102. Jones, J. D. G. The plant immune system / J. D. G. Jones, J. L. Dangl // *Nature*. – 2006. – Vol. 444, N 16. – P. 323–329.
103. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance / J. A. Poland [et al.] // *Trends Plant Sci.* – 2008. – Vol. 14, N 1. – P. 21–29.
104. Blackleg disease on oilseed *Brassica* in Australia / P. A. Salisbury [et al.] // *Aust. J. Exp. Agr.* – 1995. – Vol. 35. – P. 665–672.
105. Khangura, R. K. Prevalence of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) on canola (*Brassica napus*) in Western Australia / R. K. Khangura, M. J. Barbetti // *Aust. J. Exp. Agr.* – 2001. – Vol. 41. – P. 71–40.

106. Factors affecting production of inoculum of the blackleg fungus *Leptosphaeria maculans* in south-eastern Australia / S. J. Marcroft [et al.] // Aust. J. Exp. Agr. – 2003. – Vol. 43. – P. 1231–1236.
107. Potential for using host-resistance to reduce production of pseudothecia and ascospores of *Leptosphaeria maculans*, the blackleg pathogen of *Brassica napus* / S. J. Marcroft [et al.] // Plant Pathol. – 2004. – Vol. 53. – P. 468–474.
108. Identification of loci contributing to quantitative field resistance to blackleg disease, causal agent *Leptosphaeria maculans* (Desm.) ces. et De Not., in winter rapeseed (*Brassica napus* L.) / M. L. Pilet [et al.] // Theor. Appl. Genet. 1998. – Vol. 96. – P. 23–30.
109. Field behaviour of oilseed rape genotypes carrying major resistance genes exposed to different *Leptosphaeria maculans* populations / H. Brun [et al.] // Intern. Org. Boil. Control Bull. – 2004. – Vol. 27. – P. 95–100.
110. Light, K. A. Usefulness of winter canola (*Brassica napus*) race-specific resistance genes against blackleg (causal agent *Leptosphaeria maculans*) in southern Australian growing conditions / K. A. Light, N. N. Gororo, P. A. Salisbury // Crop Pasture Sci. – 2011. – Vol. 62. – P. 162–168.
111. Identification of environmentally stable QTL for resistance against *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*) / Y. J. Huang [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2016. – Vol. 129, N 1. – P. 169–180.
112. Blackleg resistance in rapeseed: phenotypic screen, molecular markers and genome wide linkage and association mapping / H. Raman [et al.] // 17<sup>th</sup> Australian Research Assembly on Brassicas (ARAB), Wagga Wagga, 15–17 August 2011. – Wagga Wagga, 2011. – P. 61–64.
113. Association mapping of quantitative resistance for *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus* L.) / C. Jestin [et al.] // Mol. Breed. – 2011. – Vol. 27. – P. 271–287.
114. Electrophoretic analysis of natural populations of *Leptosphaeria maculans* directly from leaf lesions / H. Brun [et al.] // Plant Pathol. – 1997. – Vol. 46. – P. 147–154.
115. Somda, I. Seedling and adult plant reactions of *Brassica napus* – *B. juncea* recombinant lines towards A- and B-group isolates of *Leptosphaeria maculans* / I. Somda, M. Renard, H. Brun // Ann. Appl. Biol. – 1998. – Vol. 132. – P. 187–196.
116. Evolution of the frequency of the *AvrLm7* allele of *Leptosphaeria maculans* in France under selection pressure: a 15-years survey / C. Plissonneau [et al.] // Healthy plant – healthy people: 11<sup>th</sup> conf. of the European foundation for plant pathology, Kraków, 8–13 September 2014. – Kraków, 2014. – P. 129.
117. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome / B. Chalhoub [et al.] // Science. – 2014. – Vol. 345. – P. 950–953.

## References

1. Friedt, W., Snowdon, R., Ordon, F. and Ahlemeyer, J. (2007), “Plant breeding: assessment of genetic diversity in crop plants and its exploitation in breeding”, *Progress in Botany*, vol. 168, pp. 151–178.
2. Mendes-Pereira, E., Balesdent, M. H., Brun H. and Rouxel, T. (2003), “Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans* – *L. biglobosa* species complex”, *Mycological Research*, vol. 107, pp. 1287–1304, doi:10.1017/S0953756203008554.
3. Gudelj, I., Fitt, B. D. L. and van den Bosch, F. (2004), “Evolution of sibling fungal pathogens in relation to host specialization”, *Phytopathology*, vol. 94, pp. 789–795, doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.7.789.
4. West, J. S., Kharband, P. D., Barbetti, M. J. and Fitt, B. D. L. (2001), “Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe”, *Plant Pathology*, vol. 50, pp. 10–27, doi: 10.1046/j.1365-3059.2001.00546.x.
5. Rouxel, T. and Balesdent, M. H. (2005), “The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era”, *Molecular Plant Pathology*, vol. 6, pp. 225–241, doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00282.x.
6. Williams, R. H. and Fitt, B. D. (1994), “Variation in host range, systemic infection and epidemiology of *Leptosphaeria maculans*”, *Plant Pathology*, vol. 43, pp. 269–277, doi: 10.1111/j.1365-3059.1994.tb02685.x.
7. Williams, R. H. and Fitt, B. D. L. (1999), “Differentiating A and B groups of *Leptosphaeria maculans*, causal agent of stem canker (blackleg) of oilseed rape”, *Plant Pathology*, vol. 48, pp. 161–175.
8. Shoemaker, R. A. and Brun, H. (2001), “The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*”, *Canadian Journal of Botany*, vol. 79, pp. 412–419, doi: 10.1139/b01-019.
9. West, J. S., Balesdent, M. H., Rouxel, T., Narcy, J. P., Huang, Y. J., Roux, J., Steed, J. M., Fitt, B. D. L. and Schmit, J. (2002a), “Colonisation of winter oilseed rape tissues by A/Tox<sup>+</sup> and B/Tox<sup>0</sup> *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in France and England”, *Plant Pathology*, vol. 51, pp. 311–321.
10. Jędryczka, M., Lewartowska, E. and Frencel, I. (1994), “Properties of *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. isolates from Poland. I. Pathogenicity characterization”, *Phytopathologia Polonica*, vol. 7, pp. 71–79.
11. Karolewski, Z., Kosiada, T., Hylak-Nowosad, B. and Nowacka, K. (2002), “Changes in population structure of *Leptosphaeria maculans* in Poland”, *Phytopathologia Polonica*, vol. 25, pp. 27–34.
12. Jędryczka, M., Burzyński, A., Brachaczek, A., Langwiński, W., Chwalisz, L. and Kaczmarek, J. (2014), “Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a speedy molecular tool to study *Leptosphaeria* spp. populations in air and plant samples”, *Healthy plant – healthy people: 11<sup>th</sup> conf. of the European foundation for plant pathology*, Kraków, PL, 8–13 September 2014, p. 137.
13. Szlávik, S. Z., Jędryczka, M., Kiss, I., Lewartowska, E. and Nagy, G. (2003), “Population structure and pathogenicity grouping of *L. maculans* isolates from Hungary”, *Blackleg News*, pp. 3–4.
14. Brazauskienė, I., Piliponytė, A., Petraitiienė, E. and Brazauskas, G. (2011), “Diversity of *Leptosphaeria maculans* / *L. biglobosa* species complex and epidemiology of phoma stem canker on oilseed rape in Lithuania”, *Journal of Plant Pathology*, vol. 93, no. 3, pp. 577–585.

15. Fitt, B. D. L., Brun, H., Barbetti, M. J. and Rimmer, S. R. (2006), “World-wide importance of *Phoma stem canker* (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*)”, *European Journal of Plant Pathology*, vol. 114, no. 1, pp. 3–15, doi: 10.1007/s10658-005-2233-5.
16. Fernando, W. G. D., Zhang, X. and Amarasinghe, C. C. (2016), “Detection of *Leptosphaeria maculans* and *Leptosphaeria biglobosa* causing blackleg disease in canola from canadian canola seed lots and dockage”, *Plants*, vol. 5, no. 1, pp. 1–11, doi: 10.3390/plants5010012.
17. Hao, L., Song, P., Huangfu, H. and Li, Z. (2015), “Genetic diversity and differentiation of *Leptosphaeria biglobosa* on oilseed rape in China”, *Phytoparasitica*, vol. 43, issue 2, pp. 253–263, doi: 10.1007/s12600-014-0439-9.
18. Huang, Y. J., Fitt, B. D. L., Jedryczka, M., Dakowska, S., West, J. S., Gladders, P., Steed, J. M. and Li, Z. Q. (2005), “Patterns of ascospore release in relation to phoma stem canker epidemiology in England (*Leptosphaeria maculans*) and Poland (*L. biglobosa*)”, *European Journal of Plant Pathology*, vol. 111, pp. 263–277, doi: 10.1007/s10658-004-4421-0.
19. Hadrami, El. A., Fernando, W. G. D. and Daayf, F. (2010), “Variations in relative humidity modulate *Leptosphaeria* spp. pathogenicity and interfere with canola mechanisms of defence”, *European Journal of Plant Pathology*, vol. 126, pp. 187–202, doi: 10.1007/s10658-009-9532-1.
20. Hammond, K. E., Lewis, B. G. and Musa, T. M. (1985), “A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*”, *Plant Pathology*, vol. 34, no. 4, pp. 557–565.
21. Williams, P. H. (1992), “Biology of *Leptosphaeria maculans*”, *Canadian Journal of Plant Pathology*, vol. 14, pp. 30–35.
22. Hall, R. (1992), “Epidemiology of blackleg of oilseed rape”, *Can. J. Plant Pathology*, vol. 14, pp. 46–55, doi: 10.3390/plants5030031.
23. Keri, M. (1999), “Genetic studies of host-pathogen interaction between *Brassica napus* and *Leptosphaeria maculans*”, Ph. D. Thesis, University of Manitoba, Winnipeg, CA.
24. Stachowiak, A., Olechnowicz, J., Jedryczka, M., Rouxel, T., Balesdent, M.-H., Hapstadus, I., Gladders, P., Latunde-Dada, A. and Evans, N. (2006), “Frequency of avirulence alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe”, *European Journal of Plant Pathology*, vol. 114, pp. 67–75, doi: 10.1007/s10658-005-2931-z.
25. Gladders, P. and Musa, T. M. (1980), “Observations on the epidemiology of *Leptosphaeria maculans* stem canker in winter oilseed rape”, *Plant Pathology*, vol. 29, pp. 28–37.
26. Gugel, R. K. and Petrie, G. A. (1992), History, occurrence, impact, and control of blackleg of rapeseed, *Canadian Journal of Plant Pathology*, vol. 14, pp. 36–45.
27. Zhang, X., White, R. P., Jedryczka, M., Lange, R. M., Li, Z. Q., Huang, Y.-J., Hall, A. M. and Fitt, B. D. L. (2014), “Potential spread of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape crops in China”, *Healthy plant – healthy people: 11<sup>th</sup> conf. of the European foundation for plant pathology*, Kraków, PL, 8–13 September 2014, p. 135.
28. Fernando, W. G. D., Chen, Y. and Ghanbarnia, K., “Breeding for blackleg resistance: the biology and epidemiology”, *Advances in Botanical Research*, 2007, vol. 45, pp. 271–311.
29. Salam, M. U., Fitt, B. D. L., Aubertot, J. N., Diggle, A. J., Huang, Y. J., Barbetti, M. J., Gladders, P., Jedryczka, M., Khangura, R. K., Wratten, N., Fernando, W. G. D., Penaud, A., Pinochet, X. and Sivasithamparam, K. (2007), “Two weather-based models for predicting the onset of seasonal release of ascospores of *Leptosphaeria maculans* or *L. biglobosa*”, *Plant Pathology*, vol. 56, pp. 412–423, doi: 10.1111/j.1365-3059.2006.01551.x.
30. Biddulph, J. E., Fitt, B. D. L., Leech, P. K., Welham, S. J. and Gladders, P. (1999), “Effects of temperature and wetness duration on infection of oilseed rape leaves by ascospores of *Leptosphaeria maculans* (stem canker)”, *European Journal of Plant Pathology*, vol. 105, pp. 769–781, doi: 10.1023/A:1008727530088.
31. Badawy, H. M. A., Kakau, J. and Hoppe, H. H. (1992), “Temperature and aging of host tissue affect the interactions between different oilseed rape cultivars and pathotype groups of *Leptosphaeria maculans*”, *Journal of Phytopathology*, vol. 134, pp. 255–263.
32. Petrie, G. A. (1994), “Effects of temperature and moisture on the number, size and septation of ascospores produced by *Leptosphaeria maculans* (blackleg) on rapeseed stubble”, *Canadian Plant Disease Survey*, vol. 74, pp. 141–151.
33. Guo, X. W. and Fernando, W. G. D. (2005), “Seasonal and diurnal patterns of spore dispersal by *Leptosphaeria maculans* from canola stubble in relation to environmental conditions”, *Plant Disease*, vol. 89, pp. 97–104.
34. Petrie, G. A. (1995), “Long-term survival and sporulation of *Leptosphaeria maculans* (blackleg) on naturally-infected rapeseed/canola stubble in Saskatchewan”, *Canadian Plant Disease Survey*, vol. 75, pp. 23–34.
35. West, J. S., Biddulph, J. E., Fitt, B. D. L. and Gladders, P. (1999), “Epidemiology of *Leptosphaeria maculans* in relation to forecasting stem canker severity on winter oilseed rape in the UK”, *Annals of Applied Biology*, vol. 135, pp. 535–546.
36. Marcroft, S. J., Van de Wouw, A. P., Salsbury, P. A., Pottere, T. D. and Howlett, B. J. (2012), “Effect of rotation of canola (*Brassica napus*) cultivars with different compliments of blackleg resistance genes on disease severity”, *Plant Pathology*, vol. 61, pp. 934–944, doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02580.x.
37. Delourme, R., Brun, H., Ermel, M., Lucas, M. O., Vallee, P., Domin, C., Walton, G., Li, H., Sivasithamparam, K. and Barbetti, M. J. (2008), “Expression of resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus* double haploid lines in France and Australia is influenced by location”, *Annals of Applied Biology*, vol. 153, pp. 259–269, doi: 10.1111/j.1744-7348.2008.00258.x.
38. Li, H., Barbetti, M. J. and Sivasithamparam, K. (2005), “Hazard from reliance on cruciferous hosts as source of major gene-based resistance for managing blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease”, *Field Crops Research*, vol. 91, pp. 185–198.
39. Howlett, B. J. (2004), “Current knowledge of the interaction between *Brassica napus* and *Leptosphaeria maculans*”, *Canadian Journal of Plant Pathology*, vol. 26, pp. 245–252.
40. Lamey, H. A. and Hershman, D. E. (1993), “Blackleg canola (*Brassica napus*) caused by *Leptosphaeria maculans* in North Dakota”, *Plant Disease*, vol. 77, p. 1263. doi: 10.1094/PD-77-1263B.

41. Wang, J., Kaur, S., Cogan, N. O. I., Dobrowolski, M. P., Salisbury, P. A., Burton, W. A., Baillie, R., Hand, M., Hopkins, C., Forster, J. W., Smith, K. F. and Spangenberg, G. (2009), "Assessment of genetic diversity in Australian canola (*Brassica napus* L.) cultivars using SSR markers", *Crop and Pasture Science*, vol. 60, pp. 1193–1201.
42. Kaur, S., Cogan, N. O. I., Ye, G., Baillie, R. C., Hand, M. L., Ling, A. E., Mcgearey, A. K., Kaur, J., Hopkins, C. J., Todorovic, M., Mountford, H., Edwards, D., Batley, J., Burton, W., Salisbury, P., Gororo, N., Marcroft, S., Kearney, G., Smith, K. F., Forster, J. W. and Spangenberg, G. C. (2009), "Genetic map construction and QTL mapping of resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in Australian canola (*Brassica napus* L.) cultivars", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 120, no. 1, pp. 71–83, doi: 10.1007/s00122-009-1160-9.
43. Tollenaere, R., Hayward, A., Dalton-Morgan, J., Campbell, E., Lee, J. R. M., Lorenc, M. T., Manoli, S., Stiller, J., Raman, R., Raman, H., Edwards, D. and Batley, J. (2012), "Identification and characterization of candidate *Rlm4* blackleg resistance genes in *Brassica napus* using next generation sequencing", *Plant Biotechnology Journal*, vol. 10, no. 6, pp. 709–715, doi: 10.1111/j.1467-7652.2012.00716.x.
44. Sprague, S. J., Marcroft, S. J., Hayden, H. L. and Howlett, B. J. (2006), "Major gene resistance to blackleg in *Brassica napus* overcome within three years of commercial production in southeastern Australia", *Plant Pathology*, vol. 59, pp. 190–198, doi: 10.1094/PD-90-0190.
45. Tilmor: vash klyuch k vyrashchivaniyu rapsa (*Tilmor: your key to the cultivation of rape*), Available at: <http://tv.sb.by/kolonka-eksperta/article/tilmor-vash-klyuch-k-vyrashchivaniyu-rapsa.html/> (Accessed 30 August 2016).
46. Rouxel, T., Grandaubert, J., Hane, J. K., Hoede, C., van de Wouw, A. P., Couloux, A., Dominguez, V., Anthouard, V., Bally, P., Bourras, S., Cozijnsen, A. J., Ciuffetti, L. M., Degrave, A., Dilmaghani, A., Duret, L., Fudal, I., Goodwin, S. B., Gout, L., Glaser, N., Linglin, J., Kema, G. H. J., Lapalu, N., Lawrence, C. B., May, K., Meyer, M., Ollivier, B., Poulain, J., Schoch, C. L., Simon, A., Spatafora, J.W., Stachowiak, A., Turgeon, B. G., Tyler, B. M., Vincent, D., Weissenbach, J., Amsellem, J., Quesneville, H., Oliver, R. P., Wincker, P., Balesdent, M.-H. and Howlett, B. J. (2011), "Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by repeat-induced point mutations", *Nature Communications*, vol. 2, no. 202, pp. 1–10, doi: 10.1038/ncomms1189.
47. Hayward, A., McLanders, J., Campbell, E., Edwards, D. and Batley, J. (2012), "Genomic advances will herald new insights into the Brassica: *Leptosphaeria maculans* pathosystem", *Plant Biology*, vol. 14, suppl. 1, pp. 1–10, doi:10.1111/j.1438-8677.2011.00481.x.
48. Gout, L., Kuhn, M. L., Vincenot, L., Bernard-Samain, S., Cattolico, L., Barbetti, M., Moreno-Rico, O., Balesdent, M. H. and Rouxel, T. (2007), "Genome structure impacts molecular evolution at the *AvrLm1* avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*", *Environmental Microbiology*, vol. 9, pp. 2978–2992, doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01408.x.
49. Fudal, I., Ross, S., Brun, H., Besnard, A. L., Ermel, M., Kuhn, M. L., Balesdent, M. H. and Rouxel, T. (2009), "Repeat-induced point mutation (RIP) as an alternative mechanism of evolution toward virulence in *Leptosphaeria maculans*", *MPMI*, vol. 22, pp. 932–941, doi: 10.1094/MPMI-22-8-0932.
50. Parlange, F., Daverdin, G., Fudal, I., Kuhn, M.-L., Balesdent, M.-H., Blaise, F., Grezes-Besset, B. and Rouxel, T. (2009), "*Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm4-7* confers a dual recognition specificity by the *Rlm4* and *Rlm7* resistance genes of oilseed rape, and circumvents *Rlm4*-mediated recognition through a single amino acid change", *Molecular Microbiology*, vol. 71, pp. 851–863, doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06547.x.
51. Farman, M. L. (2007), "Telomeres in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*: the world of the end as we know it", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 273, pp. 125–132, doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00812.x.
52. Plissonneau, C., Daverdin, G., Ollivier, B., Blaise, F., Degrave, A., Fudal, I., Rouxel, T. and Balesdent, M.-H. (2016), "A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*", *New Phytologist*, vol. 209, pp. 1613–1624, doi: 10.1111/nph.13736.
53. Fudal, I., Ross, S., Gout, L., Blaise, F., Kuhn, M. L., Eckert, M. R., Cattolico, L., Bernard-Samain, S., Balesdent, M. H. and Rouxel, T. (2007), "Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: map-based cloning of *AvrLm6*", *MPMI*, vol. 20, pp. 459–470.
54. Balesdent, M. H., Attard, A., Kühn, M. L. and Rouxel, T. (2002), "New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*", *Phytopathology*, vol. 92, pp. 1122–1133.
55. Balesdent, M. H., Barbetti, M.J., Li, H., Sivasithamparam, K., Gout, L. and Rouxel, T. (2005), "Analysis of *Leptosphaeria maculans* race structure in a worldwide collection of isolates", *Phytopathology*, vol. 95, pp. 1061–1071, doi: 10.1094/PHYTO-95-1061.
56. Ghanbarnia, K., Lydiate, J. L., Rimmer, S. R., Li, G., Kutcher, H. R., Larkan, N. J., McVetty, P. B. E. and Fernando, W. G. D. (2012), "Genetic mapping of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene corresponding to the *LepRI* resistance gene of *Brassica napus*", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 124, pp. 505–513, doi: 10.1007/s00122-011-1724-3.
57. Gout, L., Fudal, I., Kuhn, M.-L., Blaise, F., Eckert, M., Cattolico, L., Balesdent, M.-H. and Rouxel, T. (2006), "Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*", *Molecular Microbiology*, vol. 60, pp. 67–80, doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05076.x.
58. Ghanbarnia, K., Fudal, I., Larkan, N. J., Links, M. G., Balesdent, M.-H., Profotova, B., Fernando, W. G. D., Rouxel, T. and Borhan, M. H. (2015), "Rapid identification of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm2* using an intraspecific comparative genomics approach", *Molecular Plant Pathology*, vol. 16, no. 7, pp. 699–709, doi: 10.1111/mpp.12228.
59. Balesdent, M.-H., Fudal, I., Ollivier, B., Bally, P., Grandaubert, J., Eber, F., Chèvre, A.-M., Leflon, M. and Rouxel, T. (2013), "The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*", *New Phytologist*, vol. 198, pp. 887–898, doi: 10.1111/nph.12178.
60. Van de Wouw, A. P., Lowe, R. G. T., Elliott, C. E., Dubois, D. J. and Howlett, B. J. (2014a), "An avirulence gene, *AvrLmJ1*, from the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, confers avirulence to *Brassica juncea* cultivars", *Molecular Plant Pathology*, vol. 15, pp. 523–530.

61. Balesdent, M. H., Louvard, K., Pinochet, X. and Rouxel, T. A. (2006), “A large-scale survey of races of *Leptosphaeria maculans* occurring on oilseed rape in France”, *European Journal of Plant Pathology*, vol. 114, pp. 53–65, doi: 10.1007/s10658-005-2104-0.
62. Mitroussia, G. K., Huang, Y.-J. and Fitt, B. D. L. (2014), “Phoma stem canker on oilseed rape cultivars with the resistance gene *Rlm7* in the UK”, *Healthy plant – healthy people: 11<sup>th</sup> conf. of the European foundation for plant pathology*, Kraków, PL, 8–13 September 2014, p. 128.
63. Peng, G., Fernando, D., Yu, F., Zhang, X., Lange, R. and Kutcher, H. R. (2014), “Managing blackleg of canola in western Canada – “new” strategies against an old disease”, *Healthy plant – healthy people: 11<sup>th</sup> conf. of the European foundation for plant pathology*, Kraków, PL, 8–13 September 2014, p. 132.
64. Zhang, X., Peng, G., Kutcher, H. R., Balesdent, M.-H., Delourme, R. and Fernando, W. G. D. (2015), “Breakdown of *Rlm3* resistance in the *Brassica napus*–*Leptosphaeria maculans* pathosystem in western Canada”, *European Journal of Plant Pathology*, vol. 145, no. 3, pp. 1–16, doi: 10.1007/s10658-015-0819-0.
65. Winter, M., Klöppel, C., Fajemisin, F. and Koopmann, B. (2014), *Leptosphaeria maculans* in winter oilseed rape: distribution of different races in Germany and efficacy of monogenic resistance genes”, *Healthy plant – healthy people: 11<sup>th</sup> conf. of the European foundation for plant pathology*, Kraków, PL, 8–13 September 2014, p. 133.
66. Ferreira, M. E., Williams, P. H. and Osborn, T. C. (1995), “Mapping of a locus controlling resistance to *Albugo candida* in *Brassica napus* using molecular markers”, *Phytopathology*, vol. 85, pp. 218–220.
67. Ansan-Melayah, D., Balesdent, M. H., Delourme, R., Pilet, M. L., Tanguy, X., Renard, M. and Rouxel, T. (1998), “Genes for race-specific resistance against blackleg disease in *Brassica napus* L.”, *Plant Breeding*, vol. 117, pp. 373–378, doi: 10.1111/j.1439-0523.1998.tb01956.x.
68. Pilet, M. L., Delourme, R., Foisset, N. and Renard, M. (1998), “Identification of QTL involved in field resistance to light leaf spot (*Pyrenopeziza brassicae*) and blackleg resistance (*Leptosphaeria maculans*) in winter rapeseed (*Brassica napus* L.)”, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 97, pp. 398–406.
69. Delourme, R., Chèvre, A. M., Brun, H., Rouxel, T., Balesdent, M. H., Dias, J. S., Salisbury, P., Renard, M. and Rimmer, S. R. (2006), “Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*)”, *European Journal of Plant Pathology*, vol. 114, pp. 41–52, doi: 10.1007/s10658-005-2108-9.
70. Rimmer, S. R. and van den Berg, C. G. J. (1992), “Resistance of oilseed *Brassica* spp. to blackleg caused by *Leptosphaeria maculans*”, *Canadian Journal of Plant Pathology*, vol. 14, pp. 56–66.
71. Zhu, J. S., Struss, D. and Robbelen, G. (1993), “Studies on resistance to *Phoma lingam* in *Brassica napus* – *Brassica nigra* addition lines”, *Plant Breeding*, vol. 111, pp. 192–197, doi: 10.1111/j.1439-0523.1993.tb00629.x.
72. Ananga, A. O., Cebert, E., Soliman, K., Kantety, R., Pacumbaba, R. P. and Konan, K. (2006), “RAPD markers associated with resistance to blackleg disease in *Brassica* species”, *African Journal of Biotechnology*, vol. 5, pp. 2041–2048, doi: 10.5897/AJB06.594.
73. Leflon, M., Brun, H., Eber, F., Delourme, R., Lucas, M. O., Vallée, P., Ermel, M., Balesdent, M. H. and Chèvre, A. M. (2007), “Detection, introgression and localization of genes conferring specific resistance to *Leptosphaeria maculans* from *Brassica rapa* into *B. napus*”, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 115, pp. 897–906, doi: 10.1007/s00122-007-0616-z.
74. Delourme, R., Pilet-Nayel, M. L., Archipiano, M., Horvais, R., Tanguy, X., Rouxel, T., Brun, H., Renard, M. and Balesdent, M. H. (2004), “A cluster of major specific resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*”, *Phytopathology*, vol. 94, pp. 578–583, doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.6.578.
75. Brun, H., Chèvre, A. M., Fitt, B. D., Powers, S., Besnard, A.-L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M. and Andrivon, D. (2010), “Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*”, *New Phytologist*, vol. 185, pp. 285–299, doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03049.x.
76. Raman, R., Taylor, B., Lindbeck, K., Coombes, N., Barbulescu, D., Salisbury, P. and Raman, H. (2012), “Molecular mapping and validation of *Rlm1* gene for resistance to *Leptosphaeria maculans* in canola (*Brassica napus* L.)”, *Crop and Pasture Science*, vol. 63, pp. 1007–1017, doi: 10.1071/CP12255.
77. Wang, Z. (2013), “Development of high-throughput molecular markers for blackleg (*Leptosphaeria maculans*) resistance genes in *Brassica napus* for gene stacking”, *Universal Journal of Plant Science*, vol. 1, pp. 118–124, doi: 10.13189/ujps.2013.010402.
78. Rouxel, T., Penaud, A., Pinochet, X., Brun, H., Gout, L., Delourme, R., Schmit, J. and Balesdent, M.-H. (2003), “A ten-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape”, *European Journal of Plant Pathology*, vol. 109, pp. 871–881.
79. Larkan, N. J., Lydiate, D. J., Parkin, I. A. P., Nelson, M. N., Epp, D. J., Cowling, W. A., Rimmer, S. R. and Borhan, M. H. (2013), “The *Brassica napus* blackleg resistance gene *LepR3* encodes a receptor-like protein triggered by the *Leptosphaeria maculans* effector AVRLM1”, *New Phytologist*, vol. 197, pp. 595–605, doi: 10.1111/nph.12043.
80. Larkan, N. J., Lydiate, D. J., Yu, F., Rimmer, S. R. and Borhan, M. H. (2014), “Co-localisation of the blackleg resistance genes *Rlm2* and *LepR3* on *Brassica napus* chromosome A10”, *BMC Plant Biology*, vol. 14, no. 387, pp. 1–9, doi: 10.1186/s12870-014-0387-z.
81. Balesdent, M. H., Attard, A., Ansan-Melayah, D., Delourme, R., Renard, M. and Rouxel, T. (2001), “Genetic control and host range of avirulence toward *Brassica napus* cultivars Quinta and Jet Neuf in *Leptosphaeria maculans*”, *Phytopathology*, vol. 91, pp. 70–76, doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.1.70.
82. Raman, R., Taylor, B., Marcroft, S., Stiller, J., Eckermann, P., Coombes, N., Rehman, A., Lindbeck, K., Luckett, D., Wratten, N., Batley, J., Edwards, D., Wang, X. and Raman, H. (2012b), “Molecular mapping of qualitative and quantitative loci for resistance to *Leptosphaeria maculans* causing blackleg disease in canola (*Brassica napus* L.)”, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 125, pp. 405–418, doi: 10.1007/s00122-012-1842-6.

83. Chèvre, A. M., Barret, P., Eber, F., Dupuy, P., Brun, H., Tanguy, X. and Renard, M. (1997), “Selection of stable *Brassica napus* – *B. juncea* recombinant lines resistant to blackleg (*Leptosphaeria maculans*). 1. Identification of molecular markers, chromosomal and genomic origin of the introgression”, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 95, pp. 1104–1111.
84. Chèvre, A. M., Brun, H., Eber, F., Letanneur, J.-C., Vallee, P., Ermel, M., Glais, I., Li, H., Sivasithamparam, K. and Barbetti, M. J. (2008), “Stabilization of resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus* – *B. juncea* recombinant lines and its introgression into spring type *Brassica napus*”, *Plant Disease*, vol. 92, pp. 1208–1214, doi:10.1094/PDIS-92-8-1208.
85. Chèvre, A. M., Eber, F., This, P., Barret P., Tanguy, X., Brun, H., Delseny, M. and Renard, M. (1996), “Characterization of *Brassica nigra* chromosomes and of blackleg resistance in *B. napus* – *B. nigra* addition lines”, *Plant Breeding*, vol. 115, pp. 113–118, doi: 10.1111/j.1439-0523.1996.tb00884.x.
86. Yu, F., Lydiate, D. J. and Rimmer, S. R. (2005), “Identification of two novel genes for blackleg resistance in *Brassica napus*, *Theoretical and Applied Genetics*”, vol. 110, pp. 969–979, doi: 10.1007/s00122-004-1919-y.
87. Yu, F., Lydiate, D. J. and Rimmer, S. R. (2008), “Identification and mapping of a third blackleg resistance locus in *Brassica napus* derived from *B. rapa* subsp. *sylvestris*”, *Genome*, vol. 51, pp. 64–72, doi: 10.1139/G07-103.
88. Rimmer, S. R. (2006), “Resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*”, *Canadian Journal of Plant Pathology*, vol. 28, pp. 288–297.
89. Yu, F., Gugel, R., Kutcher, H., Peng, G. and Rimmer, S. R. (2013), “Identification and mapping of a novel blackleg resistance locus *LepR4* in the progenies from *Brassica napus* × *B. rapa* subsp. *sylvestris*”, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 126, no. 2, pp. 307–315, doi: 10.1007/s00122-012-1919-2.
90. Saal, B., Brun, H., Glais, I. and Struss, D. (2004), “Identification of a *Brassica juncea*-derived recessive gene conferring resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape”, *Plant Breeding*, vol. 123, pp. 505–511.
91. Saal, B. and Struss, D. (2005), “RGA- and RAPD-derived SCAR markers for a *Brassica* B-genome introgression conferring resistance to blackleg in oilseed rape”, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 111, pp. 281–290, doi: 10.1007/s00122-005-2022-8.
92. Dion, Y., Gugel, R. K., Rakow, G. F. W., Séguin-Swartz, G. and Landry, B. S. (1995), “RFLP mapping of resistance to the blackleg disease [causal agent, *Leptosphaeria maculans* (Desm) Ces et de Not] in canola (*Brassica napus* L.)”, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 91, P. 1190–1194, doi: 10.1007/BF00220928.
93. Zhu, B. and Rimmer, S. R. (2003), “Inheritance of resistance to *Leptosphaeria maculans* in two accessions of *Brassica napus*”, *Canadian Journal of Plant Pathology*, vol. 25, pp. 98–103, doi: 10.1080/07060660309507054.
94. Mayerhofer, R., Bansal, V. K., Thiagarajah, M. R., Stringam, G. R. and Good, A. G. (1997), “Molecular mapping of resistance to *Leptosphaeria maculans* in Australian cultivars of *Brassica napus*”, *Genome*, vol. 40, pp. 294–301.
95. Ferreira, M. E., Rimmer, S. R., Williams, P. H. and Osborn, T. C. (1995), “Mapping loci controlling *Brassica napus* resistance to *Leptosphaeria maculans* under different screening conditions”, *Phytopathology*, vol. 85, no. 2, pp. 213–217.
96. Rouxel, T., Willner, E., Coudard, L. and Balesdent, M.-H. (2003), “Screening and identification of resistance to *Leptosphaeria maculans* (stem canker) in *Brassica napus* accessions”, *Euphytica*, vol. 133, pp. 219–231.
97. Wretblad, S., Bohman, S. and Dixelius, C. (2003), “Overexpression of a *Brassica nigra* cDNA gives enhanced resistance to *Leptosphaeria maculans* in *B. napus*”, *MPMI*, vol. 16, pp. 477–484, doi: 10.1094/MPMI.2003.16.6.477.
98. Dixelius, C. (1999), “Inheritance of the resistance to *Leptosphaeria maculans* of *Brassica nigra* and *B. juncea* in near-isogenic lines of *B. napus*”, *Plant Breeding*, vol. 118, pp. 151–156.
99. Ansan-Melayah, D., Rouxel, T., Bertrand, J., Letarnek, B., Mendes-Pereira, E. and Balesdent, M.-H. (1997), “Field efficiency of *Brassica napus* specific resistance correlates with *Leptosphaeria maculans* population structure”, *European Journal of Plant Pathology*, vol. 103, pp. 835–841, doi:10.1023/A:1008605829110.
100. Pilet, M. L., Duplan, G., Archipiano, M., Barret, P., Baron, C., Horvais, R., Tanguy, X., Lucas, M., Renard, M. and Delourme, R. (2001), “Stability of QTL for field resistance to blackleg across two genetic backgrounds in oilseed rape”, *Crop Science*, vol. 41, pp. 197–205.
101. Flor, H. H. (1956), “The complementary genetic systems in flax and flax rust”, *Advances in Genetics*, vol. 8, no. 1, pp. 29–54, doi: 10.1371/journal.pbio.0030203.
102. Jones, J. D. G. and Dangl, J. L. (2006), The plant immune system, *Nature*, vol. 444, no. 16, pp. 323–329, doi: 10.1038/nature05286.
103. Poland, J. A., Balint-Kurti, P. J., Wisser, R. J., Pratt, R. C. and Nelson, R. J. (2008), “Shades of gray: the world of quantitative disease resistance”, *Trends in Plant Science*, vol. 14, no. 1, pp. 21–29, doi: 10.1016/j.tplants.2008.10.006.
104. Salisbury, P. A., Ballinger, D. J., Wratten, N., Plummer, K. M. and Howlett, B. J. (1995), “Blackleg disease on oilseed *Brassica* in Australia”, *Australian Journal of Experimental Agriculture*, vol. 35, pp. 665–672.
105. Khangura, R. K. and Barbetti, M. J. (2001), “Prevalence of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) on canola (*Brassica napus*) in Western Australia”, *Australian Journal of Experimental Agriculture*, vol. 41, pp. 71–40, doi: 10.1071/EA00068.
106. Marcroft, S. J., Sprague, S. J., Pymmer, S. J., Salisbury, P. A. and Howlett, B. J. (2003), “Factors affecting production of inoculum of the blackleg fungus *Leptosphaeria maculans* in south-eastern Australia”, *Australian Journal of Experimental Agriculture*, vol. 43, pp. 1231–1236.
107. Marcroft, S. J., Sprague, S. J., Salisbury, P. A. and Howlett, B. J. (2004), “Potential for using host-resistance to reduce production of pseudothecia and ascospores of *Leptosphaeria maculans*, the blackleg pathogen of *Brassica napus*”, *Plant Pathology*, vol. 53, pp. 468–474, doi: 10.1111/j.1365-3059.2004.01050.x.
108. Pilet, M. L., Delourme, R., Foisset, N. and Renard, M. (1998), “Identification of loci contributing to quantitative field resistance to blackleg disease, causal agent *Leptosphaeria maculans* (Desm.) ces. et De Not., in winter rapeseed (*Brassica napus* L.)”, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 96, pp. 23–30.

109. Brun, H., Huteau, V., Ermel, M., Eber, F., Chevre, A. M. and Renard, M. (2004), “Field behaviour of oilseed rape genotypes carrying major resistance genes exposed to different *Leptosphaeria maculans* populations”, *International Organisation for Biological Control Bulletin*, vol. 27, pp. 95–100.

110. Light, K. A., Gororo, N. N. and Salisbury, P. A. (2011), “Usefulness of winter canola (*Brassica napus*) race-specific resistance genes against blackleg (causal agent *Leptosphaeria maculans*) in southern Australian growing conditions”, *Crop and Pasture Science*, vol. 62, pp. 162–168, doi: 10.1071/CP10187.

111. Huang, Y. J., Jestin, C., Welham, S. J., King, G. J., Manzanares-Dauleux, M. J., Fitt, B. D. L. and Delourme, R. (2016), “Identification of environmentally stable QTL for resistance against *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*)”, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 129, no. 1, pp. 169–180, doi: 10.1007/s00122-015-2620-z.

112. Raman, H., Raman, R., Taylor, B., Lindbeck, K., Coombes, N., Eckermann, P., Batley, J., Edwards, D., Price, A., Rehman, A., Marcroft, S., Luckett, D., Hossain, S. and Salisbury, P. (2011), “Blackleg resistance in rapeseed: phenotypic screen, molecular markers and genome wide linkage and association mapping”, *17<sup>th</sup> Australian Research Assembly on Brassicas (ARAB)*, Wagga Wagga, AU, 15–17 August, pp. 61–64.

113. Jestin, C., Lodé, M., Vallée, P., Domin, C., Falentin, C., Horvais, R., Coedel, S., Manzanares-Dauleux, M. J. and Delourme, R. (2011), “Association mapping of quantitative resistance for *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus* L.)”, *Molecular Breeding*, vol. 27, pp. 271–287, doi: 10.1007/s11032-010-9429-x.

114. Brun, H., Levivier, S., Eber, F., Renard, M. and Chèvre, A. M. (1997), “Electrophoretic analysis of natural populations of *Leptosphaeria maculans* directly from leaf lesions”, *Plant Pathology*, vol. 46, pp. 147–154, doi: 10.1046/j.1365-3059.1997.d01-209.x.

115. Somda, I., Renard, M. and Brun, H. (1998), “Seedling and adult plant reactions of *Brassica napus* – *B. juncea* recombinant lines towards A- and B-group isolates of *Leptosphaeria maculans*”, *Annals of Applied Biology*, vol. 132, pp. 187–196, doi: 10.1111/j.1744-7348.1998.tb05196.x.

116. Plissonneau, C., Rouxel, T., Daverdin, G., Meur, L. L., Soulard, T., Cugnire, L. and Balesdent, M.-H. (2014), “Evolution of the frequency of the *AvrLm7* allele of *Leptosphaeria maculans* in France under selection pressure: a 15-years survey”, *Healthy plant – healthy people: 11<sup>th</sup> conf. of the European foundation for plant pathology*, Kraków, PL, 8–13 September 2014, p. 129.

117. Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., Parkin, I. A. P., Tang, H., Wang, X., Chiquet, J., Belcram, H., Tong, C., Samans, B., Corrêa, M., Silva, C. D., Just, J., Falentin, C., Koh, C. S., Clainche, I. L., Bernard, M., Bento, P., Noel, B., Labadie, K., Alberti, A., Charles, M., Arnaud, D., Guo, H., Daviaud, C., Alamery, S., Jabbari, K., Zhao, M., Edger, P. P., Chelaifa, H., Tack, D., Lassalle, G., Mestiri, I., Schnel, N., Paslier, M.-C. L., Fan, G., Renault, V., Bayer, P. E., Golicz, A. A., Manoli, S., Lee, T.-H., Thi, V. H. D., Chalabi, S., Hu, Q., Fan, C., Tollenaere, R., Lu, Y., Battail, C., Shen, J., Sidebottom, C. H. D., Wang, X., Canaguier, A., Chauveau, A., Bérard, A., Deniot, G., Guan, M., Liu, Z., Sun, F., Lim, Y. P., Lyons, E., Town, C. D., Bancroft, I., Wang, X., Meng, J., Ma, J., Pires, J. C., King, G. J., Brunel, D., Delourme, R., Renard, M., Aury, J.-M., Adams, K. L., Batley, J., Snowdon, R. J., Tost, J., Edwards, D., Zhou, Y., Hua, W., Sharpe, A. G., Paterson, A. H., Guan, C. and Wincker, P. (2014), “Early allopolyploid evolution in the post – Neolithic *Brassica napus* oilseed genome”, *Science*, vol. 345, pp. 950–953.

### Информация об авторе

Волуевич Елена Александровна – д-р биол. наук, доцент, гл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Voluevitch@yandex.ru

### Information about the author

Voluevich Elena – D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Chief scientific employee. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Voluevitch@yandex.ru

### Для цитирования

Волуевич, Е. А. Генетика устойчивости рапса (*Brassica napus* L.) к фомозу / Е. А. Волуевич // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2017. – № 1. – С. 101–118.

### For citation

Voluevich, E. A. (2017), “Genetics of rape (*Brassica napus* L.) resistance to blackleg”, *Proceedings of the National Academy of Science of Belarus, biological series*, no. 1, pp. 101–118.

**Е. А. Волуевич**

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

### **СТРАТЕГИИ УПРАВЛЕНИЯ ФОМОЗОМ РАПСА (*BRASSICA NAPUS* L.)**

Фомоз является широко распространенной болезнью рапса во всем мире, в том числе в Республике Беларусь. Для контроля этой болезни используют агротехнические приемы: севооборот, обработку почвы, оптимальные сроки посева, нормы высева семян, дозы внесения удобрений, обработки пестицидами. В зависимости от условий в зонах выращивания эту культуру рекомендуется возвращать на прежнее поле через 3–5 лет, в Беларуси – через 4–5 лет. Хорошим приемом контроля фомоза является запашка растительных остатков до осени. В некоторых странах для борьбы с фомозом проводят протравливание семян и опрыскивание почвы и растений фунгицидами.

Лучший способ управления фомозом – выращивание устойчивых сортов. Поскольку *Leptosphaeria maculans* преодолевает главные гены устойчивости, болезнь можно контролировать путем диверсификации возделываемых сортов по генам устойчивости и их размещения. Ротацию культурных сортов, содержащих различные гены или комбинации генов устойчивости, рекомендуется проводить каждые 4 года. При этом важно осуществлять регулярный мониторинг частоты встречаемости генов вирулетности с целью определения эффективности известных главных генов устойчивости. Одной из стратегий увеличения длительности устойчивости к фомозу является применение одичавших главных генов или их различных сочетаний на генетическом фоне с неспецифической резистентностью. Длительность устойчивости можно повысить, используя смеси сортов или видов с разными генами устойчивости на одном поле и межполевую диверсификацию. Следует предусматривать и защиту рапса от *L. biglobosa*, который может наносить значительный ущерб, особенно сортам с эффективными главными генами устойчивости к *L. maculans*. Кроме того, для химической защиты рапса от *L. biglobosa* требуются более высокие дозы триазолов, чем для контроля *L. maculans*, поэтому существует большая потребность в селекции устойчивых сортов рапса как к *L. maculans*, так и к *L. biglobosa*.

*Ключевые слова:* рапс, фомоз, гены устойчивости, стратегии контроля.

**E. A. Voluevich**

*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

### **BLACKLEG OF RAPE (*BRASSICA NAPUS* L.) MANAGEMENT STRATEGIES**

Blackleg is harmful and widespread disease of rape, including the Republic of Belarus. To control the disease are agricultural practices: crop rotation, tillage, the optimum time of sowing, seeding rate, fertilizer rates and pesticide treatments. Depending on the conditions in the areas of cultivation of this crop it is recommended to return to the previous field in 3–5 years, in Belarus – in 4–5 years. Good reception of blackleg control – plowing of crop residues to fall. Seed treatment and spraying of soil and plants with fungicides are conducted in different countries to combat blackleg disease.

The best way to control of blackleg disease is cultivation of resistant varieties. Since *Leptosphaeria maculans* overcomes major resistance genes, the disease can be controlled through the diversification of cultivated varieties for resistance genes and their placement. Rotation of cultivars containing different genes or combinations of resistance genes is recommended to carry out every four years. Regular monitoring of virulent gene frequency is important in order to determine the effectiveness of known major resistance genes. One strategy for increasing of durable resistance to blackleg is the use of single major genes or their different combinations on genetic background with non-specific resistance. Durability of resistance can be increased using composition of species or varieties with different resistance genes on one field and interfield diversification. It is necessary and to provide of rape protect from *L. biglobosa*, which can cause significant damage, especially for varieties with effective major resistance genes to *L. maculans*. Moreover, chemical rape protection against *L. biglobosa* requires of higher triazole doses than to control *L. maculans*, so there is a great need for selection of rape cultivars with resistance to both *L. maculans* and *L. biglobosa*.

*Keywords:* rape, blackleg, resistance genes, strategies of disease control.

**Введение.** Рапс *Brassica napus* L. – сельскохозяйственная культура многоцелевого назначения, наиболее значимый член семейства Brassicaceae, которое включает свыше 3350 видов [1]. Это аллополиплоид, возникший в Средиземноморском регионе юго-западной Европы около 10 тыс. лет назад при межвидовой гибридизации двух филогенетически близких видов – сурепицы *B. rapa* L. (AA,  $2n = 20$ ) и капусты огородной *B. oleracea* L. (CC,  $2n = 18$ ), его дикие формы не известны [2–4].

Фомоз является широко распространенной болезнью *Brassicac* во всем мире, включая Республику Беларусь. Значение этой болезни усилилось в связи с интенсификацией производства рапса и потеплением климата. Эффективный контроль фомоза включает как агротехнические приемы, так и генетическую защиту сортов. В статье рассмотрены разные стратегии управления болезнью, в том числе использование генов устойчивости.

**Стратегии контроля фомоза рапса.** В последние годы пораженность фомозом увеличилась вследствие интенсификации производства рапса, потепления климата и отсутствия стратегий управления фомозом. Это привело к острой необходимости эффективного контроля болезни, где важное место отводится как агротехническим приемам, так и использованию генетической устойчивости.

К агротехническим приемам относят севооборот, обработку почвы, сроки посева, нормы высева семян, дозы внесения удобрений, использование пестицидов. Севооборот является одной из старейших и наиболее эффективных стратегий контроля, с помощью которого популяции гриба уменьшаются до уровня, когда они не имеют экономического значения, если культура высеяна повторно. Принцип севооборота заключается в планировании порядка размещения культур на том же поле таким образом, чтобы осуществлялось разложение зараженной стерни. В этом случае способность патогена продуцировать инокулюм как источник болезни снижается [5]. Для рапса рекомендуется 3–5-летний севооборот [6]. Вспашка увеличивает аэрацию почвы и повышает ее температуру, что приводит к быстрому разложению стерни, которая является источником первичной инфекции, поэтому запашка растительных остатков до осени – хороший прием контроля фомоза [7]. Нулевая обработка почвы, например, в Западной Канаде приводит к сохранению инфекции на зараженных растительных остатках [8].

Способствует развитию фомоза слишком ранний посев озимого рапса и поздний – ярового [9, 10]. Загущенные посевы рапса, в которых растения имеют тонкие стебли, поражаются сильнее. Степень тяжести фомоза увеличивается в результате механических повреждений растений насекомыми (крестоцветные блошки, рапсовый цветоед и др.), а также при проведении мероприятий по уходу за растениями с использованием техники [11].

Для борьбы с фомозом используют пестициды (протравители семян, фунгициды для опрыскивания почвы и растений). Например, в Канаде обработка семян, начатая в 1978 г., рекомендована даже если фомоз в партиях семян не выявлен (цит. по [8]). В полевых условиях необходимо опрыскивание растений препаратом в более раннее время, потому что при поражении стебля грибом болезнь уже не контролируется фунгицидом. Так, в Западной Европе опрыскивания фунгицидами для химического контроля фомоза применяют осенью/зимой во время появления пятен на листьях [12, 13].

Лучший способ управления фомозом – выращивание устойчивых сортов и линий, однако в результате давления отбора, оказываемого расоспецифическими генами на популяции гриба, который имеет большой потенциал для развития вирулентности, сорта с главными генами устойчивости быстро становятся восприимчивыми. Результаты исследований, проведенных в Европе и Австралии, показали, что популяции *L. maculans* при использовании одного и того же главного гена устойчивости во многих сортах, выращиваемых на больших площадях, быстро преодолевают такую устойчивость [14]. Изучение изолятов *L. maculans*, собранных по всему миру, показало, что многие из известных главных генов устойчивости уже преодолены [15]. Так, в результате скрещивания *B. napus* и *B. rapa* ssp. *sylvestris* разработан устойчивый к фомозу сорт Surpass 400 [16], предположительно с интрогрессированными из *B. rapa* генами резистентности *LepR1*, *LepR2* и *LepR3* [17, 18]. В 2001 г. сорт Surpass 400 был выпущен на коммерческой основе и имел высокую устойчивость к фомозу в полевых условиях. Однако спустя 3 года эта устойчивость стала неэффективной из-за быстрого увеличения в местных популяциях гриба изолятов с вирулентностью к гену *LepR3* [19, 20]. В Австралии пораженность фомозом сортов с *sylvestris*-устойчивостью стала выше, чем сортов с полигенной устойчивостью, не имеющих эффективных главных генов резистентности [8]. Имеются доказательства разрушения устойчивости к фомозу и у сортов во Франции [21, 22], где после реализации сортов рапса с геном *Rlm1* в течение 3 лет произошло его преодоление [23]. Во Франции в 2000 г. [24] и в Австралии в 2003 г. [25]

разрушение устойчивости сортов явилось результатом быстрого изменения частоты генов авирулентности, зависящей от генов устойчивости, присутствующих в выращиваемых сортах. Например, во Франции увеличение площадей под сортами рапса с геном *Rlm1* привело к большому размеру популяции гриба и высокой концентрации изолятов патогена с *avrLm1*-геном, а последующие половая рекомбинация и изменения в агротехнике (более короткие севообороты и минимальная обработка почвы) способствовали нарастанию частоты вирулентных аллелей [25]. Существуют также доказательства постепенного преодоления главных генов устойчивости *Rlm9*, *Rlm2* и *Rlm4* во Франции, а также гена *Rlm4* в Австралии после широкого использования сортов, содержащих эти расоспецифические гены [24, 26]. Известно, что ротация сортов, защищенных разными генами устойчивости, может уменьшить частоту вирулентных изолятов к конкретному гену устойчивости вследствие уменьшения давления отбора этого гена на популяцию гриба, поэтому фомозом можно управлять с помощью соответствующих *R*-генов. Так, например, ген *Rlm4* присутствовал в 53 % австралийских сортов до 2002 г., в настоящее время их число уменьшилось до 29 % [27]. В Канаде эффективными для селекции являются гены *Rlm2* и *Rlm4* [28]. Кроме того, в канадские сорта рапса могут быть введены и другие полезные гены – *Rlm5*, *Rlm6*, *Rlm7* и *Rlm11* [28]. В Европе отмечена высокая эффективность генов устойчивости *Rlm6* и *Rlm7* [29]. Однако полевой опыт с использованием гена *Rlm6*, интрогрессированного в *B. napus* из *B. juncea*, показал быстрое преодоление устойчивости [30]. В Австралии, как известно, ген *Rlm6* уже потерял эффективность, и увеличение частоты вирулентности к этому гену происходило при его отсутствии в выращиваемых сортах [31] из-за сцепления *AvrLm1* и *AvrLm6* [32, 33]. Во Франции после реализации сортов с геном *Rlm7* спустя 3 года обнаружилось уже 36 % вирулентных изолятов к этому гену устойчивости [34]. Таким образом, в течение нескольких лет после реализации сортов, содержащих главные гены расоспецифической устойчивости, уменьшается эффективность некоторых из них, что ограничивает полезность этих генов для контроля фомоза в случае их использования в сортах, выращиваемых на больших площадях [24, 35–37].

С целью определения эффективности известных главных генов устойчивости для их использования в селекции необходим регулярный мониторинг частоты генов авирулентности/вирулентности в популяции возбудителя фомоза. При этом важно проводить ротацию генов устойчивости во времени и пространстве. Так, например, в Австралии в 2003 г. увеличилось развитие фомоза спустя 3 года после коммерческого выпуска сортов с *sylvestris*-устойчивостью [25]. Однако с увеличением площадей под сортами с альтернативной устойчивостью частота вирулентных изолятов *L. maculans* на сортах с *sylvestris*-устойчивостью снизилась к 2005 г. [27, 38], т. е. наблюдался подъем и спад в развитии болезни на сортах с *sylvestris*-устойчивостью [27]. В Канаде пораженность посевов рапса фомозом увеличивалась с 2005 по 2012 г., что коррелировало с возрастанием частоты вирулентных изолятов к гену устойчивости *Rlm3*. Это было обусловлено давлением отбора гена *Rlm3* на популяцию патогена вследствие увеличения в данный период времени площадей возделывания под сортами с *Rlm3* [28]. Возрастание ущерба от фомоза было обусловлено также 2-летним севооборотом вместо 4-летнего в связи с интенсификацией производства масличного рапса [39]. Для изменения ситуации в этой стране может быть использована стратегия, аналогичная примененной в Австралии *sylvestris*-устойчивости [28].

Приемлемым подходом для минимизации давления отбора на авирулентные изоляты в направлении быстрой эволюции вирулентности и преодоления генов резистентности может быть ротация различных генов устойчивости, что увеличит продолжительность устойчивости сортов. Ротация генов направлена также на снижение распространения фомоза вследствие уменьшения инокулюма. Для увеличения длительности устойчивости необходимо выявить много разных генов устойчивости, чтобы разнообразить их использование в разрабатываемых сортах с целью определения стратегии управления фомозом через размещение генотипов [40]. Длительность эффективности расоспецифических генов устойчивости зависит от размера популяции *L. maculans*, что непосредственно связано с количеством пораженных остатков растений рапса, поэтому для сохранения устойчивости следует применять и подходящие агротехнические приемы, в частности менее интенсивную ротацию рапса [14].

Таким образом, для успешного производства рапса и управления фомозом необходимо использование таких стратегий контроля, как выбор сорта или ротация главных генов устойчивости во времени, в сочетании с хорошей количественной устойчивостью и лучшими агротехническими приемами [14]. Ротацию культурных сортов, содержащих различные гены или комбинации генов устойчивости, рекомендуется осуществлять каждые 4 года, чтобы минимизировать давление отбора на популяцию гриба и повысить длительность устойчивости [41]. Однако не все гены устойчивости могут быть использованы в севообороте. Например, сорта с *Rlm1* не следует заменять сортами с *Rlm6* [27], потому что отбор изолятов гриба с вирулентностью к гену *Rlm1* также приводит к увеличению частоты вирулентности к *Rlm6*, так как гены *AvrLm1* и *AvrLm6* тесно сцеплены в геноме патогена. Таким образом, для разработки стратегии ротации расоспецифических генов устойчивости необходимо понимание генетического взаимодействия между генами устойчивости и генами авирулентности.

Многие селекционеры и фитопатологи считают, что одной из важных целей является разработка сортов с длительной устойчивостью, однако это не простая задача [42]. Устойчивость сорта считается длительной, если она сохраняется в течение продолжительного времени при его выращивании на больших площадях в благоприятных для развития болезни условиях [43]. Полагают, что более длительной должна быть нерасоспецифическая устойчивость, так как на сортах с такой устойчивостью воспроизводится широкий спектр патотипов без особого давления отбора на повышение вирулентности. Таким образом, длительной является, как правило, полигенная устойчивость. Однако со временем у некоторых сортов *B. napus* и полигенная устойчивость становится менее эффективной вследствие изменений вирулентности и агрессивности (способности вызывать более тяжелое заболевание) в популяции *L. maculans*. Так, например, в Австралии сорт Rainbow после реализации в 1993 г. сохранял свой рейтинг (ABR, Australia Blackleg Rating) по устойчивости к фомозу – 6,5 до 2000 г., однако в 2004 г. он снизился до 5,5 [25]. ABR сорта Ripper снижался быстрее: от 7,5 в 2000 г. до 5,0 в 2004 г. [25]. Это связано с тем, что полигенная устойчивость также характеризуется сорт × изолят взаимодействиями, поскольку может включать расоспецифический компонент, что показано, например, для фитопатосистемы мягкая пшеница – возбудитель бурой ржавчины [44, 45].

Одной из эффективных стратегий повышения длительной устойчивости к фомозу является селекция сортов рапса путем комбинирования ювенильных и возрастных генов [21, 46–48]. Ювенильная и возрастная устойчивость играют важную роль в контроле фомоза. Взаимодействие специфических *R*-генов и соответствующих им генов авирулентности на стадии проростков обычно приводит к очень низкой степени пораженности болезнью на стадии взрослого растения [28]. Кроме того, сочетание главных генов устойчивости с полигенами увеличивает длительность устойчивости, замедляя адаптацию и размножение вирулентных изолятов к расоспецифическим генам [21, 46], т. е. образцы рапса, которые имеют гены ювенильной и возрастной устойчивости, могут характеризоваться и более продолжительной *R*-генной устойчивостью [21, 27]. Так, например, главный ген устойчивости *Rlm6* дольше сохранял эффективность, когда экспрессировался на генетическом фоне образца с количественной устойчивостью [21]. Это указывает на необходимость выявления и объединения как имеющихся, так и новых генов качественной и количественной устойчивости к фомозу [49]. Чтобы эффективно использовать расоспецифические гены устойчивости самостоятельно или на фоне количественной устойчивости, патоген должен контролироваться через регулярные промежутки времени с целью обнаружения изолятов гриба с вирулентностью к используемым генам устойчивости. Таким образом, одной из стратегий селекции на устойчивость к фомозу может быть применение одиночных главных генов или их сочетаний в различных комбинациях (пирамидирование генов) на генетическом фоне с высоким уровнем нерасоспецифической резистентности. Это возможно с помощью MAS при использовании маркеров, тесно сцепленных с генами расоспецифической устойчивости и QTLs, ассоциированными с нерасоспецифической резистентностью. Применение конкретных главных генов будет зависеть от структуры вирулентности популяции патогена. Наличие генетического фона с нерасоспецифической устойчивостью предотвратит большие потери урожая сортов в случае преодоления присутствующих у них генов расоспецифической устойчивости. Длительность

устойчивости можно повысить, используя не только пирамиды главных генов резистентности, введенные в один сорт, но и смеси сортов или видов с разными генами устойчивости на уровне одного поля, межполевую диверсификацию, и, несомненно, агротехнические приемы [8].

**Заключение.** Мировые потери урожая рапса от фомоза оцениваются более чем в 900 млн долларов за вегетационный сезон [50, 51].

Лучшим способом защиты от фомоза является выращивание устойчивых сортов. Однако в результате давления отбора, оказываемого генами устойчивости на популяции гриба, который имеет большой потенциал для развития вирулентности, сорта с *R*-генами быстро становятся восприимчивыми. Так, в Австралии спустя 3 года после выпуска сортов с устойчивостью к *L. maculans* от *B. rapa* ssp. *sylvestris* [17, 18] в местных популяциях патогена быстро возросла частота изолятов с вирулентностью к гену *LepR3* [8, 19, 20]. Во Франции наблюдалось преодоление гена *Rlm1* в течение 3 лет после реализации сортов с этим геном [23], преодолен и ранее эффективный в Европе ген *Rlm7* [34]. Происходит постепенная потеря эффективности и других главных генов устойчивости к *L. maculans* после широкого использования сортов, содержащих эти гены [26, 24]. Тем не менее, диверсификация сортов по генам устойчивости и их ротация во времени и пространстве позволяют управлять фомозом [27]. Ротацию культурных сортов, содержащих различные гены или комбинации генов устойчивости, рекомендуется осуществлять каждые 4 года [52]. Эффективной стратегией увеличения длительности устойчивости является селекция сортов рапса с сочетанием ювенильных и возрастных генов устойчивости к фомозу [21, 46–48]. В случае, если преодолевается ювенильный ген, сорт сохраняет приемлемый уровень полевой устойчивости за счет малых генов устойчивости, а кроме того, главный ген на таком генетическом фоне преодолевается не так быстро [21]. Все это указывает на необходимость выявления и объединения как имеющихся, так и новых генов качественной и количественной устойчивости к фомозу [49].

Современным подходом является широкогеномное ассоциативное картирование, которое позволяет идентифицировать маркеры к известным и новым локусам устойчивости в коллекции родительских форм и перспективного селекционного материала рапса для последующего применения в маркер-опосредованной селекции в определенной зоне [53, 54].

Следует предусматривать и защиту рапса от *L. biglobosa*, который может наносить значительный ущерб, особенно сортам с эффективными главными генами устойчивости к *L. maculans* [55, 56]. Кроме того, для химической защиты рапса от *L. biglobosa* требуются более высокие дозы триазолов, чем для контроля *L. maculans* [57]. Поскольку многие из наиболее эффективных фунгицидов не разрешены новым законодательством стран Европейского союза, существует большая потребность в селекции сортов рапса с устойчивостью как к *L. maculans*, так и к *L. biglobosa* [56]. Для уменьшения инфекции возбудителей фомоза важны и агротехнические мероприятия – обработка почвы с заделкой растительных остатков, севооборот, применение пестицидов по листьям и стерне, оптимальные нормы высева семян и сроки посева с учетом факторов внешней среды [58].

#### Список использованных источников

1. SNP markers-based map construction and genome-wide linkage analysis in *Brassica napus* / H. Raman [et al.] // Plant Biotechnol. J. – 2014. – Vol. 12. – P. 851–860.
2. Plant breeding: assessment of genetic diversity in crop plants and its exploitation in breeding / W. Friedt [et al.] // Progress in Botany. – 2007. – Vol. 168. – P. 151–178.
3. Conservation of the microstructure of genome segments in *Brassica napus* and its diploid relatives / D. Rana [et al.] // The Plant J. – 2004. – Vol. 40. – P. 725–733.
4. Characterization of flowering time and SSR marker analysis of spring and winter type *Brassica napus* L. germplasm / V. M. V. Cruz [et al.] // Euphytica. – 2007. – Vol. 153. – P. 43–57.
5. Bockus, W. W. The impact of reduced tillage on soilborne plant pathogens / W. W. Bockus, J. P. Shroyer // Annu. Rev. Phytopathol. – 1998. – Vol. 36. – P. 485–500.
6. Guo, X. W. Seasonal and diurnal patterns of spore dispersal by *Leptosphaeria maculans* from canola stubble in relation to environmental conditions / X. W. Guo, W. G. D., Fernando // Plant Disease. – 2005. – Vol. 89. – P. 97–104.
7. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe / J. S. West [et al.] // Plant Pathol. – 2001. – Vol. 50. – P. 10–27.
8. Fernando, W. G. D. Breeding for blackleg resistance: the biology and epidemiology / W. G. D. Fernando, Y. Chen, K. Ghanbarnia // Adv. Bot. Res. – 2007. – Vol. 45. – P. 271–311.

9. Gladders, P. Observations on the epidemiology of *Leptosphaeria maculans* stem canker in winter oilseed rape / P. Gladders, T. M. Musa // Plant Pathol. – 1980. – Vol. 29. – P. 28–37.
10. McGee, D. C. Blackleg (*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.) of rapeseed in Victoria: crop losses and factors which affect disease severity / D. C. McGee, R. W. Emmett // Aust. J. Agric. Res. – 1977. – Vol. 28. – P. 47–51.
11. Hammond, K. E. A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans* / K. E. Hammond, B. G. Lewis, T. M. Musa // Plant Pathol. – 1985. – Vol. 34, N 4. – P. 557–565.
12. Epidemiology of *Leptosphaeria maculans* in relation to forecasting stem canker severity on winter oilseed rape in the UK / J. S. West [et al.] // Ann. Appl. Biol. – 1999. – Vol. 135. – P. 535–546.
13. Effects of timing of *Leptosphaeria maculans* ascospore release and fungicide regime on phoma leaf spot and phoma stem canker development on winter oilseed rape (*Brassica napus*) in southern England / J. S. West // Plant Pathol. – 2002b. – Vol. 51. – P. 454–463.
14. Kutcher, H. R. Increased frequency of canola in crop rotations associated with increased blackleg disease / H. R. Kutcher, S. A. Brandt // Can. J. Plant Pathol. – 2009. – Vol. 31. – P. 123–124.
15. The *Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* species complex in the American continent / A. Dilmaghani [et al.] // Plant Pathol. – 2009. – Vol. 58, N 6. – P. 1044–1058.
16. Crouch, J. H. The effect of a genome substitution on the resistance of *Brassica napus* to infection by *Leptosphaeria maculans* / J. H. Crouch, B. G. Lewis, R. F. Mithen // Plant Breeding. – 1994. – Vol. 112. – P. 265–278.
17. Yu, F. Identification of two novel genes for blackleg resistance in *Brassica napus* / F. Yu, D. J. Lydiate, S. R. Rimmer // Theor. Appl. Genet. – 2005. – Vol. 110. – P. 969–979.
18. Yu, F. Identification and mapping of a third blackleg resistance locus in *Brassica napus* derived from *B. rapa* subsp. *sylvestris* / F. Yu, D. J. Lydiate, S. R. Rimmer // Genome. – 2008. – Vol. 51. – P. 64–72.
19. Screening and identification of resistance to *Leptosphaeria maculans* (stem canker) in *Brassica napus* accessions / T. Rouxel [et al.] // Euphytica. – 2003. – Vol. 133. – P. 219–231.
20. Li, C. X. Identification of a single dominant allele for resistance to blackleg in *Brassica napus* “Surpass 400” / C. X. Li, W. A. Cowling // Plant Breeding. – 2003a. – Vol. 122. – P. 485–488.
21. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus* / H. Brun [et al.] // New Phytologist. – 2010. – Vol. 185. – P. 285–299.
22. Complexities of chromosome landing in a highly duplicated genome: toward map-based cloning of a gene controlling blackleg resistance in *Brassica napus* / R. Mayerhofer [et al.] // Genetics. – 2005. – Vol. 171. – P. 1977–1988.
23. Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by repeat-induced point mutations / T. Rouxel [et al.] // Nature Communications. – 2011. – Vol. 2, N 202. – P. 1–10.
24. A ten-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape / T. Rouxel [et al.] // Eur. J. Plant Pathol. – 2003. – Vol. 109. – P. 871–881.
25. Major gene resistance to blackleg in *Brassica napus* overcome within three years of commercial production in south-eastern Australia / S. J. Sprague [et al.] // Plant Pathol. – 2006. – Vol. 59. – P. 190–198.
26. Rouxel, T. The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era / T. Rouxel, M. H. Balesdent // Mol. Plant Pathol. – 2005. – Vol. 6. – P. 225–241.
27. Effect of rotation of canola (*Brassica napus*) cultivars with different compliments of blackleg resistance genes on disease severity / S. J. Marcroft [et al.] // Plant Pathol. – 2012. – Vol. 61. – P. 934–944.
28. Breakdown of *Rlm3* resistance in the *Brassica napus*–*Leptosphaeria maculans* pathosystem in western Canada / X. Zhang [et al.] // Eur. J. Plant Pathol. – 2015. – Vol. 145, N 3. – P. 1–16.
29. Frequency of avirulence alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe / A. Stachowiak [et al.] // Eur. J. Plant Pathol. – 2006. – Vol. 114. – P. 67–75.
30. A field method for evaluating the potential durability of new resistance sources: application to the *Leptosphaeria maculans*/*Brassica napus* pathosystem / H. Brun [et al.] // Phytopathology. – 2000. – Vol. 90. – P. 961–966.
31. Evolution of linked avirulence effectors in *Leptosphaeria maculans* is affected by genomic environment and exposure to resistance genes in host plants / A. P. Van de Wouw [et al.] // PLoS Pathol. – 2010. – Vol. 6, N 11. – P. 1–15.
32. Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: map-based cloning of *AvrLm6* / I. Fudal [et al.] // MPMI. – 2007. – Vol. 20. – P. 459–470.
33. Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans* / L. Gout [et al.] // Mol. Microbiol. – 2006. – Vol. 60. – P. 67–80.
34. Evolution of the frequency of the *AvrLm7* allele of *Leptosphaeria maculans* in France under selection pressure: a 15-years survey / C. Plissonneau [et al.] // Healthy plant – healthy people: 11<sup>th</sup> conf. of the European foundation for plant pathology, Kraków, 8–13 September 2014. – Kraków, 2014. – P. 129.
35. Li, H. Breakdown of a *Brassica rapa* subsp. *sylvestris* single dominant blackleg resistance gene in *Brassica napus* rapeseed by *Leptosphaeria maculans* field isolates in Australia / H. Li, K. Sivasithamparam, M. J. Barbetti // Plant Dis. – 2003b. – Vol. 87. – P. 752.
36. Chen, C. Ability of a *Leptosphaeria maculans* isolate to form stem canker on Indian mustard (*Brassica juncea*) segregate as a single locus / C. Chen, K. Plummer, B. J. Howlett // Eur. J. Plant Pathol. – 1996. – Vol. 102. – P. 349–352.
37. Pathogenic variability of *Leptosphaeria maculans* in western Canada / H. R. Kutcher [et al.] // Can. J. Plant Pathol. – 2007. – Vol. 29, N 4. – P. 388–393.
38. Breakdown of resistance to the fungal disease, blackleg, is averted in commercial canola (*Brassica napus*) crops in Australia / A. P. Van de Wouw [et al.] // Field Crops Res. – 2014b. – Vol. 166. – P. 144–151.

39. Blackleg disease of canola mitigated by resistant cultivars and four-year crop rotations in western Canada / H. R. Kutcher [et al.] // *Can. J. Plant Pathol.* – 2013. – Vol. 35. – P. 209–221.
40. Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*) / R. Delourme [et al.] // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2006. – Vol. 114. – P. 41–52.
41. Potential for using host-resistance to reduce production of pseudothecia and ascospores of *Leptosphaeria maculans*, the blackleg pathogen of *Brassica napus* / S. J. Marcroft [et al.] // *Plant Pathol.* – 2004. – Vol. 53. – P. 468–474.
42. Rimmer, S. R. Resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus* / S. R. Rimmer // *Can. J. Plant Pathol.* – 2006. – Vol. 28. – S. 288–297.
43. Leach, J. E. Bacterial avirulence genes / J. E. Leach, F. F. White // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 1996. – Vol. 34. – P. 153–179.
44. Волюевич, Е. А. Генетическая природа полигенной устойчивости мягкой пшеницы к бурой ржавчине / Е. А. Волюевич, А. А. Булойчик, В. С. Борзяк // Докл. Нац. акад. Беларуси. – 2006. – Т. 50, № 1. – С. 59–61.
45. Волюевич, Е. А. Остаточный эффект преодоленных генов устойчивости мягкой пшеницы к биотрофным грибным патогенам / Е. А. Волюевич // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Гос. науч. учреждение “Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси”. – Минск, 2014. – Т. 17. – С. 78–84.
46. Kiyosawa, S. Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance / S. Kiyosawa // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 1982. – Vol. 20. – P. 93–117.
47. Pietravalle, S. Durability of resistance and cost of virulence / S. Pietravalle, S. Lemarié, F. van den Bosch // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2006. – Vol. 114, N 1. – P. 107–116.
48. Quantitative resistance affects the speed of frequency increase but not the diversity of the virulence alleles overcoming a major resistance gene to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape / R. Delourme [et al.] // *Infect. Genet. Evol.* – 2014. – Vol. 27. – P. 490–499.
49. Molecular mapping of qualitative and quantitative loci for resistance to *Leptosphaeria maculans* causing blackleg disease in canola (*Brassica napus* L.) / R. Raman [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2012b. – Vol. 125. – P. 405–418.
50. World-wide importance of Phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*) / B. D. L. Fitt [et al.] // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2006. – Vol. 114, N 1. – P. 3–15.
51. Strategies to prevent spread of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) onto oilseed rape crops in China: costs and benefits / B. D. L. Fitt [et al.] // *Plant Pathol.* – 2008. – Vol. 57. – P. 652–664.
52. Factors affecting production of inoculum of the blackleg fungus *Leptosphaeria maculans* in south-eastern Australia / S. J. Marcroft [et al.] // *Aust. J. Exp. Agr.* – 2003. – Vol. 43. – P. 1231–1236.
53. Blackleg resistance in rapeseed: phenotypic screen, molecular markers and genome wide linkage and association mapping / H. Raman [et al.] // 17<sup>th</sup> Australian Research Assembly on Brassicas (ARAB), Wagga Wagga, 15–17 August 2011. – Wagga Wagga, 2011. – P. 61–64.
54. Association mapping of quantitative resistance for *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus* L.) / C. Jestin [et al.] // *Mol. Breeding.* – 2011. – Vol. 27. – P. 271–287.
55. Huang, Y. J. Importance of *Leptosphaeria biglobosa* as a cause of phoma stem canker on winter oilseed rape in the UK. Crop Production in Southern Britain: Precision Decisions for Profitable Cropping / Y. J. Huang, C. S. Karandeni-Dewage, B. D. L. Fitt // *Aspects of Appl. Biol.* – 2014. – Vol. 127. – P. 117–122.
56. Sidique, S. N. M. Effects of host resistance on colonisation of *Brassica napus* (oilseed rape) by *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* (phoma stem canker): Ph.D. Thesis ... of Doctor of Philosophy / S. N. M. Sidique; University of Hertfordshire. – Hatfield, 2015. – 475 p.
57. Kaczmarek, J. Characterization of two coexisting pathogen populations of *Leptosphaeria* spp., the cause of stem canker of Brassicas / J. Kaczmarek, M. Jedryczka // *Acta Agrobotanica.* – 2011. – Vol. 64. – P. 3–14.
58. Improved resistance management for durable disease control: a case study of phoma stem canker of oilseed rape / J. N. Aubertot [et al.] // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2006. – Vol. 114. – P. 91–106.

## References

1. Raman, H., Dalton-Morgan, J., Diffey, S., Raman, R., Alamery, S., Edwards, D. and Batley, J. (2014), “SNP markers-based map construction and genome-wide linkage analysis in *Brassica napus*”, *Plant Biotechnology Journal*, vol. 12, pp. 851–860, doi: 10.1111/pbi.12186.
2. Friedt, W., Snowdon, R., Ordon, F. and Ahlemeyer, J. (2007), “Plant breeding: assessment of genetic diversity in crop plants and its exploitation in breeding”, *Progress in Botany*, vol. 168, pp. 151–178.
3. Rana, D., van den Boogaart, T., O’Neill, C. M., Hynes, L., Bent, E., Macpherson, L., Park, J. Y., Lim, Y. P. and Bancroft, I. (2004), “Conservation of the microstructure of genome segments in *Brassica napus* and its diploid relatives”, *The Plant Journal*, vol. 40, pp. 725–733, doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02244.x.
4. Cruz, V. M. V., Luhman, R., Marek, L. F., Rife, C. L., Shoemaker, R. C., Brummer, E. C. and Gardner, C. A. C. (2007), “Characterization of flowering time and SSR marker analysis of spring and winter type *Brassica napus* L. germplasm”, *Euphytica*, vol. 153, pp. 43–57, doi:10.1007/s10681-006-9233-1.
5. Bockus, W. W. and Shroyer, J. P. (1998), “The impact of reduced tillage on soilborne plant pathogens”, *Annual Review Phytopathology*, vol. 36, pp. 485–500, doi: 10.1146/annurev.phyto.36.1.485.

6. Guo, X. W. and Fernando, W. G. D. (2005), “Seasonal and diurnal patterns of spore dispersal by *Leptosphaeria maculans* from canola stubble in relation to environmental conditions”, *Plant Disease*, vol. 89, pp. 97–104.
7. West, J. S., Kharband, P. D., Barbetti, M. J. and Fitt, B. D. L. (2001), “Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe”, *Plant Pathology*, vol. 50, pp. 10–27, doi: 10.1046/j.1365-3059.2001.00546.x.
8. Fernando, W. G. D., Chen, Y. and Ghanbarnia, K. (2007), “Breeding for blackleg resistance: the biology and epidemiology”, *Advances in Botanical Research*, vol. 45, pp. 271–311.
9. Gladders, P. and Musa, T. M. (1980), “Observations on the epidemiology of *Leptosphaeria maculans* stem canker in winter oilseed rape”, *Plant Pathology*, vol. 29, pp. 28–37.
10. McGee, D. C. and Emmett, R. W. (1977), “Blackleg (*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.) of rapeseed in Victoria: crop losses and factors which affect disease severity”, *Australian Journal of Experimental Agriculture*, vol. 28, pp. 47–51.
11. Hammond, K. E., Lewis, B. G. and Musa, T. M. (1985), “A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*”, *Plant Pathology*, vol. 34, no. 4, pp. 557–565.
12. West, J. S., Biddulph, J. E., Fitt, B. D. L. and Gladders, P. (1999), “Epidemiology of *Leptosphaeria maculans* in relation to forecasting stem canker severity on winter oilseed rape in the UK”, *Annals of Applied Biology*, vol. 135, pp. 535–546.
13. West, J. S., Fitt, B. D. L., Leech, P. K., Biddulph, J. E., Huang, Y.-J. and Balesdent, M.-H. (2002b), “Effects of timing of *Leptosphaeria maculans* ascospore release and fungicide regime on phoma leaf spot and phoma stem canker development on winter oilseed rape (*Brassica napus*) in southern England”, *Plant Pathology*, vol. 51, pp. 454–463.
14. Kutcher, H. R. and Brandt, S. A. (2009), “Increased frequency of canola in crop rotations associated with increased blackleg disease”, *Canadian Journal of Plant Pathology*, vol. 31, pp. 123–124.
15. Dilmaghani, A., Balesdent, M. H., Didier, J. P., Wu, C., Davey, J., Barbetti, M. J., Li, H., Moreno-Rico, O., Phillips, D., Despeghel, J. P., Vincenot, L., Gout, L. and Rouxel, T. (2009), “The *Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* species complex in the American continent”, *Plant Pathology*, vol. 58, no. 6, pp. 1044–1058, doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02149.x.
16. Crouch, J. H., Lewis, B. G. and Mithen, R. F. (1994), “The effect of a genome substitution on the resistance of *Brassica napus* to infection by *Leptosphaeria maculans*”, *Plant Breeding*, vol. 112, pp. 265–278, doi: 10.1111/j.1439-0523.1994.tb00684.x.
17. Yu, F., Lydiate, D. J. and Rimmer, S. R. (2005), “Identification of two novel genes for blackleg resistance in *Brassica napus*”, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 110, pp. 969–979, doi: 10.1007/s00122-004-1919-y.
18. Yu, F., Lydiate, D. J. and Rimmer, S. R. (2008), “Identification and mapping of a third blackleg resistance locus in *Brassica napus* derived from *B. rapa* subsp. *sylvestris*”, *Genome*, vol. 51, pp. 64–72, doi: 10.1139/G07-103.
19. Rouxel, T., Willner, E., Coudard, L. and Balesdent, M.-H. (2003b), “Screening and identification of resistance to *Leptosphaeria maculans* (stem canker) in *Brassica napus* accessions”, *Euphytica*, vol. 133, pp. 219–231.
20. Li, C. X. and Cowling, W. A. (2003), “Identification of a single dominant allele for resistance to blackleg in *Brassica napus* ‘Surpass 400’”, *Plant Breeding*, vol. 122, pp. 485–488, doi: 10.1111/j.1439-0523.2003.00863.x.
21. Brun, H., Chèvre, A. M., Fitt, B. D., Powers, S., Besnard, A.-L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M. and Andrivon, D. (2010), “Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*”, *New Phytologist*, vol. 185, pp. 285–299, doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03049.x.
22. Mayerhofer, R., Wilde, K., Mayerhofer, M., Lydiate, D., Bansal, V. K., Good, A. G. and Parkin, I. A. (2005), “Complexities of chromosome landing in a highly duplicated genome: toward map-based cloning of a gene controlling blackleg resistance in *Brassica napus*”, *Genetics*, vol. 171, pp. 1977–1988, doi: 10.1534/genetics.105.049098.
23. Rouxel, T., Grandaubert, J., Hane, J. K., Hoede, C., van de Wouw, A. P., Couloux, A., Dominguez, V., Anthouard, V., Bally, P., Bourras, S., Cozijnsen, A. J., Ciuffetti, L. M., Degrave, A., Dilmaghani, A., Duret, L., Fudal, I., Goodwin, S. B., Gout, L., Glaser, N., Linglin, J., Kema, G. H. J., Lapalu, N., Lawrence, C. B., May, K., Meyer, M., Ollivier, B., Poulain, J., Schoch, C. L., Simon, A., Spatafora, J. W., Stachowiak, A., Turgeon, B. G., Tyler, B. M., Vincent, D., Weissenbach, J., Amselem, J., Quesneville, H., Oliver, R. P., Wincker, P., Balesdent, M.-H. and Howlett, B. J. (2011), “Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by repeat-induced point mutations”, *Nature Communications*, vol. 2, no. 202, pp. 1–10, doi: 10.1038/ncomms1189.
24. Rouxel, T., Penaud, A., Pinochet, X., Brun, H., Gout, L., Delourme, R., Schmit, J. and Balesdent, M.-H. (2003a), “A ten-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape”, *European Journal of Plant Pathology*, vol. 109, pp. 871–881.
25. Sprague, S. J., Marcroft, S. J., Hayden, H. L. and Howlett, B. J. (2006), “Major gene resistance to blackleg in *Brassica napus* overcome within three years of commercial production in southeastern Australia”, *Plant Pathology*, vol. 59, pp. 190–198, doi: 10.1094/PD-90-0190.
26. Rouxel, T. and Balesdent, M. H. (2005), “The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era”, *Mol. Plant Pathol.*, vol. 6, pp. 225–241, doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00282.x.
27. Marcroft, S. J., van de Wouw, A. P., Salsbury, P. A., Pottere, T. D. and Howlett, B. J. (2012), “Effect of rotation of canola (*Brassica napus*) cultivars with different compliments of blackleg resistance genes on disease severity”, *Plant Pathology*, vol. 61, pp. 934–944, doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02580.x.
28. Zhang, X., Peng, G., Kutcher, H. R., Balesdent, M.-H., Delourme, R. and Fernando, W. G. D. (2015), “Breakdown of *Rlm3* resistance in the *Brassica napus*–*Leptosphaeria maculans* pathosystem in western Canada”, *European Journal of Plant Pathology*, vol. 145, no. 3, pp. 1–16, doi: 10.1007/s10658-015-0819-0.

29. Stachowiak, A., Olechnowicz, J., Jedryczka, M., Rouxel, T., Balesdent, M.-H., Happstadius, I., Gladders, P., Latunde-Dada, A. and Evans, N. (2006), “Frequency of avirulence alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe”, *European Journal of Plant Pathology*, vol. 114, pp. 67–75, doi: 10.1007/s10658-005-2931-z.
30. Brun, H., Levivier, S., Somda, I., Ruer, D., Renard, M. and Chèvre, A. M. (2000), “A field method for evaluating the potential durability of new resistance sources: application to the *Leptosphaeria maculans/Brassica napus* pathosystem”, *Phytopathology*, vol. 90, pp. 961–966.
31. Van de Wouw, A. P., Cozijnsen, A. J., Hane, J. K., Brunner, P. C., McDonald, B. A., Oliver, R. P. and Howlett, B. J. (2010), “Evolution of linked avirulence effectors in *Leptosphaeria maculans* is affected by genomic environment and exposure to resistance genes in host plants”, *PLoS Pathogens*, vol. 6, no. 11, pp. 1–15.
32. Fudal, I., Ross, S., Gout, L., Blaise, F., Kuhn, M. L., Eckert, M. R., Cattolico, L., Bernard-Samain, S., Balesdent, M. H. and Rouxel, T. (2007), “Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: map-based cloning of *AvrLm6*”, *MPMI*, vol. 20, pp. 459–470.
33. Gout, L., Fudal, I., Kuhn, M.-L., Blaise, F., Eckert, M., Cattolico, L., Balesdent, M.-H. and Rouxel, T. (2006), “Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*”, *Mol. Microbiol.*, vol. 60, pp. 67–80, doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05076.x.
34. Plissonneau, C., Rouxel, T., Daverdin, G. Meur, L. L., Soulard, T., Cugnire, L. and Balesdent, M.-H. (2014), “Evolution of the frequency of the *AvrLm7* allele of *Leptosphaeria maculans* in France under selection pressure: a 15-years survey”, *Healthy plant – healthy people: 11<sup>th</sup> conf. of the European foundation for plant pathology*, Kraków, PL, 8–13 September 2014, p. 129.
35. Li, H., Sivasithamparan, K. and Barbetti, M. J. (2003b), “Breakdown of a *Brassica rapa* subsp. *sylvestris* single dominant blackleg resistance gene in *Brassica napus* rapeseed by *Leptosphaeria maculans* field isolates in Australia”, *Plant Disease*, vol. 87, p. 752, doi: 10.1094/PDIS.2003.87.6.752A.
36. Chen, C., Plummer, K. and Howlett, B. J. (1996), “Ability of a *Leptosphaeria maculans* isolate to form stem canker on Indian mustard (*Brassica juncea*) segregate as a single locus”, *European Journal of Plant Pathology*, vol. 102, pp. 349–352, doi: 10.1007/BF01878129.
37. Kutcher, H. R., Keri, M., McLaren, D. L. and Rimmer, S. R. (2007), “Pathogenic variability of *Leptosphaeria maculans* in western Canada”, *Can. J. Plant Pathol.*, vol. 29, no. 4, pp. 388–393, doi: 10.1080/07060660709507484.
38. Van de Wouw, A. P., Macroft, S. J., Ware A., Lindbeck K., Khangura R. and Howlett, B. J. (2014b), “Breakdown of resistance to the fungal disease, blackleg, is averted in commercial canola (*Brassica napus*) crops in Australia”, *Field Crops Research*, vol. 166, pp. 144–151, doi: 10.1016/j.fcr.2014.06.023.
39. Kutcher, H. R., Brandt, S. A., Smith, E. G., Ulrich, D., Malhi, S. S. and Johnston, A. M. (2013), “Blackleg disease of canola mitigated by resistant cultivars and four-year crop rotations in western Canada”, *Canadian Journal of Plant Pathology*, vol. 35, pp. 209–221, doi: 10.1080/07060661.2013.775600.
40. Delourme, R., Chèvre, A. M., Brun, H., Rouxel, T., Balesdent, M. H., Dias, J. S., Salisbury, P., Renard, M. and Rimmer, S. R. (2006), “Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*)”, *European Journal of Plant Pathology*, vol. 114, pp. 41–52, doi: 10.1007/s10658-005-2108-9.
41. Marcroft, S. J., Sprague, S. J., Salisbury, P. A. and Howlett, B. J. (2004), “Potential for using host-resistance to reduce production of pseudothecia and ascospores of *Leptosphaeria maculans*, the blackleg pathogen of *Brassica napus*”, *Plant Pathology*, vol. 53, pp. 468–474, doi: 10.1111/j.1365-3059.2004.01050.x.
42. Rimmer, S. R. (2006), “Resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*”, *Canadian Journal of Plant Pathology*, vol. 28, pp. 288–297.
43. Leach, J. E. and White, F. F. (1996), “Bacterial avirulence genes”, *Annual Review Phytopathology*, vol. 34, pp. 153–179, doi: 10.1146/annurev.phyto.34.1.153.
44. Voluevich, E. A. (2006), “Genetic nature of polygenic wheat leaf rust resistance”. *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, vol. 50, no. 1, pp. 59–61.
45. Voluevich, E. A. (2014), “Residual effect of defeated genes of wheat resistance to biotrophic fungal pathogens”, *Molekularnaja i prikladnaya genetika: sbornik nauchnykh trydov* [Molecular and Applied Genetics: digest of scientific papers], Institut genetiki i citologii Nacional'noj akademii nauk Belarusi, Minsk, BY, vol. 17, pp. 78–84.
46. Kiyosawa, S. (1982), “Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance”, *Annual Review Phytopathology*, vol. 20, pp. 93–117, doi: 10.1146/annurev.py.20.090182.000521.
47. Pietravalle, S., Lemarié, S. and van den Bosch, F. (2006), “Durability of resistance and cost of virulence”, *Eur. J. Plant Pathol.*, vol. 114, no. 1, pp. 107–116, doi:10.1007/s10658-005-3479-7.
48. Delourme, R., Bousset, L., Ermel, M., Duffé, P., Besnard, A. L., Marque, B., Fudal, I., Linglin, J., Chadœuf, J. and Brun, H. (2014), “Quantitative resistance affects the speed of frequency increase but not the diversity of the virulence alleles overcoming a major resistance gene to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape”, *Infection, genetics and evolution*, vol. 27, pp. 490–499, doi: 10.1016/j.meegid.2013.12.019.
49. Raman, R., Taylor, B., Marcroft, S., Stiller, J., Eckermann, P., Coombes, N., Rehman, A., Lindbeck, K., Luckett, D., Wratten, N., Batley, J., Edwards, D., Wang, X. and Raman, H. (2012b), “Molecular mapping of qualitative and quantitative loci for resistance to *Leptosphaeria maculans* causing blackleg disease in canola (*Brassica napus* L.)”, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 125, pp. 405–418, doi: 10.1007/s00122-012-1842-6.
50. Fitt, B. D. L., Brun, H., Barbetti, M. J. and Rimmer, S. R. (2006), “World-wide importance of *Phoma stem canker* (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*)”, *European Journal of Plant Pathology*, vol. 114, no. 1, pp. 3–15, doi: 10.1007/s10658-005-2233-5.

51. Fitt, B. D. L., Hu, B. C., Li, Z. Q., Liu, S. Y., Lange, R. M., Kharbada, P. D., Butterworth, M. H. and White, R. P. (2008), "Strategies to prevent spread of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) onto oilseed rape crops in China: costs and benefits", *Plant Pathology*, vol. 57, pp. 652–664, doi: 10.1111/j.1365-3059.2008.01841.x.

52. Marcroft, S. J., Sprague, S. J., Pymer, S. J., Salisbury, P. A. and Howlett, B. J. (2003), "Factors affecting production of inoculum of the blackleg fungus *Leptosphaeria maculans* in south-eastern Australia", *Australian Journal of Experimental Agriculture*, vol. 43, pp. 1231–1236.

53. Raman, H., Raman, R., Taylor, B., Lindbeck, K., Coombes, N., Eckermann, P., Batley, J., Edwards, D., Price, A., Rehman, A., Marcroft, S., Luckett, D., Hossain, S. and Salisbury, P. (2011), "Blackleg resistance in rapeseed: phenotypic screen, molecular markers and genome wide linkage and association mapping", *17<sup>th</sup> Australian Research Assembly on Brassicas (ARAB)*, Wagga Wagga, AU, 15–17 August 2011, pp. 61–64.

54. Jestin, C., Lodé, M., Vallée P., Domin, C., Falentin, C., Horvais, R., Coedel, S., Manzaneres-Dauleux, M. J. and Delourme, R. (2011), "Association mapping of quantitative resistance for *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus* L.)", *Molecular Breeding*, vol. 27, pp. 271–287, doi: 10.1007/s11032-010-9429-x.

55. Huang, Y. J., Karandeni-Dewage, C. S. and Fitt, B. D. L. (2014), "Importance of *Leptosphaeria biglobosa* as a cause of phoma stem canker on winter oilseed rape in the UK. Crop Production in Southern Britain: Precision Decisions for Profitable Cropping", *Aspects of Applied Biology*, vol. 127, pp. 117–122.

56. Sidique, S. N. M. (2015), "Effects of host resistance on colonisation of *Brassica napus* (oilseed rape) by *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* (phoma stem canker)", Ph. D. Thesis, University of Hertfordshire, Hatfield, US.

57. Kaczmarek, J. and Jedryczka, M. (2011), "Characterization of two coexisting pathogen populations of *Leptosphaeria* spp., the cause of stem canker of *Brassicas*", *Acta Agrobotanica*, vol. 64, pp. 3–14.

58. Aubertot, J. N., West, J. S., Bousset-Vaslin, L., Salam, M. U., Barbetti, M. J. and Diggle, A. J. (2006), "Improved resistance management for durable disease control: a case study of phoma stem canker of oilseed rape", *European Journal of Plant Pathology*, vol. 114, pp. 91–106.

### Информация об авторе

Волуевич Елена Александровна – д-р биол. наук, доцент, гл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Voluevitch@yandex.ru

### Information about the author

Voluevich Elena – D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Chief scientific employee. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Voluevitch@yandex.ru

### Для цитирования

Волуевич, Е. А. Стратегии управления фомозом рапса (*Brassica napus* L.) / Е. А. Волуевич // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 1. – С. 119–128.

### For citation

Voluevich, E. A. (2017), "Blackleg of rape (*Brassica napus* L.) management strategies", *Proceedings of the National Academy of Science of Belarus, biological series*, no. 1, pp. 119–128.